

研究助成 2017－生活習慣病領域－

研究成果報告書 <概要>

所 属	横浜市立大学大学院医学研究科 分子内分泌・糖尿病内科学
氏 名	奥山 朋子
研 究 テー マ	細胞外マトリックスタンパクを介したインスリン感受性制御機構の解明
研 究 テー マ (変更後)	研究テーマを大幅に変更した場合は最新のものを記載してください。

概要の構成は自由ですが、研究目的、研究手法、研究成果などを1ページでまとめてください。（図表、写真などの貼付を含む）なお、応募時の研究テーマ（研究計画・内容）を大幅に変更した場合には、研究成果報告書<概要>に①研究計画・内容を大幅に変更した理由、②変更後の計画を推進する意義を記載してください。

【背景・目的】

細胞外マトリックスの糖代謝制御への関与は不明である。我々は、臍島におけるグルコキナーゼの標的分子として細胞外マトリックスにおける弾性線維形成に必須の分泌タンパクである Fbln5 (Fbln5) を同定した。Fbln5 欠損マウス (Fbln5KO) の表現型を解析したところ、肥満の抑制および著明なインスリン感受性の亢進を示した。Fbln5 欠損マウスにおけるインスリン抵抗性改善および肥満抑制の責任臓器として、皮膚や血管が関与している可能性を見出しており、本研究では弾性線維を介したインスリン感受性制御機構の分子メカニズムを解明し、肥満・糖尿病治療における新たな治療標的を創出することを目的とする。Fbln5 欠損マウスのインスリン感受性改善機構や肥満抑制機構の解析を通じ、細胞外マトリックスの代謝における役割を明らかにし、組織の周辺環境の代謝制御における重要性を提唱する。

【方法】

Fbln5 欠損マウスの代謝表現型の解析により、細胞外マトリックスタンパクである Fbln5 の代謝調節機構における役割を明らかにし、さらに代謝変化に伴う Fbln5 の各臓器における発現制御機構を検討した。さらに臓器特異的 Fbln5 欠損マウス（臍β細胞、肝細胞、脂肪細胞）の樹立および Fbln5 発現アデノウイルスを用いた過剰発現実験により、Fbln5 を介した各臓器における代謝制御機構を検討した。

【研究成果】

Fbln5 欠損マウスでは通常食下において体重非依存性にインスリン感受性が亢進し、高脂肪食誘導性の肥満および高インスリン血症、インスリン抵抗性、脂肪肝ならびに脂肪細胞の肥大化が抑制された。通常食負荷マウスのグルコースクランプにて、Fbln5 欠損により肝臓をはじめ全身のインスリン感受性の亢進が示唆された。肝臓において Fbln5 欠損により PPARα や FGF21 の発現上昇を認め、肝臓のマイクロアレイ解析では Fbln5 欠損による脂肪酸酸化の亢進やミトコンドリア機能の改善が示唆された。一方で、primary hepatocyte における検討や *in vitro, in vivo* Fbln5 過剰発現、肝細胞特異的 Fbln5 欠損によってもインスリン感受性の変化や糖新生関連遺伝子発現の変化は生じなかったことから、肝細胞外の Fbln5 による臓器連関を介した肝のインスリン抵抗性・脂肪肝惹起機構が示唆された。

皮膚における脂肪酸代謝はエネルギー代謝や耐糖能に関与することが報告されているが、高脂肪食負荷により野生型マウスでは皮膚で脂肪酸代謝関連分子である SCD1, DGAT, PLA2 の発現が誘導されたのに対し、Fbln5 欠損マウスではこの誘導が欠如していた。同時に Fbln5 欠損マウスでは皮脂腺の萎縮を認め、寒冷刺激に対する感受性が亢進しており、熱産生機構の変化が示唆された。さらに我々は血管弾性線維にも着目し、Fbln5 欠損による血管におけるインスリン透過性の亢進を示唆する所見を得ている。

以上より、細胞外弾性線維関連タンパクである Fbln5 は皮膚や血管を介した臓器連関により、全身のインスリン感受性・エネルギー代謝機構を制御していることが示唆され、組織の周辺環境と各種代謝制御機構との相互作用を提唱する。

研究助成 2017－生活習慣病領域－

研究成果報告書 <詳細>

所 属	横浜市立大学大学院医学研究科 分子内分泌・糖尿病内科学
氏 名	奥山 朋子
研 究 テーマ	細胞外マトリックスタンパクを介したインスリン感受性制御機構の解明

