

研究報告書

「血中インスリンの時間パターンによる恒常性維持機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 久保田 浩行

1. 研究のねらい

血中のほぼ全てのホルモンが特徴的な血中パターンを示し、そして、いくつかのホルモンにおいてはこれらの血中パターンがその作用に重要であることが報告されている。このようなホルモンの中で最も研究されているのがインスリンである。インスリンの血中パターンは複数からなり、これらのパターンがインスリンの恒常性維持に重要であることが報告されている。また、糖尿病患者では血中インスリンの時間パターンが健常者と異なることから、糖尿病の一因は血中インスリンパターン異常によるインスリン作用の恒常性維持機構の破綻であると考えられる。このように血中インスリンパターンの重要性は 30 年近くも前から認識されているが、その分子機構は未だ不明のままである。近年、我々は同じ分子でもその異なる時間パターンに異なる情報がコードできるという「時間情報コード」の概念を世界に先駆けて提唱し、実験と実験結果に基づいたモデルを作成することで研究を行っている。特に我々は、ラット肝がん由来の Fao 細胞と初代培養肝細胞を用いた研究から、インスリンがその時間パターンの情報を AKT というインスリンシグナル伝達経路のハブとなる分子に多重にコードし、下流の分子を選択的に制御できることを明らかにしてきた。また同様に、インスリンの時間パターンにより細胞内の代謝物も選択的に制御できることを見出してきた。このような研究を我々の生体に応用できれば、生体内における糖代謝や脂質代謝をインスリンの血中濃度をコントロールすることである程度制御可能になるのではないかと期待できる。例えば、食事方法による糖代謝や脂質代謝のゆるやかな調節や、糖尿病の予防や治療に応用できる可能性がある。しかし、培養細胞と生体内の応答は大きく異なることが予測され、生体内におけるインスリン作用が細胞と同様にインスリンの時間パターンによって制御されているかどうかは未だ不明のままである。そこで本研究では、インスリン作用臓器である肝臓と筋肉に注目し、血中インスリンパターンによって生体内のインスリンシグナル経路の分子が選択的に制御されているか、そしてそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。これにより、生体内における「時間パターン」の存在意義を明らかにし、今後のホルモンによる生体の恒常性維持機構の研究領域に「時間情報コード」という新たな着眼点を与えることを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

生体内での血中インスリンパターンの重要性を明らかにするためには、生体に出来るだけ近い条件で任意のインスリンパターンを投与する必要がある。通常、動物を用いた持続的なインスリン刺激では頸静脈からの注入が良く行われている。しかし本実験では、述べた通り、

血中インスリンパターンの重要性に着目しているため、頸静脈からのインスリン注入では目的に沿わない。そこでまず、SD ラットを用いて門脈(実際には門脈の少し上流の腸管膜静脈)からインスリン刺激を行う手法の開発を行った。刺激法の開発後、3 濃度(2, 6.7, 20 μ M)のインスリンを用いて 2 時間までの持続的な刺激を行い、任意の時間において肝臓と筋肉を採取した。その後、肝臓と筋肉からサンプル調製を行い、インスリンシグナル伝達経路の主要分子である IR, AKT, GSK3 β , FoxO1, S6K のタンパク質量とリン酸化量をウェスタンブロッティング法で測定した。また、G6Pase の発現量は qPCR 法で測定した。上記の時系列データの解析から、測定した分子の時間パターンが異なることが明らかになった。これらの結果は、生体内においても培養細胞と同様に血中インスリンの時間パターンが下流分子を選択的に制御していることを強く示唆している。特に S6K は、培養細胞の結果と同様に一過的なリン酸化パターンを示すことから、インスリンの時間変化にตอบสนองしていることが強く示唆された。そこで次に、これらの分子が実際にインスリン濃度や速度を検知しているかどうかを任意のインスリン刺激パターンを用いて検証した。その結果、実際にこれらの分子が血中インスリンの異なる時間パターンにตอบสนองしていることが明らかになった。これにより、生体内においてインスリンパターンによる細胞内分子の選択的制御が存在することを世界に先駆けて明らかにした。また、肝臓と筋肉では G6Pase の発現以外同じインスリンシグナル経路の分子を共有するにも関わらず、その応答が異なることが明らかになった。次に、これらの選択的応答のメカニズムを明らかにするために、上記で得られた実験データを再現する微分方程式モデルを作成した。その結果、これらの応答の違いがネットワーク構造の違いや、時定数や EC50 という酵素反応のパラメータの違いで生じていることが明らかになった。本研究により、血中インスリンパターンによる選択的制御の存在とそのメカニズムが明らかになっただけでなく、ホルモンの血中パターンによる選択的制御という新たな概念を提示することができた。

