—Review for award—

インスリン抵抗性の新たな発症機序の解明 ～インスリン情報伝達系に対するスタチン及び TNF- α の影響～

高 栗 郷†

Elucidation of a New Mechanism of Onset of Insulin Resistance: Effects of Statins and Tumor Necrosis Factor- α on Insulin Signal Transduction

Akira Takaguri†

*Department of Pharmacology, Hokkaido Pharmaceutical University School of
Pharmacy; 7-Jo 15-4-1, Maeda, Teine-ku, Sapporo 006-8585, Japan.*

(Received May 28, 2018)

Impaired insulin signaling in adipose tissue and skeletal muscle causes insulin resistance associated with the development of type 2 diabetes. However, the molecular mechanisms underlying insulin resistance remain to be elucidated. In this review, we describe the current understanding of the effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins) and tumor necrosis factor (TNF)- α on insulin signal transduction in adipocytes. First, we determined that atorvastatin inhibits the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS)-1 through a decrease in the RhoA-Rho-kinase pathway, resulting in the inhibition of glucose uptake. Second, we found that TNF- α induces IRS-1 phosphorylation at serine residues 636/639 and inhibits the tyrosine phosphorylation of IRS-1 through the increase in both extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation. Interestingly, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, an AMP-activated protein kinase activator, suppresses TNF- α -induced IRS-1 serine phosphorylation at 636/639 and the phosphorylation of ERK by enhancing interactions between ERK and dual-specificity phosphatase-9. These results may be helpful in understanding the mechanisms underlying insulin resistance.

Key words—insulin resistance; adipocyte; insulin receptor substrate; statin; cytokine; AMP-activated protein kinase

1. はじめに

わが国の糖尿病人口は、食生活の欧米化と高齢化の影響により、年々増加しており、2016年の厚生労働省の国民健康・栄養調査によると、糖尿病と強く疑われる患者が初めて1千万人に上ったことが明らかとなった。また、世界における糖尿病人口は、2040年までに6億人に達するという見込みがある。¹⁾ そのため、人類の健康と福祉の観点から、糖尿病の克服は世界的な重要な課題となっている。

糖尿病患者の90%以上を占める2型糖尿病の発症には、インスリン抵抗性とインスリン分泌不全が深く関与している。^{2,3)} インスリン抵抗性とは、肥満

などが原因で、脂肪組織、骨格筋及び肝臓などの末梢のインスリンに対する感受性が低下した状態をさす。脂肪組織や骨格筋において、細胞におけるインスリン情報伝達系がなんらかの原因で障害されるとインスリン抵抗性が惹起され、その結果グルコース取込みが抑制される。その際、膵 β 細胞が代償的にインスリンを過分泌し（高インスリン血症）、インスリン抵抗性に打ち勝とうとするが、のちに膵 β 細胞が疲弊するため、インスリン分泌能が低下するインスリン分泌不全を引き起こす。⁴⁾ したがって、血中グルコース取込みを主に担う脂肪細胞及び骨格筋細胞におけるインスリン抵抗性の発症は、糖尿病の発症と進展に大きく寄与している。

筆者はこれまでに、糖尿病患者で合併する割合が高い脂質異常症の治療薬スタチン及び2型糖尿病や肥満で上昇がみられるサイトカインのインスリン情報伝達系に及ぼす影響について、主に脂肪細胞を用いて検討を行ってきた。本稿では、これら検討によ

