

Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学
氏 名	藤田 義人
研究テーマ	新規 eNOS 機能制御因子の探索による糖尿病および合併症に対する統合的治療法の開発

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

【研究の背景と目的】

2型糖尿病の病因である肥満およびインスリン抵抗性は血管内皮機能障害を引き起こす。これにはeNOSの機能障害が関与することが知られている。その一方で、eNOS機能障害自体がインスリン抵抗性や糖代謝異常を引き起こすことが注目されている。肥満やインスリン抵抗性など酸化ストレス環境下では、eNOSの補酵素であるTetrahydrobiopterin(BH4)の作用不足が起こりeNOS機能障害の原因となり得る。また、糖尿病腎症の発症にはeNOSが関与することが報告されている。本研究ではBH4欠乏モデルマウスを解析し、糖尿病および糖尿病合併症に対する治療法を開発することを目的とした。

【研究手法と成果】

① BH4の褐色脂肪組織(BAT)機能を介した糖・エネルギー代謝制御機構

BH4はeNOSのみならずノルアドレナリン(NA)合成に関与する酵素の補酵素として作用することが知られている。BH4産生量の減少が確認されているhph-1マウスおよびそのバックグラウンドマウスに通常食または高脂肪食負荷を行い、BAT機能および糖・エネルギー代謝への影響について検討した。hph-1マウスは、高脂肪食負荷により体重ならびに脂肪量の顕著な増加を認め、耐糖能異常、インスリン抵抗性を呈した。hph-1マウスはBATの機能異常を呈し、BH4投与により改善した。

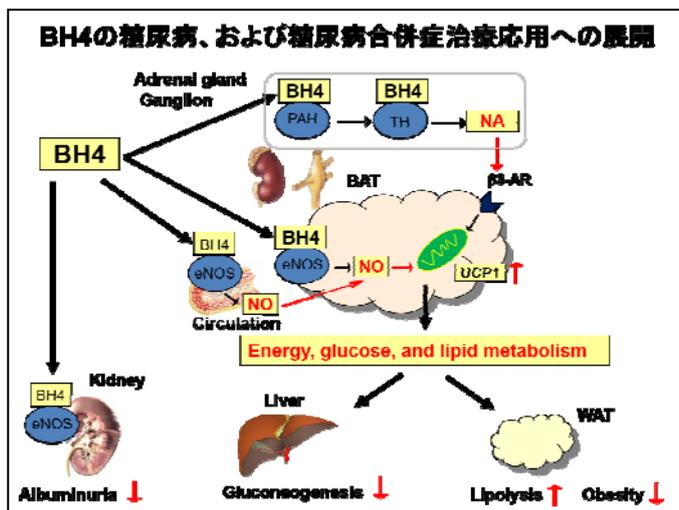
BH4の欠乏したhph-1マウスに対し、バックグラウンドマウス(BH4正常)由来のBATを移植したところ、熱産生能ならびに耐糖能の改善を認め、脂肪蓄積の減弱を観察した。BH4欠乏マウス由来のBAT移植ではこれらの効果が乏しかったことから、BH4による糖・エネルギー代謝制御機構にはBATが中心的に関与していることが示された。hph-1マウスではNA・NO量の低下を認めた。単離褐色脂肪細胞にBH4を曝露すると酸素消費速度の増大を認め、NO依存性にUCP1遺伝子発現が増加した。これらの結果により、BH4はNAおよびNOに相互的に作用することによりBAT機能を活性化し、全身の糖・エネルギー代謝を制御することが示された。

② BH4の糖尿病腎症発症機序への関与の検討

hph-1マウスを用いてBH4の糖尿病腎症発症機序への関与について検討した。hph-1マウス、およびそのバックグラウンドマウスにストレプトゾトシンを投与し高血糖を惹起した。腎組織を光学および電子顕微鏡で観察し、アルブミン尿の定量を行った。hph-1マウスではpodocyteの足突起の癒合が認められ、主に近位尿細管においてミトコンドリアのクリスタ構造の消失等の形態学的異常ならびにミトコンドリア密度の低下を認めた。またhph-1マウスでは尿アルブミンの増大を観察した。以上の所見より、高血糖およびBH4の作用不足によるeNOS機能障害が糖尿病腎症、特に早期腎症の病態形成に関与する可能性が示された。また、BH4関連物質について、糖尿病モデルマウスのアルブミン尿の増加抑制作用が認められた。

