

# インスリンシグナル伝達における ROS 作用の二面性のメカニズムの解明

杉森 慎 (医学部 医学科 3年)

指導教員

篁 俊成 (医薬保健研究域医学系 恒常性制御学講座 准教授)

## 1. 背景と研究目的

近年の食生活の欧米化、飽食、運動不足といったライフスタイルの変化を背景に、肥満者は増加し、糖尿病、高脂血症、高血圧などの症状が混在化した、いわゆるメタボリックシンドローム（内臓肥満症候群）が蔓延しつつある。平成 19 年度 国民健康・栄養調査によると、日本では 40 歳から 74 歳までの男性の約 2 人に 1 人、女性の 5 人に 1 人がメタボリックシンドロームに該当し、糖尿病が強く疑われる人（約 890 万人）や可能性を否定できない「予備群」（1320 万人）該当者は、10 年前の同調査の約 1.3 倍にあたる 2210 万人と推計され、増加の一途を辿っている(1)。また、メタボリックシンドロームはわが国の死因の第 1 位を占める動脈硬化性疾患（心筋梗塞、脳梗塞など）の大きな要因となることも指摘されている。

こうしたメタボリックシンドロームの根幹には「インスリン抵抗性」が存在する。生体はインスリンという膵臓から分泌されるホルモンの働きにより、骨格筋、脂肪組織へと糖を取り込み、また肝臓での糖産生を抑制することで高血糖状態を回避しているが、インスリン抵抗性とは、こうしたインスリンによる血糖降下作用が十分に発揮されない状態を指す。インスリン抵抗性が存在すると、膵臓β細胞機能が保たれている限りにおいては代償性の高インスリン血症が誘導され、この高インスリン血症が高血圧や高脂血症などメタボリックシンドロームを構成する種々の病態の発症、進展に寄与する。このような糖・脂質代謝異常、高血圧の共通の背景因子として存在するインスリン抵抗性はメタボリックシンドロームの中核をなす病態であり、主要な治療標的であると言える。

そして、肝臓におけるインスリン作用は他のインスリン標的組織にもまして、極めて重要である。エネルギー代謝の中核器官である肝臓は、蓄えたグリコーゲンを分解してグルコースとして循環血中へ放出する糖新生臓器であるだけでなく、生体内最大の脂質合成器官である故、肝臓におけるインスリン抵抗性は肝糖産生を亢進し、代償性高インスリン血症を引き起こし、さらにこの高インスリン血症により肝臓における脂質合成が亢進し、全身の脂質代謝異常を引き起こす。また肝臓は、消化管を通過し吸収された栄養分を豊富に含む門脈血が流入しており、過栄養状態に真っ先に曝される臓器であると言え、肥満、糖尿病病態において特徴的な脂肪肝（肝臓に中性脂肪が蓄積した状態）は、インスリン抵抗性と密接に関連した病態であることが明らかとなっており、本学医学系研究科恒常性制御学講座においても、肝の脂肪化が非アルコール性脂肪肝患者のインスリン抵抗性を予知する独立因子の 1 つであること、また、遺伝的に糖尿病肥満病態を形成する OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットを用いた研究により、肝臓の脂肪化がインスリン抵抗性と密接に関連すること(2)が明らかにされている。しかしながら、肝の脂肪化が代謝障害の原因なのか、あるいは結果なのかに関しては未だ明らかではない。

