

平成 22 年 4 月 12 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790629
研究課題名 (和文) ミトコンドリアバイオジェネシスを介した新規糖尿病治療法の探索

研究課題名 (英文) Exploring a new therapeutic approach against diabetes through mitochondrial biogenesis.

研究代表者

森野 勝太郎 (MORINO KATSUTARO)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：90444447

研究成果の概要：

インスリン抵抗性被検者ではミトコンドリア密度の低下があるにもかかわらず PGC-1 とその下流分子の mRNA 発現には低下を認めなかった。PGC-1 以外の因子によってミトコンドリア密度が調節されている可能性が示唆された事から、DNA micro array を行い PGC-1 以外のミトコンドリア関連遺伝子を検討し 252 遺伝子に有意な差を確認した。これらの遺伝子多くが機能未知である事から、培養細胞を用いて 252 遺伝子に対する siRNA を行いミトコンドリアバイオジェネシスに関与する遺伝子をスクリーニングし 4 つの新規遺伝子を同定した。これら 4 遺伝子中でも特に候補遺伝子 A が我々の被検者の骨格筋においても mRNA のみならず蛋白発現も約 50% に低下しており、骨格筋培養細胞において候補遺伝子 A を RNAi でノックダウンする事によりミトコンドリア密度の低下、ミトコンドリア蛋白の低下、ミトコンドリア機能の低下をきたす事が明らかとなった。これらの現象が in vivo でも再現されるかどうかを検討するために骨格筋特異的ノックアウトマウスを用いた検討を試み、ノックアウトマウスでは電子顕微鏡で観察したミトコンドリア密度が低下していることから、候補遺伝子 A が in vivo でもミトコンドリアを調節している可能性が想定される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：糖尿病学、ミトコンドリア、生活習慣病、インスリン抵抗性、骨格筋

1. 研究開始当初の背景

糖尿病発症において、極めて重要な役割を果たすと考えられるインスリン抵抗性は「インスリン標的臓器において生理的インスリン濃度による反応性の低下した状態」で定義される。骨格筋におけるインスリン抵抗性の発症機構として、骨格筋細胞内に蓄積した脂肪代謝物によるセリン・スレオニンリン酸化の亢進を介したインスリン受容体情報伝達経路の抑制が提唱されている。細胞内脂肪代謝物の蓄積は高脂肪食や運動不足といった環境因子に起因することは以前より知られていたが、近年ミトコンドリアによる酸化リン酸化の低下によって細胞内に脂肪が蓄積している可能性が示唆され、その分子機構解明が hot topic となっている (Petersen et al. Science 2003)。

2型糖尿病の家族歴を有する症例では核磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) を用いて測定した ATP 合成速度は約 30%低下していた(下図左: Petersen et al NEJM 2004)。そこで我々はミトコンドリア密度の低下がどのような機構により生じているかを明らかにするために、大腿四頭筋から筋生検を行い詳細な検討を行った。2型糖尿病の家族歴を有する若年非肥満インスリン抵抗性患者は約 37%ミトコンドリア密度が低いこと(下図右)、約 50%ミトコンドリア蛋白の発現が低下している事を発見した (Morino et al JCI 2005)。

PPAR γ coactivator-1(PGC-1)は寒冷により褐色脂肪細胞でミトコンドリアを増やす因子として発見され、他の転写因子と共同して Nuclear respiratory factor (NRF-1)、mitochondrial transcription factor A (mtTFA)等の転写を促進するミトコンドリアバイオジェネシスの key player と考えられている。近年、PGC-1 とその下流分子の遺伝子発現の異常が糖尿病患者や糖尿病を家族歴に持つ被検者で低下している事が報告されており、MRS で得たミトコンドリア機能異常とインスリン抵抗性の関連を支持する結果といえる(Patti, PNAS 2003, Mootha, Nature Genetics 2003)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ミトコンドリア機能・密度低下の分子機構に着目し、インスリン抵抗性の新たな予防・治療法を探求する事にある。以前の研究から糖尿病病態形成の要因であるインスリン抵抗性の発症機構の一つにミトコンドリア機能異常が示唆されているが、分子機構の解明には至っていない。ミトコンドリア密度低下を認めるインスリン抵抗性被検者に対し Gene chip を用いて検討したところ PPAR γ Coactivator-1(PGC-1)の遺伝子発現には差が無いものの 252 遺伝子に有意な

差を得た。我々の検討からは PGC-1 以外の経路の重要性が示唆された。RNAi を用いた遺伝子発現抑制によるミトコンドリア密度の網羅的スクリーニングにより 252 遺伝子の中から 4 遺伝子をミトコンドリア関連遺伝子として同定した (未発表)。これら 4 遺伝子のミトコンドリアバイオジェネシス制御機構を培養細胞・実験動物を用いた in vitro, in vivo の系で解明していく。また、食事由来の因子がミトコンドリアバイオジェネシスを制御している実験結果を得ていることから、これらの分子機構同定を通じてインスリン抵抗性の新たな治療法の開発に繋がりたいと考えている。

