シンポジウム

1 2 3

内科学の新たな視点における病態の理解 ～epigeneticsから臓器連関まで～

4) 肥満症の新たな視点—細胞内ストレス 応答系を活用した治療法開発

荒木 栄一¹⁾ 近藤 龍也¹⁾ 甲斐 広文²⁾

Key words メタボリックシンドローム, 糖尿病, ヒートショック蛋白, インスリン抵抗性, 慢性炎症

はじめに

肥満症とは、肥満に起因ないしは関連する健康障害を合併し、医学的に減量を必要とする病態をいい、疾患として取り扱う必要がある。肥満状態では、脂肪細胞や脂肪組織に浸潤したマクロファージ由来の液性因子や活性酸素種などを介し、酸化ストレスや小胞体ストレス、炎症性シグナルなどが誘導され、慢性の炎症やインスリン抵抗性を惹起し、メタボリックシンドロームや糖尿病、さらには動脈硬化症などの発症・進展に関与する。一方、生体には、小胞体ストレス応答経路や熱ショック応答(heat shock response: HSR)経路など、これらのストレスから細胞や組織を防御する仕組みが備わってい

る。熱などのストレスを介したHSR経路によって誘導される代表的な分子シャペロンheat shock protein (HSP) 72は、蛋白質の高次構造や超分子構造の形成や修復を担う。また、炎症性シグナルを伝達するc-Jun N-terminal kinase (JNK)やapoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1)と直接結合し、これらの活性を抑制する(図1)。本稿では、HSR経路の活性化を介して、肥満によるメタボリックシンドロームや糖尿病を治療しようとする試みを紹介する。

1. 肥満とメタボリックシンドローム、 2型糖尿病の関連

肥満症の発症には、特に内臓脂肪の蓄積が大

¹⁾熊本大学大学院生命科学研究部代謝内科学分野, ²⁾同 生命科学研究部遺伝子機能応用学分野

113th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine: Symposium: 3. Insight into the mechanism of diseases on new perspective arising in internal medicine: from epigenetics to organ associations; 4) Novel insight into obesity disease—Development of treatment employing the modulation of intracellular stress response pathways.

Eiichi Araki¹⁾, Tatsuya Kondo¹⁾ and Hirofumi Kai²⁾: ¹⁾Department of Metabolic Medicine, Faculty of Life Sciences, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Japan and ²⁾Department of Molecular Medicine, Faculty of Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Japan.

本講演は、平成28年4月17日(日)東京都・東京国際フォーラムにて行われた。

図1 内臓脂肪蓄積による生体内ストレス増加と生体におけるストレス応答経路
内臓脂肪の蓄積は、酸化ストレスや遊離脂肪酸の増加、アディポカインの産生異常、TNF- α などの炎症性サイトカイン分泌の増加などをもたらす。その結果、ASK1やJNKを代表とするストレスキナーゼが活性化される。活性化されたJNKはIRS-1のセリン残基のリン酸化を促進し、インスリンによるIRS-1のチロシンリン酸化が抑制され、インスリン抵抗性が惹起される。インスリン抵抗性はさらに慢性のストレス、炎症状態を増悪させ、肥満症が促進される。一方、生体には、小胞体ストレス応答経路や熱ショック応答（HSR）経路など、ストレスから細胞や組織を防御する仕組みが備わっている。HSR経路によって誘導されるHSP72は、タンパク質の高次構造や超分子構造の形成や修復を担う。またJNKやASK1と直接結合し、これらの活性を抑制する。

きな役割を果たすと考えられている。脂肪細胞から供給される遊離脂肪酸や種々のアディポカイン、あるいは脂肪組織に浸潤したマクロファージから分泌されるTNF（tumor necrosis factor）- α などの炎症性サイトカインは生体機能に影響を及ぼす。内臓脂肪の蓄積は、遊離脂肪酸の肝臓への供給増加、アディポカインの産生異常、TNF- α などの炎症性サイトカイン分泌の増加などをもたらす。また、脂肪組織における酸化ストレスの増加や後述するインスリン抵抗性の増悪を介した血糖や血圧の上昇を惹起し、さらに慢性のストレス、炎症状態を増悪させる。このようにして、メタボリックシンドロームや脂質異常症、2型糖尿病、高血圧あるいは動脈硬化症などの発症が促進される¹⁾。

