

令和元年6月17日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05329

研究課題名(和文) グルコキナーゼ活性化による膵細胞の運命決定

研究課題名(英文) Fate determination of pancreatic beta cells by glucokinase activation

研究代表者

寺内 康夫 (Terauchi, Yasuo)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：40359609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：解糖系の酵素であるグルコキナーゼを介した糖代謝シグナルが、膵細胞の機能のみならず増殖と関与することを私たちは示してきたが、今回、グルコキナーゼを活性化することで、糖代謝が活性化された時に膵細胞に起こる変化を網羅的に観察した。発現が上昇するタンパクの中でもFibn5、EGFR、S100A8に焦点を当て、糖代謝における役割を論文化した。興味深いことに、S100A8は高血糖および高遊離脂肪酸により惹起される膵細胞とマクロファージとの相互作用を介した膵島炎症の悪循環の形成に関わっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵島における糖代謝シグナルはグルコース応答性インスリン分泌に不可欠であるが、糖が溢れた状態ではインスリン分泌が低下することが知られていた。S100A8は高血糖および高遊離脂肪酸により惹起される膵島炎症に関わっていたことから、膵島機能保持の標的としてS100A8が浮上してきた。

研究成果の概要(英文)：We had investigated the impacts of glucokinase-mediated glucose signal in the regulation of beta cell function and proliferation. We now systematically investigated changes in the expression of genes involved in beta cell function and proliferation in mouse islets stimulated with glucokinase activator (GKA). GKA-stimulated IRS2 production affected beta cell proliferation but not beta cell function. Specifically, we focused the roles of fibulin 5, EGFR and S100A8 in beta cells. Of note, both glucotoxicity and lipotoxicity triggered S100A8 secretion from pancreatic islets, which in turn promoted macrophage infiltration of the islets. A positive feedback loop between islet-derived S100A8 and macrophages drives beta-cell apoptosis and pancreatic islet inflammation.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵島 グルコキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

膵細胞は外界からのインスリン需要の変化に対し、複製、新生、分化、アポトーシス、脱分化等により細胞量を柔軟に調節しているが、その機構が破綻し膵細胞量が減少すると糖尿病に陥る。グルコキナーゼは膵細胞においてグルコースセンサーとして働き、インスリン分泌に中心的な役割を果たしている。我々は、膵細胞特異的グルコキナーゼ欠損マウスが、インスリン分泌だけでなく代償性の膵細胞増殖障害を呈することを報告し (J Clin Invest. 2007)、グルコキナーゼの活性化が膵細胞量増大に重要と考え研究を推進してきた。その中で、臨床応用が試みられているグルコキナーゼ活性化薬 (GKA) が、膵細胞増殖を促進し、小胞体ストレス誘導性膵細胞アポトーシスを抑制することを明らかにしてきた (Endocrinology 2009, Diabetologia 2012, Diabetes 2013)。一方、グルコキナーゼ恒常性活性化型変異では、初期に膵細胞増殖亢進を示すものの、その後増殖能は低下し、膵細胞のアポトーシスが増加することが示されている (Cell Metab. 19(1):109-21. 2014)。実際、我々は、グルコキナーゼの活性化が膵細胞増殖およびアポトーシスを継時的に引き起こすことを確認している。一方、グルコキナーゼ活性低下をきたすヘテロ遺伝子変異症例は、インスリン分泌能は低下しているが耐糖能異常は軽度にとどまり、加齢に伴う血糖上昇も非糖尿病症例と差がないことが報告されている (JAMA 311(3):279-286, 2014)。

このように、膵細胞ではグルコースシグナルを介したグルコキナーゼの活性化の強度や持続時間が細胞運命の決定に多大な影響を及ぼすことがわかってきた。

2. 研究の目的

グルコキナーゼの活性化が膵細胞の増殖からアポトーシスを誘導する転換点、ならびに今回新たに同定したグルコキナーゼの慢性活性化により発現変化する分子が膵細胞量制御機構に果たす役割について明らかにするために、以下の3つの課題を設定した。

1. 膵細胞グルコキナーゼ活性化が細胞運命決定機構に及ぼす影響の解明

グルコキナーゼ活性の強度や持続時間に依存した細胞増殖からアポトーシスへの転換機構を明らかにし、またグルコキナーゼの活性制御による経時的なタンパク発現制御のプロテオミクス解析を行う。さらに AMPK の活性化によるグルコキナーゼを介した膵細胞アポトーシスの抑制を検討する。グルコース以外の膵細胞増殖刺激の慢性化による膵細胞運命決定についても解析する。

