

亜鉛輸送担体 ZnT8 の糖尿病発症における役割

順天堂大学大学院 医学研究科 代謝内分泌内科学
藤谷 与士夫

1. はじめに

緒言: 生体の機能維持に必須な微量元素として知られる亜鉛が、細胞内・細胞間のシグナル伝達にかかわることが相次いで報告されている。申請者らは亜鉛輸送担体の機能解析を通じて、亜鉛が膵臓-肝臓間の情報伝達にかかわる可能性を見出し、その糖・インスリン代謝における役割についての解析を進めている。

目的: 近年Genome-wide association study (GWAS)が施行され、2型糖尿病の疾患感受性遺伝子が明らかにされた。その中のひとつがSLC30A8である。SLC30A8はインスリン分泌顆粒の内側に亜鉛イオンを組み入れるZinc transporter 8 (ZnT8)をコードする。インスリン分泌顆粒中には高濃度(20mM)の亜鉛イオンを含むことが知られているが、その生理学的意義についてはなお不明点が多い。最近我々は、膵β細胞特異的SLC30A8欠損マウスを作製することでインスリン分泌顆粒中の亜鉛の新規の役割を明らかにした。すなわち、SLC30A8/ZnT8に依存してβ細胞から分泌される亜鉛がインスリンと同時に肝臓にはたらい、肝臓におけるインスリン分解(hepatic insulin clearance)を抑制する。その抑制効果のおかげで食後しばらくの間、末梢組織に十分量のインスリンを供給することができるという、亜鉛分泌を介する全く新規な糖制御機構を見出した(論文投稿中)。本研究では、本発見をさらに発展させ、亜鉛によるインスリン・糖代謝の制御機構を明らかにしたい。

背景: ZnT8の機能解析に関する研究は、5~6年前より世界中でさかんに始められた。そして2009年にはZnT8欠損マウスの解析の論文が発表され、この蛋白質がインスリン分泌顆粒内に亜鉛を転送する分子として必須であること、インスリン6量体形成に重要であることが示された。また、ZnT8欠損マウスは糖負荷時において耐糖能異常を示し、その際の末梢血インスリンレベルが低下することから、ZnT8の機能低下はβ細胞からのインスリン分泌を低下させると結論づけた^{a)-d)}。

序論: 申請者らも、独自にSLC30A8/ZnT8 コンディショナルマウスを作製し、Rip-Creと交配させることで、膵β細胞特異的ZnT8 KOマウスを作製し、解析をおこなった。インスリンの6量体形成にZnT8が必須であることは我々のZnT8欠損マウスの解析においても再現性をもって示され、また糖負荷試験の結果においてもin vivoでの末梢インスリン濃度はZnT8欠損マウスで低下がみられた。その一方で単離膵島を用いた解析では、ZnT8欠損膵島からのグルコース応答性のインスリン分泌は、コントロールに比して意外なことにむしろ亢進していた。すなわち膵島からのインスリン分泌はZnT8欠損マウスで亢進する一方で、末梢血のインスリンレベルは低値を示す

という discrepancy が認められた。この ZnT8 欠損マウスにみられる表現型の原因を究明するために膵臓、肝臓の灌流実験を多角的に施行し、詳細に解析した。その結果、ZnT8 欠損マウスでは膵β細胞からのインスリン分泌は亢進している一方で、肝臓でインスリンの分解（インスリンクリアランス）が亢進しているために、肝臓を通り抜けて末梢のインスリン感受性臓器に供給されるインスリン濃度が低下することが明らかになった。その根底にあるメカニズムは、膵β細胞から分泌される亜鉛が、インスリンと共に肝臓に運ばれなんらかのメカニズムで、肝におけるインスリンクリアランスを抑制していることである。

2. 方法

我々が作製した膵β細胞特異的 ZnT8 欠損マウスのインスリン分泌顆粒内の亜鉛含有量は、コントロールに比べて著明に減少していることから、ZnT8 欠損マウスβ細胞からの亜鉛の分泌量はコントロールに比して顕著に低下していることが明らかになった (data not shown)。インスリンと協調分泌される亜鉛が、肝細胞へのインスリンの取り込みを抑制している可能性を検証するために、蛍光標識したインスリンを用いて HepG2 細胞を刺激した。細胞培養液中に亜鉛を添加することにより、インスリンの肝細胞への取り込みにおける亜鉛の影響を評価した。つぎに、亜鉛がどのようなメカニズムで肝臓へのインスリンのとりこみを抑制するかを、各種阻害薬を用いて解析した。