このような肝臓におけるインスリン抵抗性、脂肪肝、そして肥満を結びつける重要な因子のひとつとして FFA（遊離脂肪酸）が考えられる。門脈を介して肝臓に高濃度に流入した内臓脂肪由来の FFA は、脂肪肝を引き起こし、肝インスリン抵抗性を誘導する可能性があり、実際、高脂肪食負荷などの実験系により *in vivo* で高 FFA 血症が肝臓にインスリン抵抗性を誘導するメカニズムを検討した報告がいくつか存在する(3-7)。こうした *in vivo* 実験で得られるデータは生理的なものではあるが、先に述べた高血糖や代償性高インスリン血症といった高 FFA 血症に付随して生じる様々な生体反応を反映したものである。そこで、FFA が肝臓にインスリン抵抗性を誘導する直接的な作用機序を解明するため、申請者は、平成 20 年度本研究奨励費「インスリンシグナル伝達におけ ROS 作用機序」を受け、ラット由来培養肝細胞 H4 II EC3 に FFA 処置を行った、脂肪肝をモデルとした実験系において、インスリンシグナル伝達が障害されるメカニズムについて詳細な検討を行い、そ

の障害メカニズムがミトコンドリアにおける FFA 代謝亢進に伴う、電子伝達系由来の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) を介したものであることを明らかにしてきた(8)。

このように過剰な ROS によるインスリンシグナル障害作用が報告されている一方で、近年、生理的なレベルの ROS がインスリンシグナルを正に制御するということが明らかにされてきた。そこで、こうした ROS のインスリンシグナルにもたらす二面性の機序を解明するため、様々な条件の下 ROS を処置し、ROS のインスリンシグナルにもたらす影響を評価した。結果、ROS の処置濃度依存的なインスリンシグナルの増強・減弱現象の確認できる処置条件を見出すと共に、その二面性の生じる機序について詳細な検討を行った。

## 2. 研究方法

### ① 細胞株及び培養条件

#### i) 細胞株

細胞株としてラット肝癌由来細胞 H4IIEC3 を用いた。H4IIEC3 は正常肝細胞に近い糖脂質代謝能を有し、糖新生能および培養液中への糖放出能を有する数少ない細胞株の 1 つで、糖脂質代謝分野にて汎用されている細胞株である(9, 10)。

#### ii) 培養条件

培養液には 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin を含む Dulbecco' s Modification of Eagle' s Medium (DMEM) を用い、37°C、飽湿、5% CO<sub>2</sub>-incubator 内で培養を行った。

### ② 過酸化水素、インスリン処置方法

#### i) 過酸化水素処置

30% 過酸化水素を原液として用い、要時、10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DMEM を調整した後、10 倍希釈を繰り返し行って目的の濃度へと調整したものを処置培養液とし、6 well plate で 80~90% コンフルエントに培養した細胞に、37°C、飽湿、5 % CO<sub>2</sub>-incubator 内で所定時間の処置を行った。

なお、自己酸化還元反応により H<sub>2</sub>O と O<sub>2</sub> へと分解する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の濃度は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の定量法の一つであるチタン法を用いることにより、適宜確認を行った。

#### ii) インスリン処置

処置後、1 ng/mL の insulin を含む DMEM 培地を用い、37°C、飽湿、5 % CO<sub>2</sub>-incubator 内で 15 分間のインキュベーションを行った。

### ③ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の定量法 チタン法

96Well プレートにて、1M 硫酸チタン 30 μL、20% (W/V) 硫酸 50 μL、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 160 μL を加え、シェイカーで 10min 混和した後、波長 405nm で吸光度を測定し、モル吸光係数=750 を用いて H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度を算出した。

### ④ ウェスタンブロット法

#### i) サンプル調製

処置後培地を除去して冷 PBS で 1 回洗浄後、氷上で冷やした cell lysis buffer [RIPA Buffer, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail] を添加し、セルスクレイパーを用いて細胞を 1.5 mL チューブに回収、ソニケーション後、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清を回収した。

その後 BSA を標準タンパクとして、Lowry 法に従い DC protein assay kit を使用して定量し (11)、タンパク量の補正を行ったものをサンプルとした。

#### ii) ウェスタンブロッティング

i) で調製したサンプルに sample buffer solution を加え、95°C、5 分間加熱後に氷上で冷却、泳動用サンプルとした。泳動バッファー [25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1% SDS] にて 4-20 % gradient gel で、

