

機関番号：34419

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～2010

課題番号：21790869

研究課題名 (和文) ストレス応答による肝臓糖代謝調節機構の解明

研究課題名 (英文) The analysis of the stress response on glycemc control in liver

研究代表者

中村 恭子 (NAKAMURA KYOKO)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：10512197

研究成果の概要 (和文)：本研究では、絶食・再摂食時における肝臓でのホルモンおよびストレス関連因子の遺伝子発現について解析した。その結果、2 型糖尿病モデルマウスの肝臓では (1) インスリン様成長因子 (IGF-1) 発現の低下 (2) IGF 結合タンパク質-1 (IGFBP-1) 発現の増強 (3) 11 $\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (11 $\beta$ -HSD1) の発現亢進 (4) ER ストレス関連因子の発現低下 (5) glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の受容体発現の亢進が見出された。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we analyzed the gene expression of hormone and stress related factors in liver. We found (1) down-expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), (2, 3) up-expression of IGF binding protein-1 (IGFBP-1) and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 (11 $\beta$ -HSD1), (4) the down-expression of ER stress marker and (5) the up-expression of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor in liver of type 2 diabetic model mice under the conditions of fasting and refeeding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病・肝臓代謝・ストレス・IGFBP-1・グルココルチコイド

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は代表的な生活習慣病であり、日本における糖尿病患者は著しく増加している。2006 年の国民健康・栄養調査で 40 歳以上の 3 人に 1 人が糖尿病または糖尿病予備軍である。肝臓における糖産生の増加は、糖尿病に

おける高血糖と密接に関与しており、栄養状態やホルモン環境の変化に対応してどのような機構で肝糖代謝が調節されているかを解明することは糖尿病への治療戦略の構築へと結びついていくのではないかと考えられる。

高血糖の持続が糖尿病であるが、この高血糖は様々なストレスを生じることが最近知られてきている。また身体に影響するストレスは、アドレナリンやコルチゾールといったホルモンを分泌させ、これらのホルモンは血糖値の上昇に関与している。肝臓における糖産生はPEPCKやG6Paseなどの糖産生酵素により制御されており、またその遺伝子発現には様々なホルモンが関与していることが知られている。

特に絶食・摂食時ではそのホルモン環境の変化が激しくなっている。2型糖尿病の発症は、インスリン作用の低下とβ細胞機能低下すなわちインスリン分泌能の低下を特徴としている。これらの代謝異常は臨床的に明らかな糖尿病よりも前に食後血糖値の上昇として現れる。しかしながら食後血糖値の制御機構については未だ不明な点が多い。よって代表者は2型糖尿病での食後血糖値の調節機構のメカニズムが解明できれば、糖尿病発症を予防できる手段を見出せるのではないかと考えた。

食後血糖値の上昇は、血糖値が上昇し始めたら即インスリンが分泌されるが、このインスリン分泌の障害と末梢組織でのインスリン感受性の低下の結果、食後の肝糖放出抑制が減少して生じているといわれている。この肝糖放出調節にはホルモンやストレスが深く関与していることから代表者は、正常肝と糖尿病発症時の肝における絶食・摂食後の肝臓におけるホルモン関連因子および様々なストレスに関わる因子の遺伝子発現変化が食後血糖値の上昇といった病態の誘因として作用するのではないかという仮説を構築した。

## 2. 研究の目的

本研究計画において、正常肝および糖尿病発症時の肝における絶食・摂食後のホルモンおよびストレス関連因子の遺伝子発現変化を解明し、糖尿病病態下における遺伝子発現制御のメカニズムについて明らかとするとともに、それら因子が絶食・摂食後の肝糖代謝機構に果たす役割を解明する。

## 3. 研究の方法

肥満・インスリン抵抗性の2型糖尿病モデルマウスとコントロールマウスを用いて実験を行う。マウスの飼育、取り扱いに関しては、近畿大学動物実験施設の規定に従って行った。各マウスを絶食後再摂食させて時間的経過後の肝臓を採取し、RNeasy mini Kitを用いて各肝臓からRNAを回収した。さらに逆転写反応後、各遺伝子のプライマーを用いて、リアルタイムPCRを行い、ホルモンおよびストレス関連因子遺伝子の発現について解析した。血糖値は、簡易血糖測定器を用いて測