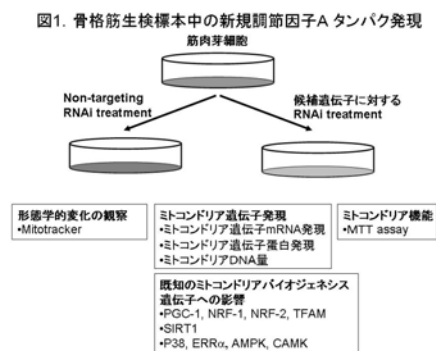
3. 研究の方法

L6 筋芽培養細胞に RNAi 試薬を遺伝子導入し以下の項目について検討する。

- ①形態学的変化: con-focal microscopy・電子顕微鏡
- ②遺伝子発現: RTqPCR
- ③蛋白発現: western blotting 法
- ④機能解析: MTT assay

ヒト筋生検標本中の遺伝子発現を RTqPCR および Western blot 法にて検討する。

骨格筋特異的新規調節因子 A ノックアウトマウスにおけるミトコンドリア密度を電子顕微鏡にて観察する。

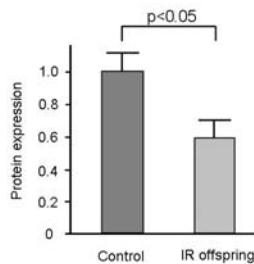


4. 研究成果

(1) 新規調節因子Aのインスリン抵抗性被検者での発現

新規調節因子Aのインスリン抵抗性被検者における発現は mRNA レベルで約 50%、蛋白レベルで約 40%低下していることが確認された (図2)。

図2. 骨格筋生検標本中の新規調節因子Aタンパク発現



(2) 培養細胞において新規調節因子AをRNAiによりノックダウンするとMTCOI、Porinのようなミトコンドリア蛋白質を減少させた(図3)。また、新規調節因子Aのノックダウンはミトコンドリアの酸化能を有意に低下させた (図4)。新規調節因子Aの発現低下がインスリン抵抗性被験者のミトコンドリア機能異常の原因の一つであることが示唆された。

図3. 新規調節因子Aに対するRNAiによるミトコンドリア蛋白質発現

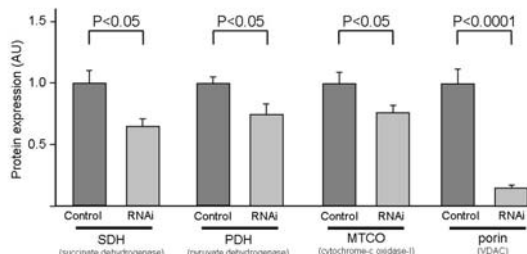
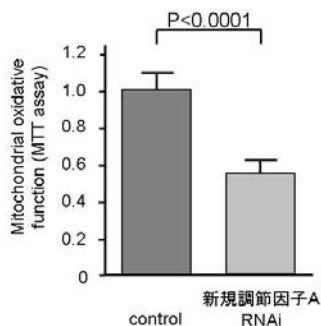


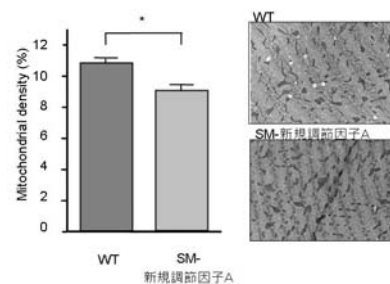
図4. ミトコンドリア酸化能 (MTT assay)



(3) 新規調節因子Aの In Vivo における役割

培養細胞で確認された効果と、ヒトで観察された現象が in vivo でも起りえるかについて検討するために、新規調節因子Aの骨格筋特異的ノックアウトマウスを用いて検討を行った。骨格筋のミトコンドリア密度を電子顕微鏡により観察した結果、骨格筋特異的新規調節因子Aノックアウトマウスのミトコンドリア密度は wild type と比較して約 18%低下していることが確認された (図5)。

図5. 骨格筋特異的調節因子Aノックアウトマウスのミトコンドリア密度



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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 森野勝太郎、PGC-1 の多彩な機能と糖・脂質代謝制御における意義 ヒト骨格筋インスリン抵抗性における PGC-1 の意義、内分泌・糖尿病、29、122-127、2009、査読なし
- ② 森野勝太郎、近藤慶子、柏木厚典、多価不飽和脂肪酸と疾患3 糖尿病、治療学、43、845-849、2009、査読なし
- ③ 森野勝太郎、ミトコンドリア機能異常とインスリン抵抗性、内分泌・糖尿病科、27、102-108、2008、査読なし

[学会発表] (計 1 件)

- ① 森野勝太郎、インスリン抵抗性被験者におけるミトコンドリア機能異常原因遺伝子の同定、日本内科学会、2009年4月12日、東京都

[図書] (計 2 件)

- ① 森野勝太郎、柏木厚典、羊土社、エネルギー消費調節 エネルギー代謝におけるミトコンドリアの役割 - インスリン抵抗性との関係、実験医学 肥満・糖尿病の病態を解明するエネルギー代謝の最前線、

- 27、60-66、2009
- ② 近藤慶子、森野勝太郎、柏木厚典、第5章 内臓脂肪の高蓄積がもたらす各種疾患のメカニズム、メタボリック症候群と栄養 81-101、2007

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed3/snai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森野 勝太郎 (MORINO KATSUTARO)
滋賀医科大学・医学部・医員
研究者番号：90444447

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：