インスリン作用は、インスリンがインスリン受容体（insulin receptor：IR）と結合し、その β サブユニットに存在するチロシンキナーゼを活

性化することによって伝達される。活性化されたチロシンキナーゼは、insulin receptor substrate (IRS)-1などの細胞内基質のチロシン残基のリン酸化を促し、このチロシン残基にシグナル伝達蛋白が結合して下流へとシグナルが伝達されていく。内臓脂肪の蓄積は、TNF- α などの炎症性のサイトカイン分泌を促進させ、その結果、ASK1やJNKを代表とするストレスキナーゼが活性化される。活性化されたJNKはIRS-1のセリン残基のリン酸化を促進し、このことによってインスリンによるIRS-1のチロシンリン酸化が抑制され、インスリン作用の減弱、すなわちインスリン抵抗性が惹起される²⁾（図1）。このようなインスリン抵抗性は、上記のごとく悪循環をもたらす、肥満による様々な疾患の発症を促す。

2. 熱ショック応答(HSR)経路活性化の機序

ストレス応答経路の中でも、HSR経路は古くから知られており、単細胞生物から脊椎動物まで保存されている、重要な生体防御機構である。生体が過剰な熱にさらされると、蛋白の変性が起こり、細胞障害が惹起される。このような熱などのストレスにより誘導され、蛋白の変性を修復し、細胞機能を維持する働きをもつ分子シャペロンとして同定されたのがHSPである。

実際には、熱以外にも様々な因子によってHSPの発現誘導が惹起されることが知られている。代表的なHSPであるHSP72の発現は、このような熱などのストレスによって転写因子heat shock factor (HSF)-1が活性化され、三量体となったHSF-1がHSP72遺伝子に存在する特異的配列HSE (heat shock element) に結合して転写レベルで誘導される。HSP72には、シャペロンとしての活性を持つATP結合部位 (ATP-binding domain) と、折りたたみの悪い蛋白を認識して結合するpeptide-binding domainが存在し、蛋白質の高次構造や超分子構造の形成や修復に関与する。また、JNKやその上流のASK1と直接結合し、これらの活性化を抑制することが知られている^{3,4)}。

3. 温熱と微弱電流の同時印可によるHSP72の誘導

1999年、Hooperらは1週間に6日、1回30分の温水浴を3週間継続後に、白人2型糖尿病患者の血糖コントロールが改善することを報告した⁵⁾。また、1回15分60℃のサウナを2週間継続すると、2型糖尿病患者の空腹時血糖値が改善することも報告されている⁶⁾。このような温熱による血糖改善効果の一部は、HSR経路を介している可能性がある。

著者らは、温熱と直流のパルス状微弱電流の組み合わせによって、効率的に細胞や生体内に

HSP72を誘導する方法を開発し、*in vitro*, *in vivo*においてその作用を解析した^{7~10)}。

*In vitro*の系において、温熱と特定のパルス幅で特定周期の直流電流の組み合わせ (mild electrical stimulation and thermo: MET療法) がHSP72蛋白を強く誘導すること、HSP72蛋白の誘導がインスリンによるAktの活性化を増強することを見出した^{7~9)}。また、高脂肪食を負荷した肥満2型糖尿病モデルマウスにおいて、MET療法が脂肪細胞を小型化し、内臓脂肪を減少させ、肝臓におけるインスリンシグナルを改善、耐糖能を改善することを確認した¹⁰⁾ (図2)。さらに、肥満と膵β細胞障害による糖尿病モデルであるdb/dbマウスにおいてMET療法は耐糖能の改善とともに、膵島におけるHSP72蛋白を誘導し、膵β細胞のインスリン含量を増加させ、β細胞機能の維持に重要な転写因子PDX-1の核局在を増加させ、アポトーシスシグナルを伝達するcleaved-caspase-3の発現を抑制するなど、膵β細胞の障害を減少させた¹¹⁾。

興味深いことに、HSP72を誘導することが知られている薬剤GGA (geranylgeranylacetone) を高脂肪食による肥満糖尿病モデルマウスに経口投与すると、肝臓においてHSP72蛋白の誘導が起こり、肝臓のJNKの活性化抑制と糖新生系酵素発現の抑制を認め、空腹時の血糖値とインスリン値が有意に抑制された¹²⁾。このように、MET療法以外のHSP72誘導法によっても耐糖能改善効果が確認された。