定した。群間の解析は、Student's-t 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。

## 4. 研究成果

2型糖尿病モデルマウスとそのコントロールマウスの血糖値については、図1に示すように2型糖尿病モデルマウスにおいて絶食および再摂食後において血糖値が高くなっていた。

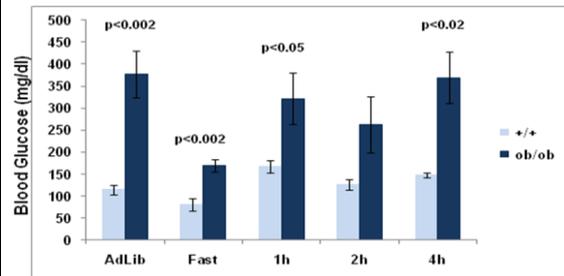


図 1

自由摂食、絶食および再摂食後の肝臓における血糖調節に関与するホルモンおよびストレス関連因子の遺伝子発現をリアルタイムPCRで解析した。成長ホルモン (growth hormone, GH) により肝臓から分泌されるIGF-1 (インスリン様成長因子-1) は、インスリン作用を示し、血糖値を抑制する働きがある。図2に示すように、自由摂食と再摂食後4時間後に有意に2型糖尿病モデルマウスの肝臓で発現が低下していた。

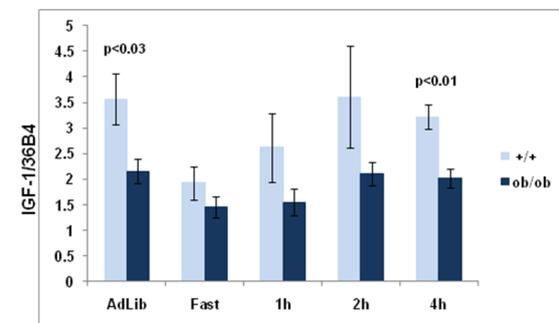


図 2

また IGF-1 の働きを抑制する IGFBP-1 (IGF 結合タンパク質-1) については、図3に示すように、肝臓における mRNA 発現は、再摂食後においてコントロールマウスと比較して2型糖尿病モデルマウスで高い傾向がみられたが、絶食時はコントロールマウスの方で発現が有意に高くなっていた。

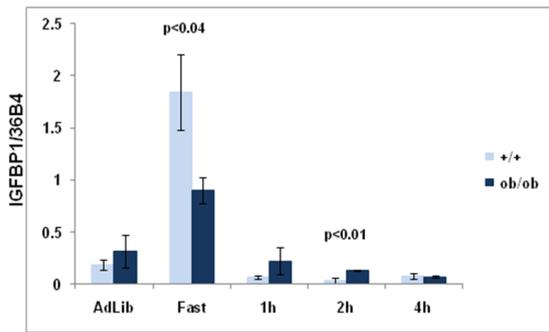


図 3

ストレスホルモンであるグルココルチコイド（ヒトではコルチゾール、げっ歯類ではコルチコステロン）の活性化に関わる酵素である  $11\beta$ HSD1 は、図 4 に示すように、いずれの場合においても 2 型糖尿病モデルマウスの肝臓で発現が亢進している傾向があり、特に絶食時と再摂食後 4 時間後に有意に高くなっていた。

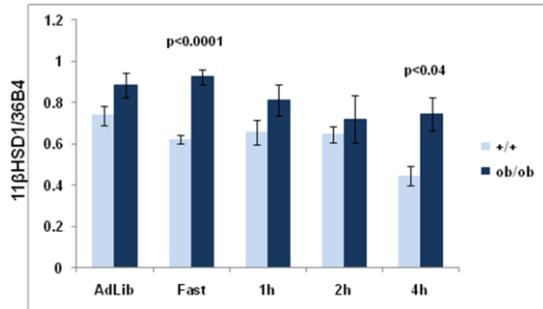


図 4

さらに摂食後に消化管から分泌され食後の血糖値調節に関与している GLP-1 (glucagon-like peptide-1) の受容体の発現は、図 5 に示すように、いずれの場合においても 2 型糖尿病モデルマウスの肝臓において発現が亢進していた。GLP-1 は食後の血糖値の低下や酸化ストレスの改善に役立っていることから、この受容体の発現が 2 型糖尿病の肝臓で亢進しているという結果は、興味深い結果である。