北海道薬科大学薬理学分野（〒006-8585 札幌市手稲区前田7条15丁目4-1）

現所属：†北海道科学大学薬学部薬理学分野（〒006-8585 札幌市手稲区前田7条15丁目4-1）

e-mail: takira@hus.ac.jp

本総説は、平成29年度日本薬学会北海道支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

り得られた研究成果について概説する。

2. 脂肪・骨格筋細胞におけるインスリン抵抗性の発症機序

インスリンは、骨格筋・脂肪細胞膜上に存在するインスリン受容体に結合することで、最終的に血中から細胞内へのグルコース取込み作用を示す。

インスリンは、インスリン受容体に結合して、そのチロシンキナーゼを活性化することで、受容体自身のリン酸化（自己リン酸化）及び src homology (SH) 2 ドメインを有するインスリン受容体基質 (insulin receptor substrate; IRS) のチロシン残基のリン酸化を促す。次に、同じく SH2 ドメインを有するホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (phosphoinositide 3-kinase; PI3K) は、IRS-1 のチロシン残基にリクルートされて活性化する。活性化された PI3K は、ホスファチジルイノシトール 2 リン酸を 3 リン酸に変換する。この 3 リン酸に plexitrin homology (PH) 部位を持つホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ 1 (phosphoinositide-dependent kinase 1; PDK1) が結合し活性化され、続いて Akt の activation loop 内の 308 番目のトレオニン残基がリン酸化される。さらに、インスリンは、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質を介して、Akt の C 末端部位の 473 部位のセリン残基をリン酸化する。⁵⁻⁸⁾ 活性化された Akt は、Rab GTPase 活性化タンパク質である Akt substrate of 160 kDa (AS160) をリン酸化し、細胞内小胞輸送に関与する低分子量 G タンパク質 Rab の働きをオンにする結果、glucose transporter 4 (GLUT4) を含む小胞が細胞膜へ移行し、細胞内にグルコースが取込まれる。⁸⁾

脂肪・骨格筋におけるインスリン抵抗性は、上述したインスリン情報伝達系のいずれかが障害されることで惹起される。肥満者では、脂肪細胞の肥大化がみられ、そこから tumor necrosis factor (TNF)- α やレジスチンといったサイトカイン、遊離脂肪酸、さらには酸化ストレスや小胞体ストレスが惹起され、周囲の脂肪細胞や骨格筋、肝臓など全身の臓器に炎症やインスリン抵抗性を引き起こす。⁹⁻¹¹⁾ これらの因子は、IRS-1 のセリンリン酸化を促進することによって、インスリン受容体と IRS、あるいは IRS-1 と PI3K との相互作用を障害する。それを介在する分子として、c-jun N-terminal kinase (JNK)

や哺乳類ラパマイシン標的タンパク複合体 (mammalian target of rapamycin complex; mTORC) 及び extracellular signal-regulated kinase (ERK) などがその代表である。

さらに、最近の報告によると、肥大脂肪細胞から分泌される DNA 断片 (遊離 DNA 断片) がマクロファージに貪食される結果、マクロファージから TNF- α などの炎症性サイトカインの遊離が促進され、持続的な炎症が惹起されインスリン抵抗性を引き起こすという報告¹²⁾ や、IRS-1 と相互作用する 42-kDa cGMP-dependent protein kinase anchoring protein (GKAP42) が、インスリン情報伝達系の正常維持に重要であり、TNF- α による GKAP42 の発現減少がインスリン抵抗性の発症に関与することが報告されている。¹³⁾ このように、インスリン抵抗性の発症機序に関する新たな知見が増えてきている。

3. インスリン情報伝達系に及ぼすスタチンの影響

糖尿病患者は、脂質代謝異常をきたし易く、脂質異常症を合併していることが多い。そのため、糖尿病患者は、脂質異常症治療薬である 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬 (通称、スタチン) を服用する機会が多い。「スタチンは糖尿病発症リスクを上昇させるのか」という糖尿病患者へのスタチン投与の是非が積極的に議論されるようになったのは 2000 年代に入った頃からである。動物や細胞を用いた実験から、細胞内へのグルコース取込み能やインスリン分泌に対するスタチンの影響は、全く正反対の報告がなされていた。¹⁴⁻¹⁹⁾ 同時期に、筆者は、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病ラットを用いて、アトルバスタチンが耐糖能の悪化を引き起こすことを報告している。²⁰⁾