(2) 詳細

研究テーマ「ラット門脈へのインスリン刺激手法の開発」

生体においてインスリンは肝臓へと続く門脈に膵臓から分泌され、その 40%程度が肝臓で消費されると報告されている。その後、インスリンは筋肉を含む全身を巡り再び門脈に戻ってくる。つまり、生体内のインスリン応答を明らかにするには、通常行われている頸静脈からのインスリン刺激ではなく、門脈からのインスリン刺激が必須となる。そこで、本研究では麻酔下で門脈に繋がる腸管膜静脈からシリンジポンプを用いて任意のインスリン量を投与する手法を開発した(図1)。また同時に、血糖値の維持と内在性のインスリン分泌を抑制するため、頸静脈から任意量のグルコースと一定量のソマトスタチンを投与した。これにより、生体のインスリン分泌を模した、任意のインスリン投与可能な実験系を開発することができた。

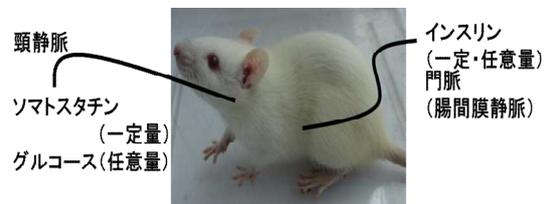


図1 門脈からのインスリン刺激手法

研究テーマ「健常ラットでの AKT 経路モデルの作成」

初めに、上記で確立した投与手法を用いて3濃度(2, 6.7, 20 μ M)のインスリンを用いて2時間までインスリンの持続的な刺激を行い、0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120minの時間において肝臓と筋肉を採取した(各点 n=3)。得られた臓器を用いてインスリンシグナル伝達経路の中心となる分子(IR, AKT, GSK3 β , Fox01, S6K)のタンパク質量とリン酸化量、肝臓においては *G6Pase* の発