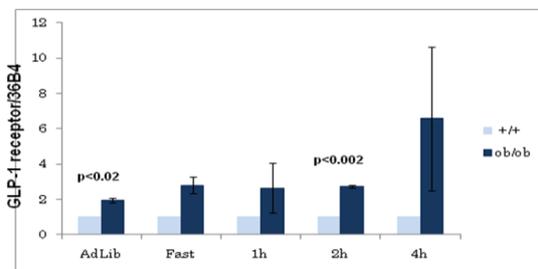


図 5

ER ストレスに関しては、糖尿病モデルマウスや高脂肪食による糖尿病マウスの肝臓に

おいて増加している事が報告されている。そこで絶食および再摂食後における ER ストレスへの影響をみた。図 6 に示すように、ER ストレスタンパク質である GRP78 の発現は、興味深いことに 2 型糖尿病モデルマウスの方で低下していた。

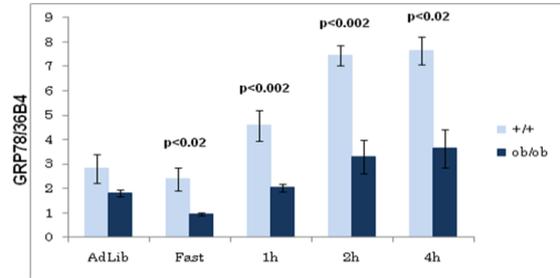


図 6

<考察および今後の展望>

絶食および再摂食後における肝臓におけるホルモンおよびストレス関連因子の遺伝子発現について検討した。2 型糖尿病モデルマウスでは自由摂食、絶食および再摂食後の血糖値はいずれも高値を示した。自由摂食の 2 型糖尿病モデルマウスの肝臓では、IGF-1 遺伝子発現が有意に低下していることから、インスリン作用不足となっていることが考えられる。また絶食および再摂食後も低い傾向があり、さらに IGF-1 の働きを抑制する IGFBP-1 の遺伝子発現が再摂食後に亢進している傾向があることから、IGF-1 によるインスリン作用を介した血糖値の低下が生じにくくなっていると考えられる。血糖値の上昇を引き起こすストレスホルモンの一つであるグルココルチコイドの活性化に関わる酵素の  $11\beta$ HSD1 の遺伝子発現については、コントロールと比較して 2 型糖尿病モデルマウスの肝臓で高くなっていることから、血糖値の上昇が維持されていると考えられる。また興味深いことに ER ストレスに関しては、2 型糖尿病の肝臓で低下しており、今後そのメカニズムについて検討を行っていく。最後に酸化ストレスや食後血糖値の調節に関与している GLP-1 受容体の発現について、2 型糖尿病病態下の肝臓では、特に再摂食後においてその遺伝子発現が亢進していることが明らかとなり、2 型糖尿病における食後血糖値の低下障害との関わりを今後検討していく予定である。さらにこれらの因子がどのように肝臓における血糖値調節に関与しているかについて、糖尿病時に発現が減少しているものは肝臓特異的にその遺伝子を発現させ、また発現が亢進している場合は、肝臓へ *in vivo* fectamine 2.0 を用いて標的の siRNA を導入し発現を抑制させるなど、このような処置を施した糖尿病モデルマウスを用いて継続して検討を行っていく。

よって本研究で見出された様々なホルモンおよびストレス関連因子の遺伝子発現変化が肝臓糖代謝調節に影響を与え、2型糖尿病病態下の肝臓での血糖値調節障害に関与していることが考えられる。特に糖尿病発症の前段階である食後血糖値の上昇の誘因が明らかとなれば、新たな糖尿病治療法の開発につながると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中村 恭子 (NAKAMURA KYOKO)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：10512197

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：