4. MET療法の臨床応用

まずMET療法の安全性を確認するために、10名の健常人男性において週2回、連続8週間のMET療法 (温度42℃、電圧1.4±0.1 V/cm、パルス幅0.1 msec, 55 pulse/sec, 30分) を施行した。その結果、MET療法は特別な有害事象を示さず、TNF-αやC-reactive protein (CRP) といった血中の炎症マーカーを有意に減少させた¹³⁾。

図2 温熱と微弱電流同時印加 (MET) 療法の高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスにおける効果

高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスにMET療法を施行すると、空腹時血糖値の改善 (A) と糖負荷試験時の血糖値の低下 (B)、およびインスリン抵抗性の改善 (C) を認める。さらに、内臓脂肪の減少と肝臓における中性脂肪蓄積の抑制 (D)、血中アディポネクチン低下の抑制 (E)、および肝臓におけるHSP72蛋白の誘導とリン酸化JNKの減少、ならびにインスリン刺激後のインスリン受容体チロシンリン酸化と下流のAkt活性化を認める (F)。

糖尿病モデルマウスで認められた内臓脂肪の減少効果を、腹部CT検査を用いて検証すると、MET治療期間中の減少傾向は認めたものの、有意な減少ではなかった。

次に、メタボリックシンドローム該当の日本人男性40名において、MET療法の効果を調べた。対象者を2群に分け、第1群は最初の12週間、週4回のMET療法 (温度42℃、電圧1.4±0.1 V/cm、パルス幅0.1 msec、55 pulse/sec、60分) にて治療を行い、残りの12週間はMET療法なしで生活習慣などを変えないように指導して観察した。第2群は、第1群と逆の順番で介入する、クロスオーバーの介入を行った。治療前、前半12週間の介入後、および後半12週間の介入後に採血や経口ブドウ糖負荷試験、腹部CT検

査による脂肪面積の計測を行った。

その結果、MET療法は内臓脂肪面積の有意な減少、収縮期/拡張期血圧の低下、空腹時の血糖値とインスリン値およびインスリン抵抗性の指標であるHOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance) の低下、TNF-αやCRP、白血球数などの血中炎症マーカーの減少をもたらした。一方、メタボリックシンドローム該当者では、介入前のHbA1c値が低いいためか、有意なHbA1c低下は認めなかった¹⁴⁾。

さらに、肥満を有する (BMI (body mass index) ≥25) の日本人2型糖尿病患者40名において、メタボリックシンドローム該当者と同じプロトコルでMET療法による介入を行った。肥満の2型糖尿病患者では、これらのメタボリッ

(図1 T. Kondo, et al : EBioMedicine 2014 より許諾を得て改変)

図3 温熱と微弱電流同時印加 (MET) 療法のヒト肥満2型糖尿病患者への介入試験

肥満男性2型糖尿病患者40名におけるMET療法の効果を示す。MET療法によって、内臓脂肪面積、空腹時血糖値、HOMA-IR、HbA1cの有意な減少を認めた (A)。MET療法によって末梢血単球のHSP72発現が亢進し、JNK活性が抑制され (B)、単球におけるNF-κBの核移行が抑制された (C)。

表 温熱と微弱電流同時印加 (MET) 療法の糖尿病モデルマウスおよび健常男性、メタボリックシンドローム (metabolic syndrome : MS) 該当男性、肥満2型糖尿病患者への効果 (まとめ)

方法	MET	GGA	MET	MET	MET
対象	糖尿病モデルマウス	健常男性	MS 男性	MS 男性	2 型糖尿病
・体重	→	↓	→	→	→
・内臓脂肪	↓	↓	→	↓	↓
・インスリン抵抗性	↓	↓	→	↓	↓
・JNK活性	↓ (肝臓)	↓ (肝臓)	N.D.	N.D.	↓ (末梢血単球)
・炎症性サイトカイン	↓	↓	↓	↓	↓
・β細胞傷害	↓	N.D.	→	?	?
・血糖値	↓	↓	→	↓	↓
・HbA1c	N.D.	N.D.	N.D.	→	↓