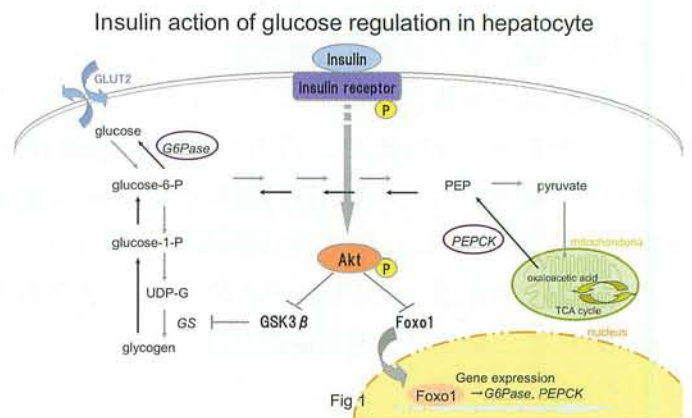
SDS-PAGE を行い、その後、バッファータンク転写装置により電氣的にタンパクを polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した (転写バッファ [25 mM Tris, 200 mM glycine, 20% methanol])。転写後 PVDF 膜を 5% スキムミルク溶液 [5% skim milk in Tris buffered saline-0.1% Tween-20 (TBS-T)] で室温にて 1 時間ブロッキングし、TBS-T にて 3 回洗浄後、各 1 次抗体をハイブリバッグを用いて 1 時間ハイブリダイゼーションさせ、再度 TBS-T で 3 回洗浄後に 5% スキムミルク溶液で室温にて 1 時間ブロッキングした。TBS-T にて 3 回洗浄後、2 次抗体を 30 分間ハイブリダイゼーションさせた。反応後 TBS-T で 3 回洗浄し、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents に PVDF 膜を浸し、生ずる化学発光を Luminescent Image Analyzer にて検出した。バンドの数値化は画像処理解析ソフト Scion Image を用いて行った。

#### ④PTP-1B の活性測定方法

処置後培地を除去して冷 PBS で 1 回洗浄後、氷上で冷やした cell lysis buffer [RIPA Buffer, protease inhibitor cocktail] を添加し、セルスクレイパーを用いて細胞を 1.5 mL チューブに回収、ソニケーション後、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清を回収したものをサンプルとし、Cyclex assay kit を用いて蛍光を測定した。その後、BSA を標準タンパクとして、Lowry 法に従い DC protein assay kit を使用して定量し (11)、蛍光強度の補正を行った。

### 3. 研究成果と考察

肝細胞内インスリンシグナル伝達については、次のようなメカニズムが知られている。インスリンが細胞膜上のインスリン受容体 (insulin receptor) へ結合すると、β サブユニットのチロシンキナーゼが活性化され、チロシン残基の自己リン酸化が生じ、活性化されたチロシンキナーゼによりインスリン受容体基質 (insulin receptor substrate: IRS) のチロシン残基がリン酸化を受ける (12)。なお、IRS には 4 つアイソフォームが存在し、筋肉、脂肪組織においては IRS-1、肝臓、膵臓においては IRS-2 がインスリンシグナルの伝達に重要とされている (13)。この IRS のチロシン残基のリン酸化を認識してホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3-K) が結合して活性化し、ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-トリスリン酸産生を介して下流のセリンスレオニンキナーゼである Akt をリン酸化、活性化する。この Akt はインスリン作用の分岐点であり、Akt が Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) や転写因子 forkhead transcription factor FKHR (FOXO-1)、mammalian target of rapamycin (mTOR) 等をリン酸化することによりインスリンの多様な作用が発揮される。GSK-3 はリン酸化を受けることで不活化、グリコーゲン合成酵素の抑制を解除し、また、転写因子である FOXO-1 はリン酸化を受けると核移行を阻害され、糖新生の律速酵素である PEPCK、G6Pase の発現が抑制されることが知られている (Fig1)。