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【目的】

細胞外マトリックスは全身の臓器に発現しており、細胞内のシグナル伝達機構や臓器連関を介した細胞外マトリックスによる代謝制御機構が精力的に報告されているものの、糖代謝制御への関与は不明である。我々は、膵島におけるグルコキナーゼの標的分子として細胞外マトリックスにおける弾性線維形成に必須の分泌タンパクである Fibulin-5 (Fbln5) を同定した。Fbln5 欠損マウスの表現型を解析したところ、肥満の抑制および著明なインスリン感受性の亢進を示した。我々は Fbln5 欠損マウスにおけるインスリン抵抗性改善および肥満抑制の責任臓器として、弾性線維に富む皮膚や血管が関与している可能性を見出している。本研究では弾性線維を介したインスリン感受性制御機構の分子メカニズムを解明し、肥満・糖尿病治療における新たな治療標的を創出することを目的とする。そして細胞外マトリックスの糖代謝における役割を明らかにし、組織周辺環境の代謝制御における重要性を提唱する。

【研究方法】

<1> Fbln5 欠損マウスの代謝に関する表現型解析

生後 8 週より 20 週間の通常食および高脂肪食負荷を行った Fbln5 欠損マウスの、体重・各代謝臓器・糖代謝の表現型の変化を解析し、Fbln5 の代謝制御機構における役割を検討した。

<2> Fbln5 の発現制御機構

各臓器における Fbln5 の発現制御を解析した。我々は単離膵島においてグルコキナーゼ活性化による Fbln5 の発現上昇およびその機構としてグルコースシグナルあるいはグルコキナーゼを介した発現制御機構を見出しており、(Okuyama T. et al. Sci Rep. 2017)、肝臓、脂肪組織、皮膚における発現変化を解析した。

<3> Fbln5 の各臓器における代謝制御機構

肝細胞株および高脂肪食負荷 Fbln5 欠損マウス・野生型マウスの primary hepatocyte におけるインスリンシグナルや糖新生関連遺伝子発現を解析した。また<2>における検討により、皮膚における Fbln5 の発現制御が代謝変化に重要な役割を果たしている可能性を想定し、Fbln5 欠損マウスの皮膚組織・脂肪酸組成を解析した。また Fbln5-floxed マウスおよび Alb-Cre マウス、Adipoq-Cre マウス、INS-1-Cre マウスを用いて肝細胞特異的、脂肪細胞特異的、膵β細胞特異的 Fbln5 欠損マウスを樹立し、各臓器における Fbln5 による代謝制御機構への関与を解明した。

【結果】

<1> Fbln5 欠損マウスの代謝に関する表現型解析

我々はこれまでに、Fbln5 欠損マウスでは通常食下において体重非依存性にインスリン感受性が亢進し、高脂肪食誘導性の肥満および高インスリン血症、インスリン抵抗性、脂肪肝ならびに脂肪細胞の肥大化が抑制されることを確認している (図 1)。また、Fbln5 欠損マウスの肝臓では、脂肪酸分解に関与する PPARα・FGF21・CPT-1 の発現上昇、脂肪酸合成および取り込みに関与する FAS・SCD-1・CD36 の発現低下を認め、ピルビン酸負荷による肝臓での糖新生も抑制され、肝におけるインスリン感受性改善が示唆された。各組織のインスリン感受性を解析するグルコースクランプでは Fbln5 欠損により全身のインスリン感受性の改善が

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

示唆された(図 2)。Fbln5 欠損マウスの表現型が皮膚特異的 SCD1 欠損マウスや DGAT 欠損と Fbln5 欠損マウスの表現型が酷似していることに着目し、皮膚における脂肪酸代謝関連分子の発現を評価したところ、高脂肪食負荷により野生型マウスでは皮膚で SCD1 や DGAT、PLA2 などの脂肪酸代謝関連分子の発現が誘導されたのに対し、Fbln5 欠損マウスではこの誘導が欠如していた(図 3)。また、Fbln5 欠損マウスでは皮脂腺の萎縮を認め、寒冷刺激に対する感受性の亢進を認めた。この際、褐色脂肪組織における熱産生関連遺伝子 (UCP-1、PGC1 α) の発現はむしろ亢進を認めたことから、Fbln5 欠損マウスにおいて皮膚を介したエネルギー代謝の変化が、インスリン感受性の亢進および肥満抑制に寄与している可能性が示唆された。