しかしながら、上記の研究も含めインスリン情報伝達系に対するスタチンの詳細な検討は行われていなかった。そこで、筆者は、グルコース取込みを担う脂肪細胞に着目して、インスリン情報伝達系に対するアトルバスタチンの影響を検討した。その結果、アトルバスタチンは、インスリンによる細胞内グルコース取込みを有意に抑制した。そこで、アトルバスタチンによるグルコース取込み抑制機序を明らかにするために、インスリン受容体以降のシグナル分子の活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、アトルバスタチンは、インスリンによるインス

Fig. 1. Schematic Representation of the Insulin Signal Transduction Impaired by Atorvastatin in 3T3L1 Adipocytes

Atorvastatin can easily enter cells and inhibits synthesis of geranylgeranyl phosphate through competition with HMG-CoA reductase, leading to dysfunction of RhoA and Rab4. RhoA and Rab4 inactivation caused by atorvastatin may disturb over-all insulin signal transduction including IRS-1 and Akt, resulting in a decrease in glucose uptake.

リン受容体のリン酸化に影響を及ぼさなかったが、受容体の下流分子である IRS-1 及び Akt のリン酸化を抑制した。このことから、アトルバスタチンはインスリンによる IRS-1 のチロシンリン酸化を抑制し、細胞内へのグルコース取込みを抑制することが示唆された。

次に、GLUT4 小胞の細胞膜への輸送に関与することが知られている低分子量 G タンパク質である Rab4 に着目して検討を行った。Rab4 の活性化には、メバロン酸から生合成されるファルネシルピロリン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸によるイソプレニル化（脂質修飾）を受け、細胞膜に局在することが不可欠である。スタチンは、HMG-CoA からメバロン酸への生合成を抑制する結果、細胞内情報伝達系に影響を及ぼすファルネシルピロリン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸の産生を低下させる。筆者の予想通り、アトルバスタチンは、Rab4 の細胞膜局在を減少させた。また、筆者は細胞骨格の制御や細胞遊走に係わる低分子量 G タンパク質 RhoA についても同様に検討を行い、アトルバスタチンは RhoA の細胞膜局在を減少させることを示した。興味深いことに、ドミナントネガティブ体 RhoA 及び Rho 標的タンパク質 Rho キナーゼ阻害剤の Y27632 処理により、インスリンによる IRS-1 のチロシン残基のリン酸化が抑制された。セリン/スレ

オニンキナーゼの Rho キナーゼによる IRS-1 のチロシンリン酸化抑制機構は不明であったが、他のグループから、Rho キナーゼは IRS-1 のセリンリン酸化を惹起してインスリン情報伝達系を正に調節することが示唆された。²¹⁾ このことは、IRS-1 のセリンリン酸化がかならずしもインスリン情報伝達系を負に調節しているとは限らないことを示している。以上の結果から、アトルバスタチンは、インスリン情報伝達系に係わる低分子量 G タンパク質の活性化を抑制することで、インスリンによる IRS-1 のチロシンリン酸化及び GLUT4 の細胞膜移行を抑制することが示唆された (Fig. 1).²²⁾

さらに、筆者は、骨格筋細胞を用いて、同様の検討を行った結果、脂肪細胞と同様の結果を得ている（データ未発表）。これまでの筆者の研究結果から、アトルバスタチンは、脂肪細胞や骨格筋細胞におけるインスリン抵抗性を惹起することで、細胞内へのグルコース取込みを抑制する結果、耐糖能を悪化させる、すなわち糖尿病の発症リスクを上昇させることが示唆された。

その後、2008 年に発表された JUPITER 研究、²³⁾ 2011 年の 5 つの大規模無作為試験のメタ解析の結果²⁴⁾から、スタチンが糖尿病の発症リスクを上昇させるという報告がなされた。これらの報告を受けて、2012 年に米国 Food and Drug Administration

Fig. 2. Schematic Representation of the Insulin Signal Transduction Impaired by TNF- α in 3T3L1 Adipocytes

TNF- α induces phosphorylation of IRS-1 at Ser 636/639 and inhibits tyrosine phosphorylation of IRS-1 through the both ERK and JNK phosphorylation. AMPK activator AICAR inhibits TNF- α -induced phosphorylation of IRS-1 at Ser 636/639 and phosphorylation of ERK through the increase in interaction between ERK and DUSP9/MKP-4.