【結論、考察】

BH4はBAT機能を活性化し、全身の糖・エネルギー代謝を制御することが示された。また、BH4はeNOS作用を介した糖尿病腎症の発症抑制効果を有する可能性がある。本研究により、BH4が糖尿病・肥満症および糖尿病合併症の新規治療標的となり得ることが示された。



Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

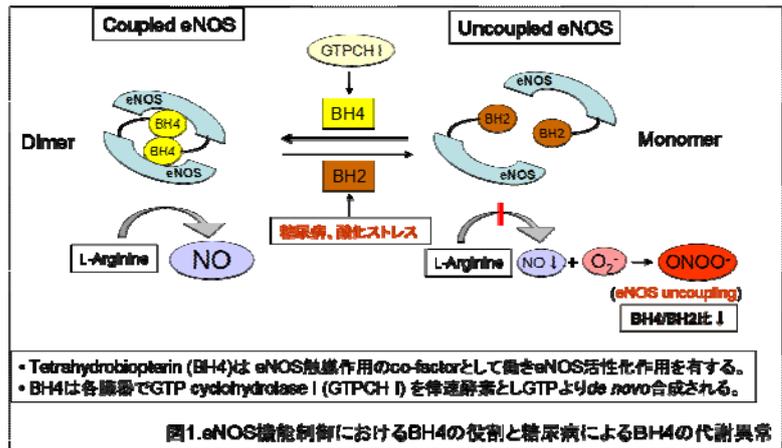
所 属	京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学
氏 名	藤田 義人
研究テーマ	新規 eNOS 機能制御因子の探索による糖尿病および合併症に対する統合的治療法の開発

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【研究の背景と目的】

2 型糖尿病患者人口は世界的に増加の一途をたどっており、食生活の変化や運動不足といった環境要因による肥満の助長やインスリン抵抗性の増悪が要因として挙げられる。日本においても 2 型糖尿病患者に占める肥満の合併頻度は飛躍的に増加している。肥満およびインスリン抵抗性は慢性炎症や酸化ストレスの原因となり、血管内皮機能障害をもたらす。この血管内皮機能障害には endothelial nitric oxide synthase(eNOS)の機能障害が関与することが知られている。その一方で、eNOS 機能障害自体がインスリン抵抗性や糖代謝異常を引き起こすことが注目されている。

我々は eNOS と糖代謝の関係について研究を継続して行っており、これまでにメトホルミンの血糖低下作用には eNOS が関与すること(Diabetologia, 2010)、eNOS の補酵素として機能し、eNOS 活性化作用を有するテトラヒドロピオプテリン(BH4)が肝臓糖新生の抑制作用、血糖低下作用、およびインスリン抵抗性改善作用をもたらすこと(Diabetes, 2013)を明らかにしてきた。肥満やインスリン抵抗性など酸化ストレス環境下では、BH4 の作用不足(BH4 の合成障害、BH4 の酸化による BH2 への転換)が起こり eNOS 機能障害の原因となり得る(図 1)。



また、糖尿病腎症の発症には eNOS 作用不足が関与することが eNOS 欠損マウスに高血糖を負荷したマウスモデルの解析により報告されている。BH4 は糖代謝異常、および糖尿病腎症など糖尿病合併症の病態形成に関与している可能性がある。本研究では BH4 欠乏モデルマウスを解析し、糖尿病および糖尿病合併症に対する治療法を開発することを目的とした。