そこで、H4IIEC3 培養肝細胞に様々な濃度・時間のもと H2O2 溶液を処置後、インスリン刺激を行い、Akt, GSK3 β のリン酸化レベルをウエスタンブロットティング法で評価することにより、H2O2 がインスリンシグナルにもたらす影響を検討した結果、メディウムで希釈した 0~100 μM の H2O2 溶液を計 3 時間処置することで、H2O2 の濃度依存的なインスリンシグナルの増強・減弱現象を見出した (Fig3)。なお処置した H2O2 は、電荷を持たないため細胞膜透過性が高く、また比較的、酸化力が穏やかで安定して存在し、還元されると H2O へと変化する活性酸素種として知られており、今回の実験系では、30 分ごとに新しい H2O2 溶液へと交換することにより細胞内の抗酸化物質による還元分を補い、一定レベルの H2O2 をメディウム中に維持出来るよう、モデリングを行った (Fig2, 3)。



また、同様の条件下で RNA を回収し、RT-PCR 法により、肝における糖新生に関わる遺伝子である PEPCK, G6Pase の遺伝子発現レベルを調べたところ、10, 30  $\mu$ M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置時には G6Pase の発現低下、50  $\mu$ M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置時には PEPCK, G6Pase の発現亢進が見られ、肝糖新生律速酵素の発現レベルにおいてもインスリン感受性の増強・減弱の二面性が確認された (Fig4)。

ROS によるインスリンシグナルを障害する機序としては、ストレス応答キナーゼ JNK (c-Jun N-terminal kinase) の存在が知られている (14)。近年、糖尿病や肥満病態における酸化ストレス亢進、酸化ストレスとインスリン抵抗性との関連性については数多く報告されており (15, 16)、その機序として、リン酸化 JNK が IRS-Ser をリン酸化し、IRS の立体構造を変化することにより、インスリンシグナルの伝達に必要な IRS-Tyr のリン酸化を阻害することが知られている。そこで同様の処置のもと、JNK のリン酸化レベルをウェスタンブロッティングにて確認したところ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液処置により濃度依存的な JNK のリン酸化亢進が確認され、JNK を介したインスリンシグナルの障害機序が示唆された (Fig3)。

このように過剰な ROS による細胞障害性が広く知られている一方で、近年、生理的なレベルの ROS が、生体内での細胞分化、細胞増殖、免疫反応、炎症反応などにおいて、生体が利用する一つの因子として機能していることが、Nox (NADPH オキシダーゼ) の研究により明らかになってきた (17)。そして、インスリンシグナル伝達時には、インスリン受容体において一過性に発生する ROS が、インスリン受容体のチロシン基の脱リン酸化酵素である PTP-1B (Protein Tyrosine Phosphatase-1B) の酵素活性を一時的に低下させることにより、インスリンシグナルを正に制御していることが明らかにされている (18, 19)。そこで同様の実験系において、インスリン受容体のリン酸化レベルをウェスタンブロッティング法により評価したところ、0 ~ 80  $\mu$ M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液処置時において、濃度依存的なリン酸化亢進が確認され、さらに、こうしたインスリン受容体のリン酸化レベルの亢進を説明する機序として、PTP-1B の活性を測定したところ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液の濃度依存的な活性低下が確認された (Fig5)。