3. 結果 研究成果

膵臓から分泌されたインスリンが肝臓において分解除去される経路は、大きく分けて次のように考えられる。すなわち、1) インスリンが肝細胞表面のインスリン受容体に結合する。2) インスリン-インスリン受容体複合体が肝細胞内へと移行する。3) インスリンが endosome 内でインスリン分解酵素により分解をうける。まず、1) と 3) の過程において亜鉛濃度の影響は認められなかった (data not shown)。つぎに、インスリンの細胞内移行における亜鉛の影響を解析すべく、HepG2 細胞を蛍光インスリンにて刺激5分後に観察した。コントロールメディウムにおいては、蛍光標識したインスリンは細胞内に取り込まれ、endosome 内に集積し多数の dot を形成した。これに対し、亜鉛を 30~100 μM の濃度でメディウム内に存在させておくと、インスリンの細胞内移行が著明に抑制された。以上のことから、亜鉛はインスリンのエンドサイトーシスを抑制することが明らかとなった (図 1)。

次に、亜鉛によるエンドサイトーシス抑制のメカニズムを解析するために、亜鉛がどのような種類のエンドサイトーシスに影響を与えるのかについて検討を加えた。これまで、受容体のエンドサイトーシスにはクラスリン依存性、カベオリン依存性、そのいずれにも非依存性の経路

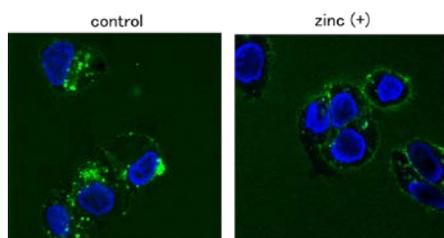


図 1. 亜鉛の insulin endocytosis における影響

蛍光標識したインスリンは細胞内に取り込まれ、エンドソーム内に集積した。亜鉛添加により、インスリンの endocytosis は著明に抑制された。

が知られている。そこで、クラスリン依存性およびカベオリン依存性エンドサイトーシスのそれぞれに対する阻害薬すなわち、chlorpromazineとM β CDを用いて更なる検討を行った(図2)。まず、亜鉛非存在下にchlorpromazineとM β CDをメディアウムに添加したところ、インスリンのエンドサイトーシスが有意に抑制された(図2 white bar)。その条件下にさらに亜鉛を添加したところ、chlorpromazine存在下には亜鉛の抑制効果は認められなかったが、M β CD存在下に亜鉛を添加したところ、さらなるエンドサイトーシスの抑制効果が認められた(図2 black bar)。これらの実験結果から、亜鉛はクラスリンに依存したエンドサイトーシスを抑制することが強く示唆された。

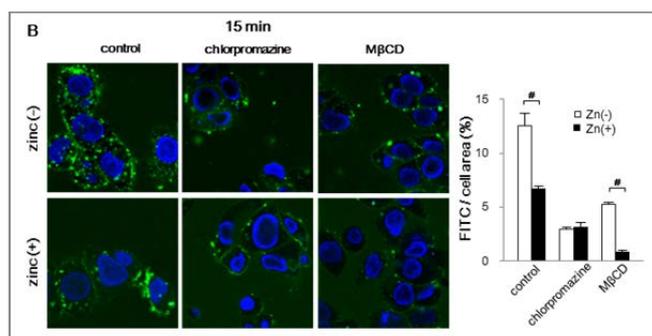


図2. 亜鉛によるインスリン-インスリン受容体のエンドサイトーシス抑制効果の解析

Chlorpromazine はクラスリン依存性のエンドサイトーシスの阻害薬、M β CD はカベオリン依存性のエンドサイトーシスの阻害薬として知られる。

さらに、HepG2細胞を用いて、インスリン刺激前後で細胞表面に残存するインスリン受容体を定量評価する系を確立した。すなわち、HepG2細胞をインスリンにて刺激したのち、氷冷下に反応を停止させる。その後ビオチンを用いて細胞表面蛋白質をすべてラベルし、インスリン受容体に対する抗体を用いて免疫沈降した。その沈降蛋白質を電気泳動で展開し、ストレプトアビジン-HRPでプロットすると、細胞膜上に残存したインスリン受容体の量を定量評価することが可能となった。現在この系を用いて、亜鉛によるインスリン受容体エンドサイトーシスの抑制効果の詳細について解析を継続している。