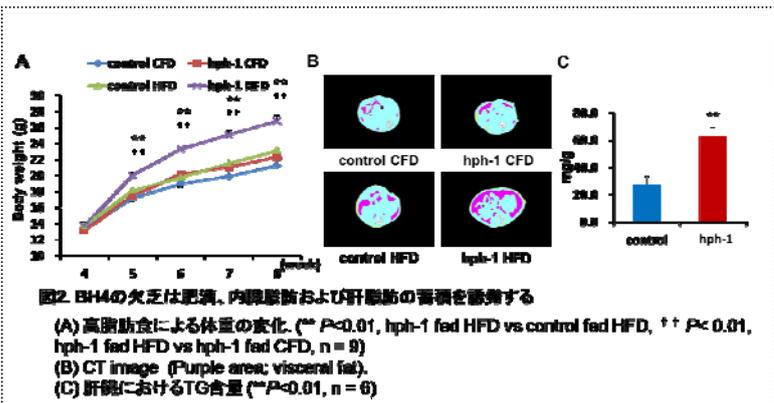
【研究方法】

BH4 の合成律速酵素である GTP cyclohydrolase I (GTPCH I) の発現が低下している BH4 欠乏マウスモデル(hph-1 マウス)を用いて糖・脂質・エネルギー代謝および腎臓に関する表現型を解析した。

【結果】

① BH4 の褐色脂肪組織(BAT)機能を介した糖・エネルギー代謝制御機構

hph-1 マウスおよびそのバックグラウンドマウスに通常食または高脂肪食負荷を行い、BAT 機能および糖・エネルギー代謝への影響について検討した。高脂肪食負荷により hph-1 マウスでは体重ならびに脂肪蓄積の顕著な増加が観察された。また、hph-1 マウスは耐糖能異常ならびにインスリン抵抗性を呈していた(図 2)。



目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

hph-1 マウスは深部体温およびエネルギー消費量の低下を認め、BATにおける脂肪蓄積、ミトコンドリア密度の低下に加え、脱共役タンパク質である UCP1 等の熱産生関連遺伝子発現の低下が観察された(図 3)。hph-1 マウスに対し BH4 を 10 日間連続で腹腔内投与することにより、深部体温の上昇ならびに耐糖能異常の改善が確認された。これらの結果により、BH4 の欠乏は BAT 機能障害および全身の代謝障害の病因となることが示された。

BH4 による全身の代謝制御機構に対し、BAT がどの程度役割を果たしているかどうかを明らかにするために、BAT 移植術による検討を行った。

BH4 欠乏マウス(hph-1 マウス)に BH4 正常マウス(バックグラウンドマウス)由来の BAT を移植したところ、BH4 欠乏マウス由来の BAT 移植と比較して、熱産生能の回復の程度が大きく、脂肪蓄積の減弱、耐糖能異常およびインスリン抵抗性の改善が顕著に認められた。さらに、BH4 正常マウス由来の BAT 移植により、肝臓における糖新生の亢進および脂肪蓄積が抑制された(図 4)。これらの結果より、BAT は BH4 による全身の代謝制御機構に中心的な役割を果たしていることが示された。

hph-1 マウスでは BAT における NA および NO 量の減弱が観察された。次に BH4 の褐色脂肪細胞に対する直接作用について検討した。単離褐色脂肪細胞に対し BH4 を曝露したところ、UCP1 等の遺伝子発現ならびに NO 産生量の増加を認めた。BH4 の曝露により酸素消費速度の上昇が観察され、脱共役作用の増大が認められた。BH4 による UCP1 等の活性化作用は、NOS 阻害剤により消失した。BH4 の投与により野生型マウスの BAT では NO 量が増加したが、血管内皮型 NOS(eNOS)欠損マウスの BAT では NO 量の増加が認められなかったことから、褐色脂肪細胞への直接作用については eNOS 由来の NO が関与することが示唆された