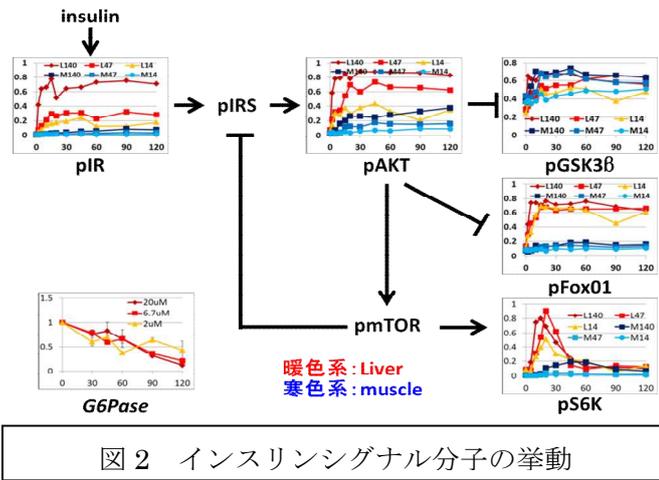


図2 インスリンシグナル分子の挙動

現量も測定した(図2)。その結果、図2に示す通り、測定した分子の時間パターンが異なることが明らかになった。特に、S6Kは培養細胞の結果と同様に一過的なリン酸化パターンを示すことから、インスリンの時間変化に反応していることが強く示唆された。また、肝臓と筋肉の定量的な比較から、筋肉におけるIRやFox01のリン酸化は肝臓に比べて著しく少ないことが明らかになった(図2)。これらの結果は、生体内においても血中インスリンの時間パターンにより下流分子を選択的に制御していることを強く示唆しているだけでなく、臓器によっても分子の応答(=戦略)が異なることを意味している。次に、測定した分子が実際にインスリン濃度や速度を検知しているかどうかを「ランプ刺激」と「2回のパルス刺激」を用いて検証した(図3)。

ランプ刺激は徐々に刺激濃度が上昇する刺激であり、速度変化が少ない刺激パターンである(図3上)。パルス刺激は急激に一過的な入力を加える刺激であり、さらにこれを2回繰り返すことで、インスリンの濃度変化に対する応答を観測できる刺激パターンである(図3下)。これらの刺激パターンによる実験の結果、S6Kのリン酸化はインスリンの濃度ではなく濃度変化に反応することが確認でき、生体内において血中インスリンの時間パターンによる下流分子の選択的制御の存在が明らかになった。次に、これらの応答のメカニズムを明らかにするために、実験データを再現する微分方程式モデルを作成した。モデルの構造は、以前作成した培養細胞でのモデルを参考にほぼ同様の構造を用いた。微分方程式モデルを作成することで、分子の応答を予測するだけでなく、応答の違いを生み出すシステムを定量的かつ客観的に比較することが出来る。モデル解析の結果、分子の応答の違いはネットワーク構造や、時定数やEC50という酵素反応のパラメータの違いが原因であることが明らかになった。さらに詳細な解析を行った結果、肝臓と筋肉において血中インスリンパターンの情報はAKTまでは比較的保存されて伝達されるが、AKTより下流には経路に応じて伝達される情報が異なることが明らかになった。これらの結果により、実際の臓器における細胞内の分子が選択的制御を受けているだけでなく、AKTといったシグナル伝達経路の「ハブ分子」まで出来るだけ多くの情報を伝達し、その後、下流の経路が必要な情報だけ抜き出しているという生命応答の精妙な制御機構の存在とメカニズムも明らかになった。

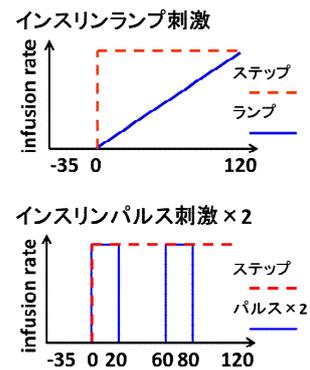


図3 刺激パターン

3. 今後の展開

インスリンの生体内での主要な役割は血糖値制御を含む代謝調節である。特に、血糖値においては、インスリンの一定刺激よりも15分程度の周期的刺激の方が効率的に血糖値を抑制できるとの報告がある。インスリンシグナル伝達経路における選択的制御の存在から、肝臓と筋肉の代謝も同様に、インスリンの時間パターンによって選択的に制御されていると考えられる。そこで、今後の展開として血中インスリンパターンにより肝臓と筋肉の代謝がどのように調節されているかを明らかにしたい。特に、インスリンから代謝物までのモデルが作成できれば、健常者または糖尿病(肥満)患者の効率的なインスリンによる血糖値制御のための基礎が明らかになると期待される。また、特徴的な分泌パターンを持つホルモンは数多くある。本研究から、これらのホルモンの血中パターンもその作用に重要であることが強く示唆された。よって今後は、ホルモンの血中パターンに注目した新規の視点からの研究領域が拓かれると期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