## In vitro oxidative stress model

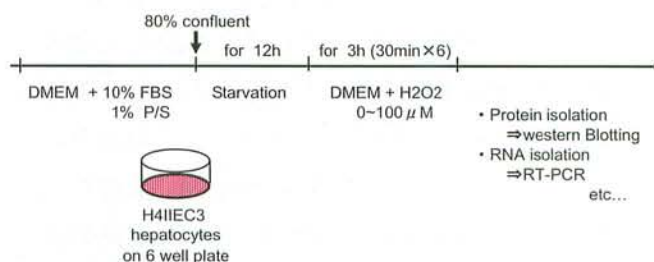


Fig 2

## Dual actions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on Akt and GSK phosphorylation

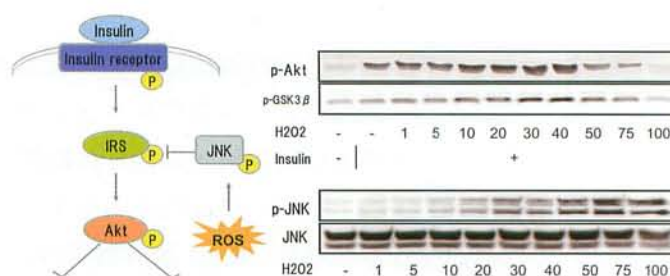


Fig 3

## Dual actions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on PEPCK and G6Pase expression

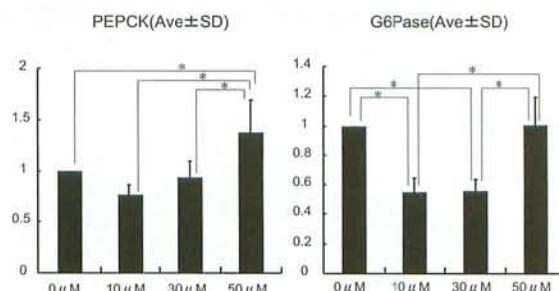


Fig 4

## ROS reduct PTP-1B activity and enhance IR phosphorylation

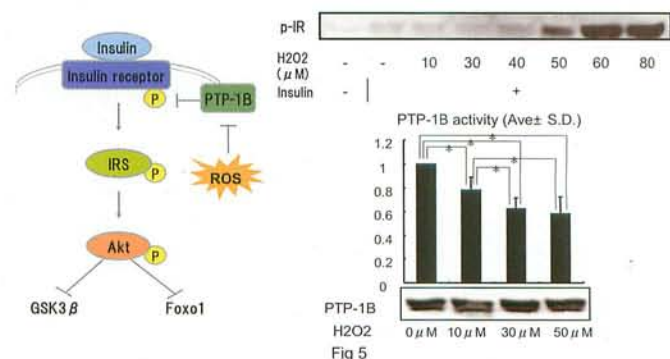
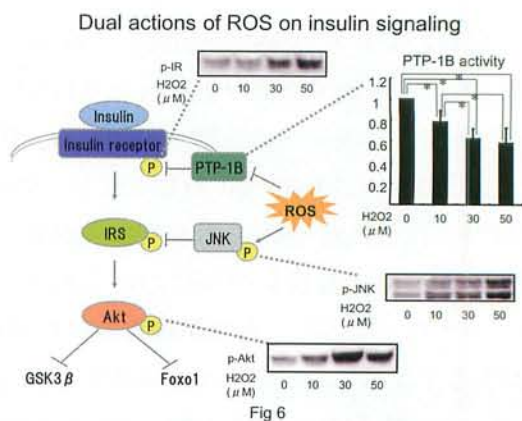


Fig 5

以上のことから、H2O2 溶液処置による Akt, GSK3 $\beta$  の濃度依存的なリン酸化レベルの増強・減弱現象は、インスリンシグナルに正に影響を及ぼす PTP-1B の活性低下と負に影響を及ぼす JNK のリン酸化亢進という、二面的な ROS 作用により生じたものであることが示唆された (Fig6)。これらのデータは、過剰な ROS を消去することによりインスリン抵抗性の改善を図る抗酸化薬の有効性を支持するだけでなく、温熱療法や運動療法といった ROS 発生を伴うとされる糖尿病治療の有効性の機序を説明するものであると考えられる。



