

氏 名 ・ (本籍)	植山 篤則 (大阪府)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博乙第 599 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
研究科 ・ 専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Inhibition of MEK1 Signaling Pathway in the Liver Ameliorates Insulin Resistance (肝臓の MEK1 シグナル伝達系の阻害はインスリン抵抗性を改善する)
論文審査委員	(主査) 教授 大西 洋英 (副査) 教授 田中 正光 教授 山本 雄造

学位論文内容要旨

論文題目

Inhibition of MEK1 Signaling Pathway in the Liver Ameliorates Insulin Resistance
(肝臓の MEK1 シグナル伝達系の阻害はインスリン抵抗性を改善する)

申請者氏名 植山篤則

研究目的

II 型糖尿病は、膵 beta 細胞からのインスリン分泌不全とインスリン抵抗性と呼ばれている肝臓や骨格筋における相対的なインスリン作用不足を主徴とする疾患である。インスリンはインスリン受容体に結合後、phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K) 系や mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系を活性化し、様々な反応を引き起こすことが知られている。主に PI 3-K 系は糖代謝に、MAPK 系はタンパク合成に関わっているとされている。*In vitro*において、活性化した extracellular signal-regulated kinase (ERK) はインスリンシグナルを阻害すること、MEK 阻害により protein kinase B (Akt) のリン酸化が亢進すること、MEK1(mitogen-activated protein kinase kinase 1)は脂肪細胞株においてインスリン抵抗性を惹起する酵素であること、などが報告されているものの、*in vivo*において MAPK 系阻害が糖尿病病態の改善につながるかどうかは不明である。そこで、弊社研究所で見いだされ、現在がん治療薬として臨床試験を行っている構造の異なる 2 種類の新規 MEK 特異的阻害剤 (R04987655 及び R05126766) を糖尿病モデルマウスに投与することにより、MAPK 系シグナル伝達分子の一つである MEK 阻害により糖尿病病態が改善するか、さらには新規糖尿病治療薬、特にインスリン抵抗性改善薬としてのターゲットとなりうるかについて検討した。

研究方法

7 週齢のオスの *db/db* マウスに、R04987655 あるいは R05126766 を 14 日間混餌投与し、体重、摂餌量、随時血糖値を測定し、一晩絶食後糖負荷試験を行った。さらに 3 日間混餌投与し安楽死処置後、血液及び各種臓器を採取し、ウェスタンブロットなどによる各種解析に用いた。8 週齢のオスの KK-Ay マウスにも同様に両化合物を混餌投与し、血糖値の測定、

糖負荷試験を行った。グルコースクランプ試験は、化合物を 10 から 11 日間混餌投与した *db/db* マウスを用い、覚醒下にて行った。試験当日の朝に 4 時間絶食し、インスリンを一定速度で注入していき、血糖値が 110 mg/dL を維持するように血糖値に応じてグルコース液を注入し、GIR (glucose infusion rate) を算出した。また同時に一定速度で注入した血中 ¹³C-glucose 濃度から、EGP (endogenous glucose production) も算出した。肝臓における MEK1 タンパク発現抑制実験では、*Mek1* の遺伝子発現を特異的に抑制する shRNA をアデノウイルスに組み込み、*db/db* マウスに *i. v.* 投与した。体重、摂餌量をモニターし、投与後 3 日目に血糖値を測定し、安楽死処置後、各種臓器を採材しウェスタンブロット及び mRNA 発現解析に用いた。