研究目的の達成状況、研究の進め方について

本研究の目的は「生体内におけるインスリンパターンによる選択的制御の存在の実証と、そのメカニズムの解明」である。進捗が遅れ論文での発表はもう少し時間がかかるが、上記で報告した通り、その目的は概ね達成された。進捗が遅れた理由として、勤務地の移動に伴う実験を行うことが出来ない期間があったことが挙げられる。この遅延を取り戻すべく、移動後、テクニカルスタッフを雇用するなど研究実施体制と予算執行の変更を行った。この研究実施体制の変更により、最終的な遅延は最小限に抑えられたと考えられる。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果について

分子の変動の時間パターンに情報がコードされるという考え方は近年注目されている。細胞レベルにおいては ERK の活性化パターンにより細胞の運命が決定されることが良く知られている。また、細胞間においても、神経細胞が他の神経からの入力パターンを処理することでその応答が決定される。しかし、ホルモンの血中パターンの意義とその分子メカニズム、つまり、臓器レベルでの時間パターンの重要性とそのメカニズムについては全く不明のままであった。本研究により、インスリンによる臓器レベルでの選択的応答とそのメカニズムが明らかになったことで、分子の変動の時間パターンに情報がコードされるという考え方が臓器レベルでも存在する、生物の一般的な概念であるという事が世界で初めて示された。今後、他の多くのホルモンにおいても「時間パターンによる選択的制御」という新たな研究領域が拓かれると期待される。また、生体内の細胞応答をモデル化した例は今までになく、外部からの刺激によって生体内の応答を(ある程度)任意にコントロールできたという点も非常に特筆すべきことである。このように、本研究の科学技術への波及効果は非常に大きいと考えられる。一方で、社会・経済への波及効果については今のところ直結するものはない。しかし、実験データとコンピュータシミュレーションを用いた効率的な創薬や任意のインスリン投薬による代謝制御へと繋がる基礎が構築されたことから、本研究を土台とした今後の波及効果のポテンシャルは高いと期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での

評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、インスリン作用臓器である肝臓と筋肉に注目し、血中インスリンパターンによるインスリンシグナル経路分子の選択的な制御と、そのメカニズムを明らかにすることを目的としている。生体のインスリン分泌を模して、麻酔ラットの門脈に繋がる腸管膜静脈からシリンジポンプを用いて投与する手法により、任意のインスリン投与可能な実験系を開発して検討された。その結果、インスリンの持続的な刺激、徐々に濃度が上昇する刺激やパルス刺激などの違いにより、肝臓と筋肉でのインスリンシグナル伝達経路の中心となる分子(IR, AKT, GSK3 β , FoxO1, S6K)をリン酸化量の時間パターンが異なることを明らかにし、これらの分子が選択的に制御されることを明らかにした。これらの応答のメカニズムを明らかにするために、実験データを再現する微分方程式モデルを作成し、分子の応答の違いがネットワーク構造や、時定数やEC50という酵素反応のパラメータの違いによることを明らかにした。これらの結果の論文での発表はもう少し時間がかかるようだが、着実に検討が進んでおり、本研究の完成が期待される。

さきがけ研究では、研究室の立ち上げによる研究計画の変更もあったが、研究を終了することができた。さきがけ研究期間内にさきがけ研究全体をまとめる論文の作成には至らなかったが、いくつか論文発表と学会発表を行った。領域会議では計算科学の視点から領域内の研究者とのディスカッションにより本領域のレベルアップに貢献した。さきがけの第二年次からは異動して教授に就任し、研究室を主宰することとなり、今後の活躍が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sano T., Kawata K., Ohno S., Yugi K., Kakuda H., Kubota H., Uda S., Fujii M., Kunida K., Hoshino D., Hatano A., Ito Y., Sato M., Suzuki Y., and Kuroda S.
Selective control of up-regulated and down-regulated genes by temporal patterns and doses of insulin., 2016, *Sci. Signal.*, 9(455): ra112
2. Yugu, K[†]., Hiroyuki, K[†]., et. al [†]co-first, Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data., 2014 *Cell. Rep.* 8, 1-13

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

第 18 回 Clinical Science club (招待講演)