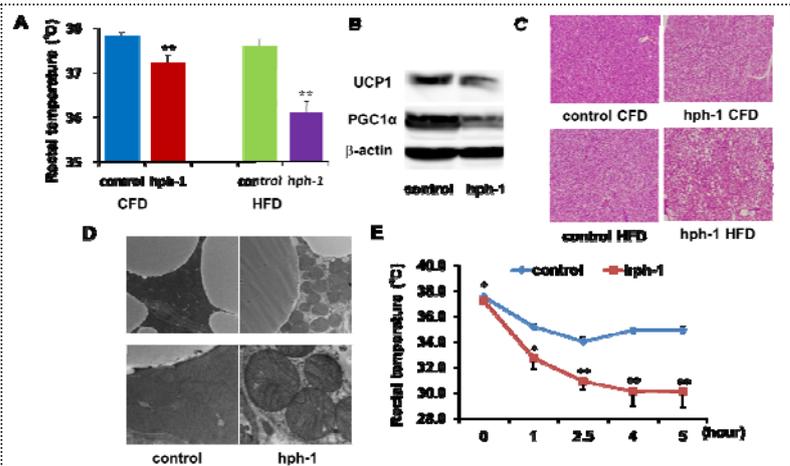


図3. BH4欠乏による褐色脂肪組織への影響

- (A) 熱産生(直腸温)。(***P<0.01, n=8-9)
- (B) brown adipose tissue (BAT)のミトコンドリア関連遺伝子発現。
- (C) BATの組織(HE staining)。
- (D) BATのミトコンドリア電子顕微鏡像。
- (E) Cold tolerance test (4°C下の直腸温)。(**P<0.05, ***P<0.01, n=6-7)

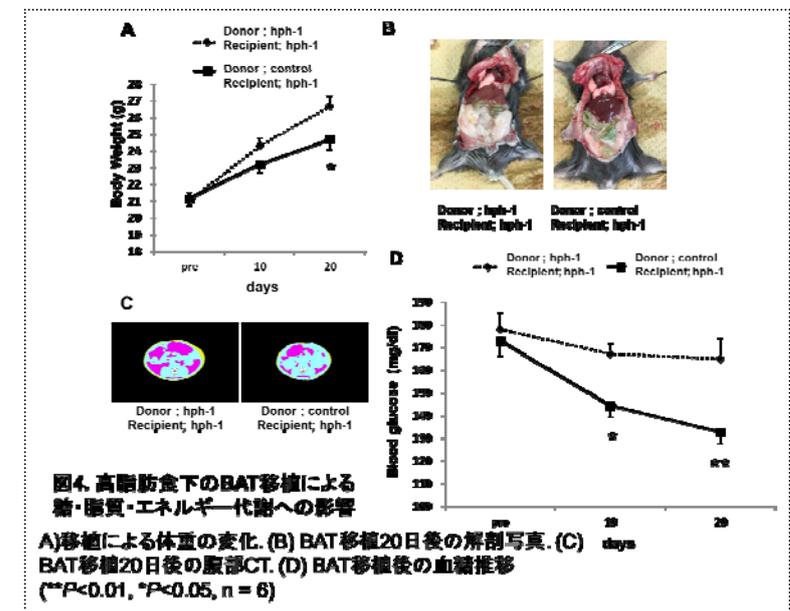


図4. 高脂肪食下のBAT移植による糖・脂質・エネルギー代謝への影響

- A)移植による体重の変化。(B) BAT移植20日後の解剖写真。(C) BAT移植20日後の腹部CT。(D) BAT移植後の血糖推移 (**P<0.01, *P<0.05, n=6)

テトラヒドロbiopterin (BH4) はチロシン水酸化酵素 (TH) や一酸化窒素合成酵素 (NOS) の酵素反応の補酵素として働く必須の共因子である。また、TH が合成に関与するノルアドレナリン(NA)や NO は褐色脂肪組織 (BAT) の主要な制御因子である。本研究により、BH4 は NA および NO に相互的に作用することにより BAT 機能を活性化し、全身の糖・エネルギー代謝を制御することが示された。