図 3. 皮膚における脂肪酸代謝関連分子の発現変化
(SC:通常食、HF:高脂肪食)

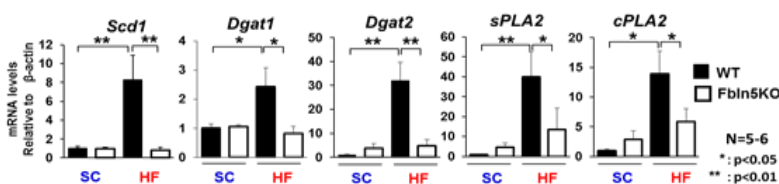


図 1. Fbln5 欠損マウスの各代謝臓器における表現型

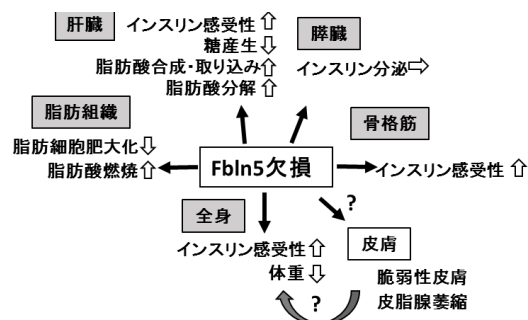


図 2. グルコスクランプによる解析

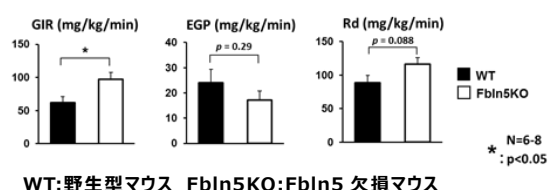
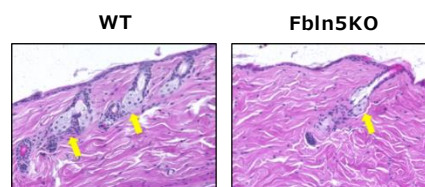


図 4. 高脂肪食負荷マウスの皮膚 H.E. 染色



矢印：皮脂腺

< 2 > Fbln5 の発現制御機構

我々は膵島においてグルコキナーゼ活性化薬により発現上昇する分子として Fbln5 を同定し、その発現がグルコース-カルシニューリン-NFAT 経路を介して制御されていることを同定した (Okuyama T. et al. Sci Rep. 2017)。一方で、通常食負荷マウスの肝臓において Fbln5 の発現は絶食時に上昇したが、高脂肪食負荷では上昇を認めなかった。さらに、皮膚における Fbln5 の発現は高脂肪食負荷により有意に上昇した。これらの所見より、Fbln5 の糖代謝機構への関与および多臓器における作用が示唆された。

< 3 > Fbln5 の各臓器における代謝制御機構

Fbln5 欠損における肝臓での表現型変化が顕著であったことから、primary hepatocyte を用いた検討および Fbln5 発現アデノウイルスを用いて *in vitro*, *in vivo* Fbln5 過剰発現実験を行った。Fbln5 過剰発現により、肝細胞株 (AML-12) における糖新生関連遺伝子発現およびインスリンシグナルに明らかな変化は認めず、また野生型マウスの肝における Fbln5 過剰発現によりインスリン感受性の増悪は明らかでなかった。さらに、肝細胞特異的 Fbln5 欠損マウスを樹立したところ、高脂肪食負荷によってもインスリン感受性の亢進や体重変化は明らかでなかったことから、Fbln5 欠損における肝でのインスリン感受性の改善や脂肪肝の抑制は臓器連関を介した作用あるいは肝細胞外の Fbln5 欠損による間接作用であると考えられた。高脂肪食負荷肝臓のマイクロアレイ解析では、Fbln5 欠損により接着分子としての作用の低下に加え、Fbln5 欠損による脂質分解やミトコンドリア機能の亢進が示唆された。同時に、脂肪細胞特異的 Fbln5 欠損マウスにおいてもインスリン感受性の亢進や体重変化は認めなかった。膵β細胞特異的 Fbln5 欠損マウスでは、インスリン分泌能の変化は明らかでなかったものの、膵β細胞増殖能の低下を認めた。Fbln5 の皮膚における代謝制御機構として、皮膚の脂肪酸組成の解析を行ったところ、Fbln5 欠損による一価不飽和脂肪酸の組成の変化は認めなかつ