(FDA) は、スタチンの添付文書に耐糖能悪化のリスクを載せるよう義務づけた。その後も、2013年に報告された120万人を超えるアイルランド人を対象とした一次予防試験、²⁵⁾ 2017年に報告された日本人を対象にした後ろ向きコホート研究によると、スタチンは糖尿病の発症リスクを1.9–2.6倍増加することが示された。²⁶⁾ これらの研究結果は、筆者が行ってきた基礎研究の結果と一致しており、スタチンによるインスリン抵抗性に伴う糖尿病の新規発症に注意を払い、糖尿病患者における脂質異常症の治療を行うことが求められる。

4. インスリンシグナル伝達系に及ぼす TNF- α の影響と AMPK による TNF- α 誘導性インスリン抵抗性の抑制機構

1996年、脂肪細胞から分泌される炎症性サイトカイン TNF- α は、IRS-1のセリンリン酸化を介してインスリンシグナルを抑制することが Hotamisligil らによって提唱された。²⁷⁾ すなわち、IRS-1のセリンリン酸化は、インスリンシグナルを正に制御する IRS-1 のチロシンリン酸化をネガティブフィードバック機構により抑制するという概念である。これまでに、IRS-1の307部位を始め、いくつものセリンリン酸化部位が同定されており、複数の分子により同一部位がリン酸化される場合や、同一

の刺激によりリン酸化が惹起されない部位などが存在する。例えば、307部位のセリンリン酸化は、インスリン、TNF- α 及び endothelin-1 などによりリン酸を受けるが、318や662といった部位はインスリンにのみリン酸化されることが報告されている。²⁸⁾

そこで、筆者は、307部位と同様、PI3Kとの結合に必要な IRS-1 の phosphotyrosine-binding domain (PTB) ドメインに位置する636/639部位のセリンリン酸化機構とそれを抑制する分子を探索するため、脂肪細胞を用いて検討した。その結果、3T3-L1脂肪細胞において、TNF- α は307部位のセリンリン酸化と同様、636/639部位のセリンリン酸化を惹起させ、IRS-1のチロシンリン酸化及びAktのリン酸化を抑制した。また、阻害剤を用いた実験から、TNF- α による IRS-1 のセリンリン酸化は、ERK 及び JNK のリン酸化を介していることが示された。次に、*db/db* マウスの脂肪組織を調べたところ、TNF- α の上昇と IRS-1 の636/639部位のセリンリン酸化が顕著に亢進していた。これらの結果から、脂肪細胞において、ERK 及び JNK を介する TNF- α 誘導性 IRS-1 の636/639部位のリン酸化は、インスリン情報伝達系を負に制御することが示唆された。