2. S100A8 による膵細胞炎症誘導機構の解明

高グルコースおよび遊離脂肪酸、マクロファージとの共培養による膵島における S100A8 の発現誘導機構を明らかにする。S100A8 を介したマクロファージとの相互作用による膵細胞アポトーシスの機序および役割を、TLR4 欠損マウスならびに肥満・糖尿病モデルマウスを用いて *in vivo* で検証する。さらに、膵細胞特異的な S100A8 欠損マウスを作成し、病態形成における S100A8 の役割を解明する。

3. Pdyn による膵細胞増殖抑制機構の解析

Pdyn 欠損モデルマウスにおける Pdyn による膵細胞量調節機構を明らかにする。遺伝子改変マウスや糖尿病モデルマウスにおける膵細胞および他臓器での Pdyn の発現を検討する。膵細胞特異的 Pdyn 欠損マウスを作成し、膵細胞での Pdyn の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1. 膵細胞グルコキナーゼ活性化が細胞運命決定機構に及ぼす影響の解明

グルコース濃度依存的な GKA 刺激開始後の経時的な解析を行い、グルコキナーゼ活性の強度や持続時間に依存した細胞増殖からアポトーシスへの転換が生じる時系列を明らかにする。これらの結果より、膵細胞の増殖またはアポトーシスを主に認める時期ならびにその転換期における経時的なタンパク発現制御のプロテオミクス解析を行い、増殖からアポトーシスへの移行において機能する分子群を探索する。

これらのタンパクに関して、IRS-2 欠損マウスや db/db マウス等のモデルマウスを用いて膵島での発現変化を解析する。さらに、野生型マウスおよび膵細胞特異的グルコキナーゼヘテ

口欠損マウスの単離膵島を高グルコース下で培養し、インスリン分泌能、膵細胞アポトーシス・酸化ストレスを評価し、膵細胞不全の程度を比較検討し、これらの分子群の発現変化との相関をみることで、糖代謝における役割を検討する。

2. S100A8 による膵細胞アポトーシス誘導機構の解明

膵島においてグルコキナーゼ活性化により最も発現上昇した分子は、S100A8 (GKA により 90 倍発現上昇) という炎症性ペプチドであり、高濃度のグルコース、遊離脂肪酸、マクロファージとの組み合わせ状態での膵細胞における S100A8 の発現変化を確認する。S100A8 は TLR4 や RAGE のリガンドとして作用し、マクロファージ等の炎症性細胞を活性化することが知られており、グルコキナーゼ慢性活性化により発現上昇する S100A8 の膵島炎症での役割を解析する。

グルコキナーゼ慢性活性化に加えて、各種の脂肪酸やサイトカイン、阻害剤、肝細胞、骨格筋細胞、T 細胞等の免疫細胞、薬剤による酸化ストレス、小胞体ストレス、オートファジーの誘導等による S100A8 の発現を解析し、病態や臓器連関を介した S100A8 誘導を解析する。

3. Pdyn による膵細胞増殖抑制機構の解析

慢性的なグルコキナーゼの活性化により、オピオイドペプチド Pdyn が膵島で有意に発現上昇することに着目した。慢性的にグルコキナーゼが活性化される高脂肪食負荷マウスの膵島においても通常食と比較して Pdyn の発現は有意に上昇していた。そこで、Pdyn 欠損マウスを用いて膵島におけるグルコキナーゼ活性化による Pdyn 誘導の生理的意義を検証する。

Pdyn が膵細胞増殖を促進するメカニズムを遺伝子発現解析にて検討するとともに、Pdyn 欠損マウスでの膵細胞アポトーシスの評価を行い、また、グルコキナーゼ活性化が Pdyn 発現を誘導する転写調節機構について、Pdyn プロモーター領域を含んだ luciferase コンストラクトを用いたレポーターアッセイ、および Pdyn の既知の転写因子に対する ChIP assay により検討する。

4. 研究成果

1. 膵細胞グルコキナーゼ活性化が細胞運命決定機構に及ぼす影響の解明

本学プロテオーム講座(平野久教授)との連携により、膵島において GKA にてグルコキナーゼを慢性的に活性化させた時のプロテオミクス解析を行い、膵島のタンパク 1 μ g より 1864 のタンパクを質量分析装置にて検出し、41 個の有意に発現上昇するタンパクと 25 個の有意に発現低下するタンパクを同定した。