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

たものの、皮膚における DGAT や PLA 2 の発現変化を認めていることから、中性脂肪含量などの変化が想定された。さらに、我々は弾性線維に富む血管の寄与についても検討した。下大静脈より FITC 標識したインスリンを投与し、投与直後の肝における取り込みを評価したところ、Fbln5 欠損マウスにおけるインスリンの血管透過性の有意な亢進を認め、インスリンシグナルも増強していた (図 5, 6)。これらの結果から、Fbln5 は皮膚におけるエネルギー代謝や血管におけるインスリン透過性の変化等の臓器連関を介して、全身のインスリン感受性およびエネルギー代謝の制御に作用していると考えられた。

【考察】

本研究結果より、弾性線維関連タンパクである Fbln5 の全身の代謝制御機構への関与が示唆された。Fbln5 欠損により肝をはじめとした全身のインスリン感受性亢進を認めたが、primary hepatocyte および肝細胞株における Fbln5 過剰発現、野生型マウス肝における Fbln5 過剰発現実験によってはインスリン感受性の変化は認めず、また肝細胞特異的 Fbln5 欠損マウスにおいてもインスリン感受性は変化しなかった。以上より、Fbln5 欠損による肝臓のインスリン感受性亢進は肝細胞外の Fbln5 欠損による作用であることが示唆された。脂肪細胞特異的 Fbln5 欠損マウスにおいてもインスリン感受性や体重の変化を来さなかったことから、脂肪組織を介したインスリン感受性の制御ではなく、他の機構を介することが示唆された。肝臓のマイクロアレイの解析結果により、Fbln5 欠損による肝臓における脂肪酸酸化の亢進、ミトコンドリア機能の亢進も示唆され、エネルギー代謝や体温変化を介した肝臓における代謝変化を支持する結果であると考えられた。Fbln5 は弾性線維が豊富な皮膚や血管に強く発現しており、Fbln5 欠損マウスは脆弱性皮膚を呈すること、高脂肪食負荷により皮膚 Fbln5 の発現上昇を認めたこと、Fbln5 欠損マウスでは寒冷刺激への感受性が亢進していたことから皮膚に着目した。Fbln5 欠損マウスの皮膚における脂肪酸代謝関連分子の発現変化や皮脂腺の萎縮が、体表からの熱・水分放出を変化させ、エネルギー代謝を介した体重増加抑制やインスリン感受性の改善に寄与していると考えられた。さらに、Fbln5 欠損マウスは血管脆弱性も呈することから、血管におけるインスリンの透過性を評価したところ、Fbln5 欠損によるインスリン透過性亢進・組織移行性の亢進を認めた。

これまで肝臓や筋・脂肪・血管内皮等がインスリン抵抗性を来す代表的な責任臓器として考えられてきたが、本研究の結果より、皮膚や血管の細胞外弾性線維を介した全身のインスリン感受性、エネルギー代謝制御機構の存在が示唆され、新たな代謝制御の責任臓器として重要であると考えられた。

【今後の課題】

Fbln5 欠損による皮膚表現型を介したエネルギー代謝の亢進が示唆された、Fbln5 欠損マウスにおける酸素消費量の測定を今後検討する。皮膚 Fbln5 の発現と皮膚表現型の関与について、今後 db/db マウス、ob/ob マウスを始めとした糖尿病モデルマウス皮膚における Fbln5 の発現や、ヒトへの発展として 2 型糖尿病や肥満の病態における皮膚の Fbln5 の発現解析を検討する。また、Fbln5 による皮膚における脂肪酸代謝関連分子の発現制御の分子機序を解明していくと同時に、皮膚の脂質組成をさらに詳細に検討していく。

さらに血管弾性線維によるインスリン透過性亢進の機構に関して、血管内皮や中膜、外膜のいずれの部位が寄与しているか、血管内皮特異的 Fbln5 欠損マウスの樹立などにより、今後詳細な機構を解析していく。

Fbln5 のインテグリンを介したシグナル伝達作用についても、代謝制御へ寄与している可能性があり、今後ウェスタンブロットなどによる発現解析を通じ病態への関与を検討する。