研究成績

両 MEK 特異的阻害剤を 14 日間混餌投与された *db/db* マウス及び KK-Ay マウスの随時血糖値は、用量依存的に低下し、耐糖能が改善した。この時、肝臓、骨格筋、及び脂肪組織において、MEK の基質である ERK1/2 のリン酸化が用量依存的に抑制されていた。耐糖能の改善はインスリン分泌促進作用ではなく、インスリン抵抗性の改善によることが示唆されたため、グルコースクランプ試験を、両 MEK 特異的阻害剤を投与した *db/db* マウスを用いて検討した。その結果、これら化合物の混餌投与により GIR の上昇がみられたことから、全身のインスリン抵抗性の改善が示唆された。この上昇した GIR の約 60%は、肝臓からの EGP の抑制で説明できたことから、主に肝臓においてインスリン抵抗性が改善することが示唆された。そこで肝臓の MEK 阻害により随時血糖値が低下するかを確認するために、*db/db* マウスの肝臓における MEK1 タンパク発現を、アデノウイルスを用いて *Mek1* の shRNA を発現させることにより抑制した。その結果、MEK1 タンパク発現の抑制に伴い、*db/db* マウスの随時血糖値の低下がみられた。

結論

構造の異なる 2 種類の MEK 特異的阻害剤を、糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスに混餌投与することにより、血糖値の低下、耐糖能の改善、及び肝臓のインスリン抵抗性の改善 (EGP の抑制) がみられた。さらに、肝臓の MEK1 発現抑制によっても血糖値の低下がみられたことから、肝臓における MEK1 阻害は、肝臓のインスリン抵抗性を改善すること、さらには MEK1 が新規糖尿病治療薬、インスリン抵抗性改善薬のターゲットとなる可能性が示唆された。

学位（博士-乙）論文審査結果の要旨

主 査： 大西 洋英
申請者： 植山 篤則

論文題名：英文 Inhibition of MEK1 Signaling Pathway in the Liver Ameliorates Insulin Resistance
(和訳)肝臓の MEK1 シグナル伝達系の阻害はインスリン抵抗性を改善する。

要旨

臓器インスリン抵抗性とその主病因である II 型糖尿病において、MAPK 系シグナル伝達機構の阻害がその治療になり得ることが推察されてきたが詳細は不明であった。著者らはその詳細を検討するため、MAPK 系シグナル伝達分子の一つである MEK に対する 2 種類の阻害薬を II 型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスならびに KK-Ay マウスに投与して検討した。その結果、これら阻害剤は MEK の基質である ERK1/2 のリン酸化を抑制し、肝臓を中心とした全身におけるインスリン抵抗性を改善させる事により血糖値を改善させた。この現象は、アデノウイルスベクターを用いた肝臓における MEK1 ノックダウンによっても再現された。これらの結果より、肝臓における MEK1 阻害はインスリン抵抗性を改善させることが明らかとなった。

1) 斬新さ

肝臓において MAPK 系は主にタンパク合成にかかわっていると考えられてきた。本研究では新たに MAPK 系が糖尿病におけるインスリン抵抗性に関わっている事が見いだされ、MAPK 系の新たな機能を明らかにした点に斬新性がある。また、MAPK 系の MEK1 タンパクの阻害が新たな糖尿病治療になり得る事を示した点も、本研究のもう一つの斬新性である。

2) 重要性

II 型糖尿病の治療法の一つとしてインスリン抵抗性の改善があるが、その効果が期待でき実臨床にて使用できる薬剤はごく限られており、新薬開発が期待されている。本研究では MEK1 やその下流分子の機能阻害がインスリン抵抗性改善薬創薬の新たなターゲットとなることを示した点は、今後の糖尿病の治療戦略を考える上でも非常に重要である。

3) 研究方法の正確性

モデル動物の血糖変動、インスリン抵抗性などの測定は確立された手法が用いられており非常に精度の高いデータである。また、MAPK 系シグナル伝達の解析は定量法を併用した Western blot 法にて遂行されており正確性があると考えられる。更には MEK1 阻害剤を用いて得られたデータがアデノウイルスを用いた MEK1 ノックダウン法にて再現されたことは、本研究方法が非常に客観性、再現性に富む正確なものである事を象徴している。

4) 表現の明瞭さ

本研究の目的である糖尿病治療薬開発のターゲットの創出の候補として MEK1 を中心とした MAPK 系に焦点をあて、そのインスリン抵抗性への関与を明らかにするための研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上に述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。