その中から、細胞外弾性線維形成蛋白 Fbln5 に注目し、詳細に検討した。マウス単離膵島において、Fbln5 の遺伝子発現は高グルコースおよび GKA 刺激により上昇した。単離膵島におけるグルコースシグナルを介した Fbln5 の発現誘導は、グルコキナーゼ阻害薬・K_{ATP} チャンネル阻害薬・Ca チャンネル拮抗薬、カルシニューリン阻害薬により阻害され、DYRK1A 阻害薬により増幅したことから、膵島における Fbln5 の発現は、膵細胞機能に重要な役割を果たしているグルコキナーゼ/カルシニューリン/NFAT シグナルにより制御されていることが示唆された。

GKA により発現上昇するタンパク EGFR にも着目して、IRS-2 欠損マウスや db/db マウス等のモデルマウス(高血糖、高インスリン血症)を用いて in vivo 膵島での発現変化を解析し、糖代謝における EGFR の役割を検討した。

2. S100A8 による膵細胞アポトーシス誘導機構の解明

膵島炎症はマクロファージの浸潤により特徴づけられていることより、まずマウス単離膵島とマウス腹腔マクロファージ共培養に単離脂肪細胞もしくはパルミチン酸を添加する系を確立し、マクロファージ、パルミチン酸との相互作用により膵島において S100A8/A9 が著明に発現上昇することを確認した。また、肥満・糖尿病モデルである db/db マウスおよび ob/ob マウスでは、炎症性サイトカインやマクロファージマーカーとともに S100A8/A9 の膵島における遺伝子発現が有意に上昇していた。膵細胞から分泌された S100A8 がマクロファージを活性化し、炎症性サイトカイン分泌を介して膵細胞アポトーシスを誘導する膵細胞とマクロファージの相互作用が認められた。S100A8 の中和抗体が膵細胞由来の S100A8 を介した膵細胞アポトーシスが抑制された。

以上、膵細胞から分泌された S100A8 は、TLR4 のリガンドとして作用し、マクロファージにおいて炎症性サイトカインの発現を誘導した。高血糖および高遊離脂肪酸により惹起される

膵 細胞とマクロファージとの相互作用を介した膵島炎症における悪循環が明らかになった。

3 . Pdyn による膵 細胞増殖抑制機構の解析

20 週高脂肪食を負荷した Pdyn ノックアウトマウスは、野生型に比し膵 細胞量が増加し耐糖能が改善した。また、興味深いことに、膵 細胞増殖障害を示した。IRS-2 欠損マウスの膵島では Pdyn の発現は上昇していた。さらに、癌抑制遺伝子である LKB1 の膵 細胞特異的ノックアウトマウスにおいて膵 細胞量増加と Pdyn の発現上昇が報告されており (*FASEB journal*. 2014)、Pdyn が膵 細胞の無秩序的な細胞増殖に対し負の制御を行うことにより膵 細胞量のホメオスタシスを維持している可能性が想定された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- 1.Kyohara M, Shirakawa J, Okuyama T, Kimura A, Togashi Y, Tajima K, Hirano H, Terauchi Y. Serum quantitative proteomic analysis reveals soluble EGFR to be a marker of insulin resistance in male mice and humans. *Endocrinology* 158(12): 4152-4164, 2017.doi: 10.1210/en.2017-00339.
- 2.Tajima K, Shirakawa J, Okuyama T, Kyohara M, Yamazaki S, Togashi Y, Terauchi Y. Effects of metformin on compensatory pancreatic β -cell hyperplasia in mice fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 313(3): E367-E380, 2017. doi: 10.1152/ajpendo.00447.2016.
- 3.Tajima K, Shirakawa J, Togashi Y, Yamazaki S, Okuyama T, Kyohara M, Konishi H, Terauchi Y. Rapid recovery of adipose tissue atrophy, liver steatosis, and pancreatic β cells proliferation after dual inhibition of insulin and IGF-1 receptors. *Sci Rep.* 7(1): 4119, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-04304-5.
- 4.Okuyama T, Shirakawa J, Yanagisawa H, Kyohara M, Yamasaki S, Tajima K, Togashi Y, Terauchi Y. Identification of the matricellular protein Fibulin-5 as a target molecule of glucokinase-mediated calcineurin/NFAT signaling in pancreatic islets. *Sci Rep.* 7(1): 2364, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-02535-0.
- 5.Shirakawa J, Fernandez M, Takatani T, El Ouaamari A, Jungtrakoon P, Okawa ER, Zhang W, Yi P, Doria A, Kulkarni RN. Insulin Signaling Regulates the FoxM1/PLK1/CENP-A Pathway to Promote Adaptive Pancreatic β Cell Proliferation. *Cell Metab.* 25(4): 868-882, 2017. doi: 10.1016/j.cmet.2017.02.004.
- 6.Takahashi K, Nakamura A, Miyoshi H, Nomoto H, Kitao N, Omori K, Yamamoto K, Cho KY, Terauchi Y, Atsumi T. Effect of the sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor luseogliflozin on pancreatic beta cell mass in db/db mice of different ages. *Sci Rep.* 8(1): 6864, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-25126-z.
- 7.Kitao N, Nakamura A, Miyoshi H, Nomoto H, Takahashi K, Omori K, Yamamoto K, Cho KY, Terauchi Y, Atsumi T. The role of glucokinase and insulin receptor substrate-2 in the proliferation of pancreatic beta cells induced by short-term high-fat diet feeding in mice. *Metabolism.* 2018 Mar 12. pii: S0026-0495(18)30082-9.doi: 10.1016/j.metabol.2018.03.010.
- 8.Inoue H, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Okuyama T, Kyohara M, Tanaka Y, Orime K, Saisho Y, Yamada T, Shibue K, Kulkarni RN, Terauchi Y. Signaling between pancreatic β -cells and macrophages via S100 calcium-binding protein A8 exacerbates β -cell apoptosis and islet inflammation. *J Biol Chem.* 293(16): 5934-5946, 2018. doi: 10.1074/jbc.M117.809228.