MET : mild electric stimulation and thermo, GGA : geranylgeranylacetone, N.D. : not done

クシンドローム該当者において認められた内臓脂肪減少効果，血圧低下，空腹時の血糖値とインスリン値およびHOMA-IRの低下，TNF- α やCRP，白血球数などの血中炎症マーカーの減少に加えて，有意なHbA1cの低下をもたらした．MET療法を行った患者の末梢血の単核球を単離して解析すると，MET療法前と比較してHSP72蛋白の発現増加とJNK活性の抑制，CRPやTNF- α mRNAの抑制が認められ，また炎症シグナルを伝達する転写因子NF- κ Bの核移行も抑制されており，生体内でのストレス抑制効果が示唆された（図3）¹⁴⁾．

おわりに

糖尿病モデル動物を用いた解析やヒト末梢血単球を用いた研究から，MET療法のインスリン抵抗性や耐糖能改善効果，慢性炎症の抑制効果の少なくとも一部はHSP72の発現誘導を介して

いると考えられた（表）．糖尿病患者では，HSP72蛋白の発現が低下しているとの報告もなされており^{15, 16)}，HSP72蛋白の発現を誘導するような方法は，糖尿病や慢性炎症を介して生じる様々な疾患の発症予防や病態進展阻止に有意義であると考えられる．

一方，MET療法の効果の一部が，HSP72誘導以外の経路を介していることも十分に想定される．他のHSPの関与，自律神経系を介した経路，あるいは熱などの物理的刺激を伝達することが知られているtransient receptor potential (TRP) channelを介した経路などがその候補として挙げられよう¹⁷⁾．詳細な機序の解明が，新たな生活習慣病の新規治療法開発につながることを期待したい．

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文献

- 1) Romeo GR, et al : Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation—mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32 : 1771–1776, 2012.
- 2) Hirosumi J, et al : A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420 : 333–336, 2002.
- 3) Morimoto RI, et al : The heat-shock response : regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem* 32 : 17–29, 1997.
- 4) Morimoto RI : Cells in stress : Transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259 : 1409–1410, 1993.
- 5) Hooper PL : Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341 : 924–925, 1999.
- 6) Biro S, et al : Clinical implications of thermal therapy in lifestyle-related diseases. *Exp Biol Med* (Maywood) 228 : 1245–1249, 2003.
- 7) Yano S, et al : Glucose uptake in rat skeletal muscle L6 cells is increased by low-intensity electrical current through the activation of the phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI-3K)/Akt pathway. *J Pharmacol Sci* 115 : 94–98, 2011.
- 8) Morino-Koga S, et al : Insulin receptor activation through its accumulation in lipid rafts by mild electrical stress. *J Cell Physiol* 228 : 439–446, 2013.
- 9) Morino S, et al : Mild electrical stimulation increases ubiquitinated proteins and Hsp72 in A549 cells via attenuation of proteasomal degradation. *J Pharmacol Sci* 108 : 222–226, 2008.
- 10) Morino, S, et al : Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates insulin resistance via enhanced insulin signaling. *PLoS One* 3 : e4068, 2008.
- 11) Kondo, T, et al : Hyperthermia with mild electrical stimulation protects pancreatic beta-cells from cell stresses and apoptosis. *Diabetes* 61 : 838–847, 2012.
- 12) Adachi H, et al : An acyclic polyisoprenoid derivative, geranylgeranylacetone protects against visceral adiposity and insulin resistance in high fat fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299 : E764–771, 2010.
- 13) Kondo, T, et al : Heat shock treatment with mild electrical stimulation safely reduced inflammatory markers in healthy male subjects. *Obes Res Clin Pract* 4 : e83–162, 2010.
- 14) Kondo T, et al : Mild Electrical Stimulation with Heat Shock Reduces Visceral Adiposity and Improves Metabolic Abnormalities in Subjects with Metabolic Syndrome or Type 2 Diabetes : Randomized Crossover Trials. *EBio-Medicine* 1 : 80–89, 2014.
- 15) Kurucz I, et al : Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes* 51 : 1102–1109, 2002.
- 16) Hooper, PL, et al : The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones* 19 : 447–464, 2014.
- 17) Moran MM, et al : Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10 : 601–620, 2011.