4. 考察 まとめ

ZnT8の機能については、その遺伝子改変マウスを用いた解析がすでに欧米より報告されており、インスリン分泌顆粒内でのインスリン分子の6量体形成に重要な役割を有することが明らかにされている^{a)-d)}。しかしながら、耐糖能異常はあってもごく軽度にとどまり、その生物学的意義や2型糖尿病発症にかかわるメカニズムについてはほとんど解明されていない。われわれは、独自に膵 β 細胞特異的SLC30A8/ZnT8欠損マウスを作製し、糖負荷時に膵 β 細胞からのインスリン分泌は通常よりむしろ亢進しているにもかかわらず、末梢血中のインスリンレベルは低下しており、この両者の乖離が肝臓におけるインスリンクリアランスの亢進より生じていることを明らかにした。また、肝細胞によるインスリンクリアランスの亢進が、膵臓からの亜鉛の分泌低下に起因する可能性を明らかとした。すなわち、正常の状態では肝細胞にとりこまれるインスリン分子の近傍に亜鉛イオンが十分存在することにより、インスリンのエンドサイトーシスを抑制する。おそらくなんらかの輸送担体を通じて細胞内にとりこまれた亜鉛イオンが、インスリンの受容体を介したクラスリン依存性のエンドサイトーシス経路を抑制することがそのメカニズムの一端と考えられた。このように、ZnT8に依存して膵 β 細胞からインスリンと協調的に分泌される亜鉛イオンは肝臓においてインスリン分解を抑制する新規signal messengerと

して機能する。SLC30A8の異常では、糖負荷後に β 細胞からのインスリン分泌は増加しているにもかかわらず、肝臓におけるインスリン分解を抑制できないために、末梢組織へとむかうインスリンレベルを高く維持できず、耐糖能障害を引き起こすことが示唆された。このようなインスリン代謝異常が、膵 β 細胞に慢性的にインスリン分泌負荷を強いることがSLC30A8遺伝子バリエーションによる糖尿病発症リスク上昇の背景にあると考えられる。門脈を介した膵から肝への亜鉛イオンのながれが食後のインスリンクリアランスを制御する内因性のシグナルであることを初めて明らかにした本研究は、新たな糖尿病発症メカニズムを提示するとともに、これまでにない新しいコンセプトの糖尿病治療法の開発に繋がることが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御援助を賜りましたアステラス病態代謝研究会に厚く御礼申し上げます。

5. 発表論文および参考論文

発表論文

1. Tamaki M, Fujitani Y, Uchida T, Hirose T, Kawamori R, Watada H: Downregulation of ZnT8 expression in pancreatic β -cells of diabetic mice. *Islets* 2009, 1: 121-125.

参考論文

a) Wijesekara N, Dai FF, Hardy AB, Giglou PR, Bhattacharjee A, Koshkin V, Chimienti F, Gaisano HY, Rutter GA, Wheeler MB. Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. *Diabetologia* 2010, 53:1656-1668.

b) Lemaire K, Ravier MA, Schraenen A, Creemers JW, Van de Plas R, Granvik M, Van Lommel L, Waelkens E, Chimienti F, Rutter GA, Gilon P, in't Veld PA, Schuit FC. Insulin crystallization depends on zinc transporter ZnT8 expression, but is not required for normal glucose homeostasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106:14872-14877.

c) Nicolson TJ, Bellomo EA, Wijesekara N, et al. Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. *Diabetes.* 2009, 58:2070-2083.

d) Pound LD, Sarkar SA, Benninger RK, Wang Y, Suwanichkul A, Shadoan MK, Printz RL, Oeser JK, Lee CE, Piston DW, McGuinness OP, Hutton JC, Powell DR, O'Brien RM. Deletion of the mouse Slc30a8 gene encoding zinc transporter-8 results in impaired insulin secretion. *Biochem J.* 2009, 421:371-376.