抗糖尿病薬メトホルミンや運動によって活性化される AMP-activated protein kinase (AMPK) は、Akt の直接の基質である AS160 のリン酸化を引き起こし、GLUT4 小胞の細胞膜移行を促進させることが知られている²⁹⁾が、IRS-1 のセリンリン酸化を引き起こすことも報告されている。これらの結果は、AMPK は AS160 より上流のインスリン情報伝達系に影響を及ぼすことを示唆するものである。そこで、筆者は、AMPK の活性化が TNF- α による IRS-1 の 636/639 部位のセリンリン酸化に及ぼす影響を検討した。その結果、AMPK 活性化剤 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) は、TNF- α による IRS-1 の 636/639 部位のセリンリン酸化を有意に抑制した。さらに、*db/db* マウスに AICAR を腹腔内投与すると、脂肪組織の IRS-1 の 636/639 部位のセリンリン酸化を有意に抑制した。これらの結果から、活性化された AMPK は、TNF- α に誘導される IRS-1 のセリンリン酸化を抑制し、インスリン抵抗性を解除することが示唆される。そこで、AMPK の活性化による 636/639 部位のリン酸化抑制機構を検討したところ、AICAR は、TNF- α による ERK のリン酸化を有意に抑制することを見い出した。脂肪細胞における ERK の脱リン酸化は、protein phosphatase 2A (PP2A) や dual-specificity phosphatase (DUSP)9/MKP-4 によって制御されることから、AICAR がこれらの脱リン酸化酵素に影響を及ぼすのかを検討した。その結果、AICAR は、PP2A や DUSP9/MKP-4 の発現を増加させなかった。さらに、PP2A 阻害薬であるオカダ酸存在下においても、AICAR は TNF- α による IRS-1 の 636/639 部位のセリンリン酸化を抑制したことから、PP2A は AICAR による ERK の脱リン酸化に関与しないことが示唆された。DUSP9/MKP-4 と ERK の相互作用の増強が、ERK の脱リン酸化を引き起こすことが知られている。筆者は、AICAR が DUSP9/MKP-4 と ERK の相互作用を増強するのかを免疫沈降法により検討した結果、AICAR は DUSP9/MKP-4 と ERK の相互作用を増強させた。以上の結果から、AMPK 活性化剤 AICAR は、DUSP4/MKP-4 と ERK との相互作用を増強させる結果、ERK の活性化を抑制することで、TNF- α による IRS-1 のセリンリン酸化を抑制、すなわちインスリ

ン抵抗性の惹起を抑制することを初めて明らかにした (Fig. 2)。³⁰⁾ AMPK はインスリン情報伝達系の様々な分子に作用し、グルコース取込みを担う細胞のインスリン抵抗性の改善に有用な分子であることが示された。

5. おわりに

本稿では、脂肪細胞におけるインスリン情報伝達系に対する脂質異常症治療薬スタチンと炎症性サイトカイン TNF- α の影響を検討し、その成果を紹介した。薬物や生理活性物質に惹起されるインスリン抵抗性の発症機序は、いまだ不明な点も多く、糖尿病の克服のためには今後の更なる研究が必要である。

謝辞 本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金、北海道薬科大学研究奨励費の助成を受けて実施したものであり、ここに感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) International Diabetes Federation (IDF), "Diabetes Atlas," 7th ed., IDF, Brussels, 2015.
- 2) Kahn S. E., Hull R. L., Utzschneider K. M., *Nature*, **14**, 840–846 (2006).
- 3) Weyer C., Bogardus C., Mott D. M., Pratley R. E., *J. Clin. Invest.*, **104**, 787–794 (1999).
- 4) Stern M. P., Haffner S. M., *Arteriosclerosis*, **6**, 123–130 (1986).
- 5) Holman G. D., Kasuga M., *Diabetologia*, **40**, 991–1003 (1997).
- 6) Czech M. P., Corvera S., *J. Biol. Chem.*, **274**, 1865–1868 (1999).
- 7) Hresko R. C., Mueckler M., *J. Biol. Chem.*, **280**, 40406–40416 (2005).
- 8) Leto D., Saltiel A. R., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 383–396 (2012).
- 9) Okuno A., Tamemoto H., Tobe K., Ueki K., Mori Y., Iwamoto K., Umesono K., Akanuma Y., Fujiwara T., Horikoshi H., Yazaki Y., Kadowaki T., *J. Clin. Invest.*, **101**, 354–361 (1998).
- 10) Yamauchi T., Kamon J., Waki H., Murakami K., Motojima K., Komeda K., Ide T., Kubota N., Terauchi Y., Tobe K., Miki H., Tsuchida A., Akanuma Y., Nagai R., Kimura S.,