② BH4 の糖尿病腎症発症機序への関与の検討

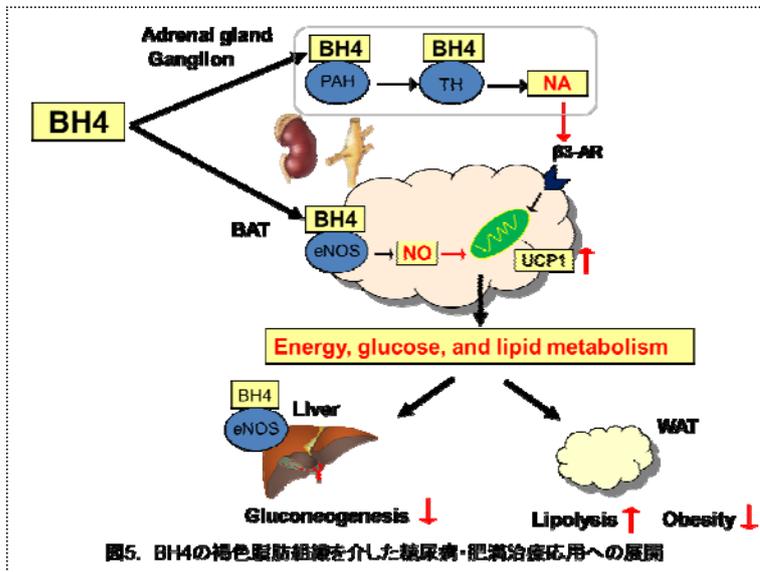
hph-1 マウスを用いて BH4 の糖尿病腎症発症機序への関与について検討した。hph-1 マウス、およびそのバックグラウンドマウスにストレプトゾトシンを投与し高血糖を惹起した。腎組織を光学および電子顕微鏡で観察し、アルブミン尿の定量を行った。hph-1 マウスでは尿アルブミンの増大を観察した。hph-1 マウスでは podocyte の足突起の癒合が認められた。尿細管の所見を電子顕微鏡を用いて評価したところ、高血糖負荷を行っていないマウス群では、顕著な差異は観察されなかったが、高血糖負荷

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

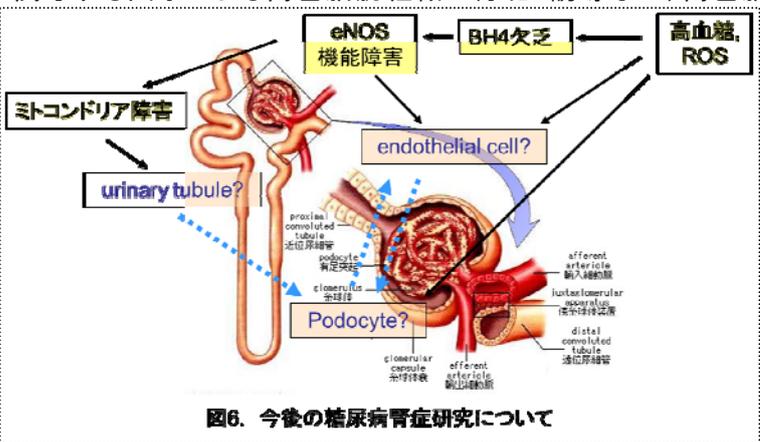
を行った hph-1 マウスでは、主に近位尿細管においてミトコンドリアのクリスタ構造の消失等の形態学的異常ならびにミトコンドリア密度の低下を認めた。また、BH4 関連物質について、糖尿病モデルマウスのアルブミン尿の増加抑制作用が認められた。以上の所見より、高血糖および BH4 の作用不足による eNOS 機能障害が糖尿病腎症、特に早期腎症の病態形成に關与する可能性が示された。

【結論・考察・今後の課題】

BH4 は BAT 機能を活性化し、全身のエネルギー・糖代謝を制御していることを明らかにした。BH4 は肥満症および糖尿病の治療標的となる可能性が示された(図 5)。また、また、高血糖、および BH4 の作用不足による eNOS 機能障害が相互的に糖尿病腎症の病態形成に關与する可能性が考えられた(図 6)。BH4 の補充が糖尿病腎症の発症・進展予防効果を有する可能性が示された。本研究により、BH4 が糖尿病・肥満症および糖尿病合併症の新規治療標的となり得ることが示された。