#### 4. 結論

- ・ ラット由来 H4IIEC3 培養肝細胞に、様々な濃度・時間のもと H2O2 を処置後、インスリン刺激を行い、Akt, GSK3 $\beta$  のリン酸化レベルをウェスタンブロッティング法で評価することにより、インスリンシグナルにもたらす ROS 作用の検討を行った結果、0~100  $\mu$ M のメEDIUM で希釈した H2O2 溶液処置を計 3 時間行うことで、H2O2 の濃度依存的なインスリンシグナルの増強・減弱現象を見出した。
- ・ 詳細な検討を行った結果、H2O2 溶液処置時に見られた Akt, GSK3 $\beta$  における濃度依存的なリン酸化レベルの増強・減弱現象は、インスリンシグナルに正に影響を及ぼす PTP-1B の活性低下と負に影響を及ぼす JNK のリン酸化亢進という、二面的な ROS 作用により生じたものであることが示唆された。
- ・ 外因性の ROS が及ぼすインスリンシグナルの増強・減弱現象は、過剰な ROS を消去することによりインスリン抵抗性の改善を図る抗酸化薬の有効性を裏付けると同時に、温熱療法や運動療法といった ROS 発生を伴うとされる糖尿病治療の有効性の機序を説明するものであると考えられる。

## 参考論文

1. 厚生労働省 平成19年 国民健康・栄養調査.
2. Ota, T., Takamura, T., Kurita, S., Matsuzawa, N., Kita, Y., Uno, M., Akahori, H., Misu, H., Sakurai, M., Zen, Y., Nakanuma, Y., and Kaneko, S., Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis, *Gastroenterology*, *132*, 282 (2007).
3. Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Yamamoto, T., Nakagawa, Y., Takahashi, A., Suzuki, H., Sone, H., Toyoshima, H., Fukamizu, A., and Yamada, N., SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver, *Nat Cell Biol*, *6*, 351 (2004).
4. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L. H., and Hotamisligil, G. S., Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science*, *306*, 457 (2004).
5. Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., Xiang, X., Luo, Z., and Ruderman, N., Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- $\kappa$ B pathway in rat liver, *Diabetes*, *54*, 3458 (2005).
6. Lam, T. K., Yoshii, H., Haber, C. A., Bogdanovic, E., Lam, L., Fantus, I. G., and Giacca, A., Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C- $\delta$ , *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *283*, E682 (2002).
7. Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G. S., A central role for JNK in obesity and insulin resistance, *Nature*, *420*, 333 (2002).
8. 杉森 慎, 金子周一, 「インスリンシグナル伝達における ROS 作用機序」, 金沢大学学長研究奨励費研究成果論文集. (平成 20 年度) .
9. Zhou, H., Song, X., Briggs, M., Violland, B., Salsgiver, W., Gulve, E. A., and Luo, Y., Adiponectin represses gluconeogenesis independent of insulin in hepatocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, *338*, 793 (2005).
10. Barthel, A., Schmoll, D., Kruger, K. D., Bahrenberg, G., Walther, R., Roth, R. A., and Joost, H. G., Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells, *Biochem Biophys Res Commun*, *285*, 897 (2001).
11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, *193*, 265 (1951).
12. Saltiel, A. R., and Kahn, C. R., Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, *414*, 799 (2001).
13. Rother, K. I., Imai, Y., Caruso, M., Beguinot, F., Formisano, P., and Accili, D., Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes, *J Biol Chem*, *273*, 17491 (1998).
14. Kaneto, H., Kawamori, D., Nakatani, Y., Gorogawa, S., and Matsuoka, T. A., Oxidative stress and the JNK pathway as a potential therapeutic target for diabetes, *Drug News Perspect*, *17*, 447 (2004).
15. Houstis, N., Rosen, E. D., and Lander, E. S., Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance, *Nature*, *440*, 944 (2006).
16. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *J Clin Invest*, *114*, 1752 (2004).
17. Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, et al. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase, *Cell*, *113*, 343 (2003).
18. Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L., et al. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade, *J Biol Chem*, *276*, 21938 (2001)
19. Mahadev, K., Motoshima, H., Wu, X., Ruddy, JM., Arnold, RS., Cheng, G., Lambeth, JD., Goldstein, BJ., The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction, *Mol Cell Biol*, *24*, 1844 (2004)