- Kadowaki T., *J. Biol. Chem.*, **276**, 41245–41254 (2001).
- 11) Guo Q., Xu L., Li H., Sun H., Liu J., Wu S., Zhou B., *Lipids Health Dis.*, **16**, 25 (2017).
- 12) Nishimoto S., Fukuda D., Higashikuni Y., Tanaka K., Hirata Y., Murata C., Kim-Kaneyama J. R., Sato F., Bando M., Yagi S., Soeki T., Hayashi T., Imoto I., Sakaue H., Shimabukuro M., Sata M., *Sci. Adv.*, **2**, e1501332 (2016).
- 13) Ando Y., Shinozawa Y., Iijima Y., Yu B. C., Sone M., Ooi Y., Watanaka Y., Chida K., Hakuno F., Takahashi S., *J. Biol. Chem.*, **290**, 5881–5892 (2015).
- 14) Paniagua J. A., López-Miranda J., Escribano A., Berral F. J., Marin C., Bravo D., Paz-Rojas E., Gómez P., Barcos M., Moreno J. A., Pérez-Jimenez F., *Diabetes*, **51**, 2596–2603 (2002).
- 15) Rydgren T., Vaarala O., Sandler S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **323**, 180–185 (2007).
- 16) Suzuki M., Kakuta H., Takahashi A., Shimano H., Tada-Iida K., Yokoo T., Kihara R., Yamada N., *J. Atheroscler. Thromb.*, **12**, 77–84 (2005).
- 17) Wong V., Stavar L., Szeto L., Uffelman K., Wang C. H., Fantus I. G., Lewis G. F., *Atherosclerosis*, **184**, 348–355 (2006).
- 18) McGuire T. F., Xu X. Q., Corey S. J., Romero G. G., Sebtí S. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 399–406 (1994).
- 19) Yada T., Nakata M., Shiraishi T., Kakei M., *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 1205–1213 (1999).
- 20) Kanda M., Satoh K., Ichihara K., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1681–1684 (2003).
- 21) Furukawa N., Ongusaha P., Jahng W. J., Araki K., Choi C. S., Kim H. J., Lee Y. H., Kaibuchi K., Kahn B. B., Masuzaki H., Kim J. K., Lee S. W., Kim Y. B., *Cell Metab.*, **2**, 119–129 (2005).
- 22) Takaguri A., Satoh K., Itagaki M., Tokumitsu Y., Ichihara K., *J. Pharmacol. Sci.*, **107**, 80–89 (2008).
- 23) Ridker P. M., Danielson E., Fonseca F. A., Genest J., Gotto A. M. Jr., Kastelein J. J., Koenig W., Libby P., Lorenzatti A. J., MacFadyen J. G., Nordestgaard B. G., Shepherd J., Willerson J. T., Glynn R. J., JUPITER Study Group, *N. Engl. J. Med.*, **359**, 2195–2207 (2008).
- 24) Preiss D., Seshasai S. R., Welsh P., Murphy S. A., Ho J. E., Waters D. D., DeMicco D. A., Barter P., Cannon C. P., Sabatine M. S., Braunwald E., Kastelein J. J., de Lemos J. A., Blazing M. A., Pedersen T. R., Tikkanen M. J., Sattar N., Ray K. K., *JAMA*, **305**, 2556–2564 (2011).
- 25) Zaharan N. L., Williams D., Bennett K., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **75**, 1118–1124 (2013).
- 26) Kato S., Miura M., *J. Clin. Pharm. Ther.*, **43**, 536–542 (2018).
- 27) Hotamisligil G. S., Peraldi P., Budavari A., Ellis R., White M. F., Spiegelman B. M., *Science*, **271**, 665–668 (1996).
- 28) Morino K., Petersen K. F., Shulman G. I., *Diabetes*, **2**, S9–S15 (2006).
- 29) Li Z., Yue Y., Hu F., Zhang C., Ma X., Li N., Qiu L., Fu M., Chen L., Yao Z., Bilan P. J., Klip A., Niu W., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **314**, E478–E493 (2018).
- 30) Shibata T., Takaguri A., Ichihara K., Satoh K., *J. Pharmacol. Sci.*, **122**, 93–102 (2013).