肥満は糖尿病・インスリン抵抗性の大きなリスク因子であり、肥満に対する新たな治療標的として褐色脂肪組織が注目されている。褐色脂肪組織の機能制御機構については近年大きな進展がみられるが、治療応用の開発にはいまだ至っていないのが現状である。本研究で実施した BAT 移植実験の所見は、BH4 が制御する褐色脂肪細胞機能が、糖・エネルギー代謝異常に大きな影響を及ぼしうることを強く示唆している。BH4、および BH4 が關与する因子による褐色脂肪組織の分化・誘導など、褐色脂肪組織の移植・再生医療への BH4 の応用が強く期待される。褐色脂肪組織の生活習慣病への治療応用の実現性を高めるためには、褐色脂肪組織の詳細な分化制御機構の解明や全身の糖・脂質およびエネルギー代謝を制御しうる褐色脂肪機能を活性化させる方法の開発が必要であり、基盤となる研究の進展が期待されている。本研究は、これらの基盤が確立される一助となることが期待できる。



hph-1 マウスに高血糖を負荷したところ、近位尿細管のミトコンドリアに大きな異常を来すことを我々は見出した。このミトコンドリアの所見は、褐色脂肪組織と同様のミトコンドリアの数の減少および形態異常であった。これまでの本研究の遂行により BH4 の糖代謝異常および糖尿病合併症の発症予防機序にはミトコンドリア機能が大きく關与している知見を得た。eNOS 由来の NO はミトコンドリア機能の維持に關与していることが報告されている(Proc Natl Acad Sci USA. 2004 101:16507-12)が、この機能を維持、回復させる方法は未だ確立していない。本研究をさらに発展させることにより、ミトコンドリア機能を介した糖尿病、肥満および糖尿病合併症に対する統合的治療法として、BH4 の有用性が確立することが期待できる。本研究計画の推進により、糖尿病腎症の発症予防効果に關与する因子の同定など現在の糖尿病診療における主要な課題の解決の糸口となる発見が想定され、血糖低下作用のみならず糖尿病血管合併症の発症・進展予防をターゲットとした新規因子の発見など糖尿病治療法の開発に寄与することが期待できる。

Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学
氏 名	藤田 義人

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Y. Oguri, <u>Y. Fujita</u> , A. Abudukadier, A. Ohashi, T. Goto, F. Furuya, A. Obara, T. Fukushima, N. Matsuo, M. Kim, M. Hosokawa, T. Kawada, H. Hasegawa, N. Inagaki. Tetrahydrobiopterin activates brown adipose tissue and regulates systemic energy metabolism. JCI Insight. 9: 91981. 1-19.2017. 査読有
2	<u>Y. Fujita</u> , N. Inagaki. Metformin: clinical topics and new mechanisms of action. Diabetol Int. 8: 4-6. 2017. 査読有
3	<u>Y. Fujita</u> , N. Inagaki. Metformin: New Preparations and Non-Glycemic Benefits. Curr Diab Rep. 17: 5. 2017. 査読有
4	A. Nishimura, SI. Harashima, <u>Y. Fujita</u> , D. Tanaka, Y. Wang, Y. Liu, N. Inagaki. Effects of structured testing versus routine testing of blood glucose in diabetes self-management: A randomized controlled trial. J Diabetes Complications. 31: 228-233. 2017. 査読有
5	Y. Kondo, N. Harada, A. Hamasaki, S. Kaneko, K. Yasuda, E. Ogawa, S. Harashima, H. Yoneda, <u>Y. Fujita</u> , N. Kitano, Y. Nakamura, F. Matsuo, M. Shinji, S. Hinotsu, T. Nakayama, N. Inagaki; MAIKO Study group. Sitagliptin monotherapy has better effect on insulinogenic index than glimepiride monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: a 52-week, multicenter, parallel-group randomized controlled trial. Diabetol Metab Syndr. 27: 8, 15. 2016. 査読有
② <論文 PDF 添付なし>	
1	
2	
3	