図 5. 肝臓における FITC 標識インスリンの取り込み

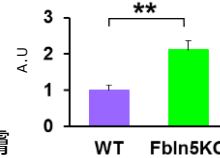
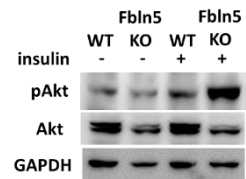


図 6. 肝臓におけるインスリンシグナル



研究助成 2017－生活習慣病領域－
研究成果報告書 <発表実績/予定一覧>

所 属	横浜市立大学大学院医学研究科 分子内分泌・糖尿病内科学
氏 名	奥山 朋子

1. 論文発表実績

- ・ 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	Inoue H, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, <u>Okuyama T</u> , Kyohara M, Tanaka Y, Orime K, Saisho Y, Yamada T, Shibue K, Kulkarni RN, Terauchi Y. Signaling between pancreatic β -cells and macrophages via S100 calcium-binding protein A8 exacerbates β -cell apoptosis and islet inflammation. <i>J Biol Chem</i> . 293(16):5934-5946, 2018. 査読有
2	Kyohara M, Shirakawa J, <u>Okuyama T</u> , Kimura A, Togashi Y, Tajima K, Hirano H, Terauchi Y.: Serum quantitative proteomic analysis reveals soluble EGFR to be a marker of insulin resistance in male mice and humans. <i>Endocrinology</i> . 158(12):4152-4164, 2017. 査読有
3	Tajima K, Shirakawa J, <u>Okuyama T</u> , Kyohara M, Yamazaki S, Togashi Y, Terauchi Y.: Effects of metformin on compensatory pancreatic β -cell hyperplasia in mice fed a high-fat diet. <i>Am J Physiol Endocrinol Metab</i> . 313(3):E367-E380, 2017. 査読有
4	Tajima K, Shirakawa J, Togashi Y, Yamazaki S, <u>Okuyama T</u> , Kyohara M, Konishi H, Terauchi Y.: Metabolic recovery of lipodystrophy, liver steatosis, and pancreatic β cell proliferation after the withdrawal of OSI-906. <i>Sci Rep</i> . 7(1):4119, 2017. 査読有
5	

② <論文 PDF 添付なし>

1	Konishi H, Shirakawa J, Tajima K, <u>Okuyama T</u> , Togashi Y, Takamine H, Kondo Y, Kunishita R, Terauchi Y. Effects of SGLT2 inhibition on eGFR and glomerular and tubular damage markers in Japanese patients with Type 2 diabetes. <i>J Endocrinol Metab</i> . 8(5):106-112, 2018. 査読有
2	
3	

2. 学会発表実績		
- 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	2019/6	79th American Diabetes Association Scientific Session, Tomoko Okuyama, Shirakawa Jun, Yasuo Terauchi, "Protective effects of linagliptin on hepatic steatosis in mice treated with dual inhibitor for insulin receptor and IGF-1 receptor" receptor
2	2019/5	第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会, 奥山朋子, 白川 純, 寺内康夫, 「インスリン/IGF-1 両受容体阻害による脂肪肝に対するリナグリプチンの保護作用」
3	2019/5	第 92 回日本内分泌学会学術総会, 奥山朋子, 白川 純, 寺内康夫, 「細胞外弾性線維による糖代謝制御機構の解明」 (YIA 奨励賞候補)
4	2019/4	第 56 回日本臨床分子医学会学術集会, 奥山朋子, 白川 純, 寺内康夫, 「細胞外マトリックス分子 Fibulin-5 による臓器連関と代謝制御機構の解明」 (YIA 奨励賞受賞)
5	2019/3	第 33 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 奥山朋子, 金滝聡一郎, 白川純, 寺内康夫, 「臍島における S100A8/A9 の発現制御機構の解析」
6	2018/8	Asia Islet Biology & Incretin Symposium 2018, Tomoko Okuyama, Jun Shirakawa, Yasuo Terauchi, "Protective effects of linagliptin on hepatic steatosis in mice treated with dual inhibitor for insulin receptor and IGF-1 receptor
7	2018/5	第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会, 奥山朋子, 白川 純, 寺内康夫, 「臍島における細胞外マトリックス蛋白 Fibulin-5 の発現制御機構および機能性の解析」
8	2018/3	第 32 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 奥山朋子, 白川純, 寺内康夫, 「臍島における Fibulin-5 の発現制御機構の解析」
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	2019/12	Cell Metabolism
2		
3		
4		