--	--

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2017年8月	第22回 日本肥満学会 アディポサイエンス・シンポジウム. 小栗靖生、藤田義人、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、松尾奈緒美、南野寛人、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也. テトラヒドロビオプテリンによる褐色脂肪組織の分化・誘導制御機構への関与の解明
2	2017年6月	American Diabetes Association 77th Scientific Sessions. Y. Oguri, Y. Fujita, A. Abudukadier, A. Ohashi, T. Goto, F. Furuya, A. Obara, T. Fukushima, N. Matsuo, M. Kim, M. Hosokawa, T. Kawada, H. Hasegawa, N. Inagaki. Tetrahydrobiopterin Activates Brown Adipose Tissue and Regulates Energy and Glucose Metabolism.
3	2017年5月	第60回 日本糖尿病学会年次学術集会. 小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdukadier、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、小原章央、福島徹、松尾奈緒、Kim Minji、細川雅也、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也. テトラヒドロビオプテリンは褐色脂肪制御機構に関与し全身の糖・エネルギー代謝を調節する
4	2017年5月	第4回 肝臓と糖尿病・代謝研究会. 古谷太志、藤田義人、松尾奈緒美、小栗靖生、池田香織、原島伸一、王宇、劉彦言、稲垣暢也. SGLT2 阻害薬投与及び低炭水化物食が与える糖尿病肥満モデル動物の肝臓の糖・脂質・エネルギー代謝への影響
5	2017年2月	第31回 日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会. 小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdukadier、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、小原章央、福島徹、松尾奈緒美、Kim Minji、細川雅也、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也. テトラヒドロビオプテリンによる褐色脂肪制御機構の解明
6	2017年1月	第20回 日本病態栄養学会年次学術集会. 小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdukadier、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、小原章央、福島徹、松尾奈緒美、Kim Minji、細川雅也、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也. テトラヒドロビオプテリンは褐色脂肪機能を活性化させ全身の糖・エネルギー代謝を制御する
7	2016年10月	第37回 日本肥満学会. 小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdukadier、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、小原章央、福島徹、松尾奈緒美、Kim Minji、細川雅也、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也. テトラヒドロビオプテリンは褐色脂肪機能を活性化させ、全身のエネルギー・糖代謝を制御する
8	2016年8月	第21回 日本肥満学会アディポサイエンス・シンポジウム. 小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdukadier、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、小原章央、福島徹、松尾奈緒美、Kim Minji、細川雅也、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也. テトラヒドロビオプテリンは褐色脂肪機能を活性化させ、全身の糖・エネルギー代謝を制御する
9	2016年5月	第59回 日本糖尿病学会年次学術集会. 藤田義人、小栗靖生、Abulizi Abdukadier、小原章央、大橋晶子、古谷太志、松尾奈緒美、福島徹、長谷川宏幸、細川雅也、稲垣暢也. テトラヒドロビオプテリンによる糖・脂質およびエネルギー代謝制御機構の解明

10	2016年5月	第59回日本糖尿病学会年次学術集会. 小栗靖生、藤田義人、古谷太志、松尾奈緒美、屋山勝俊、小原章央、Abulizi Abdukadier、大橋晶子、長谷川宏幸、鶴山竜昭、細川雅也、稲垣暢也. eNOS 補酵素テトラヒドロビオプテリンの糖尿病腎症発症機序への関与の解明
11	2016年5月	第59回日本糖尿病学会年次学術集会. 古谷太志、藤田義人、松尾奈緒美、小栗靖生、池田香織、劉彦言、王宇、原島伸一、稲垣暢也. 糖尿病肥満モデル動物に対する Pair feeding 条件下での SGLT2 阻害薬投与による代謝への影響

3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)

	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		