〔学会発表〕(計 23 件)

- 1.Tajima K, Shirakawa J, Togashi Y, Terauchi Y. A Mouse of Model of Acute Reversible Lipodystrophy with Dual Inhibition of Insulin and IGF-1 Receptors. 76th American Diabetes Association (ADA) meeting, New Orleans, USA, 2016, 6.
- 2.Nakamura A, Takahashi K, Kitao N, Miyoshi H, Terauchi Y, Atsumi T: Transient effect of glucokinase activator on beta cell proliferation. 52nd EASD Annual Meeting, Munich, Germany, 2016, 9.
- 3.Shirakawa J, Terauchi Y. Heterogeneity of pancreatic islets. Symposium. 60th Annual Meeting of the Japan Diabetes Society, Nagoya, 2017, 5.

4. Kyohara M, Shirakawa J, Kimura A, Hirano H, Terauchi Y. Identification of Soluble EGFR as a Serum Biomarker of Insulin Resistance by a Quantitative Proteomic Analysis Using Mice with Diabetes. 77th American Diabetes Association (ADA) meeting, San Diego, CA, USA, 2017, 6.
5. Okuyama T, Shirakawa J, Yanagisawa H, Terauchi Y. Identification of the matricellular protein Fibulin-5 as a target molecule of glucokinase-mediated calcineurin/NFAT signaling in pancreatic islets. 77th American Diabetes Association (ADA) meeting, San Diego, CA, USA, 2017, 6.
6. Inoue R, Shirakawa J, Togashi Y, Terauchi Y. Functional role and mechanism of UCP2 upregulation in pancreatic β cells. 78th American Diabetes Association (ADA) meeting, Orlando, FL, USA, 2018, 6.
7. 奥山朋子、白川純、柳沢裕美、寺内康夫：細胞外弾性線維形成蛋白 Fibulin-5 はインスリン抵抗性および肥満惹起に關与する。第 59 回日本糖尿病学会年次學術總會，京都，2016, 5.
8. 京原麻由、白川純、木村鮎子、平野久、寺内康夫：リラグルチド投与による肥満糖尿病モデル db/db マウスにおける血清タンパク変動の網羅的解析。第 59 回日本糖尿病学会年次學術總會，京都，2016, 5.
9. 井上英昭、白川純、折目和基、田島一樹、富樫優、京原麻由、奥山朋子、吉田瑛子、山崎俊介、小西裕美、寺内康夫：S100A8 を介した膵島とマクロファージの相互作用による膵島炎症惹起機構の解明。第 59 回日本糖尿病学会年次學術總會，京都，2016, 5.
10. 奥山朋子、白川純、柳沢裕美、寺内康夫：細胞外弾性線維形成蛋白 Fibulin-5 によるインスリン抵抗性および肥満惹起機構の解明。第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会年次學術集会，横浜，2017, 2.
11. 京原麻由、白川純、寺内康夫：db/db マウスの血清プロテオミクスより同定された soluble EGFR は新たな糖尿病マーカー候補である。第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会年次學術集会，横浜，2017, 2.
12. 富樫優、白川純、田島一樹、寺内康夫：膵 細胞増殖モデルマウスを用いた糖尿病研究。第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会年次學術集会，横浜，2017, 2.
13. 伊藤謙、田島一樹、富樫優、寺内康夫：ムスカリニックアゴニストによる膵 細胞増殖機構の解析。第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会年次學術集会，横浜，2017, 2.
14. 白川純、Kulkarni RN、寺内康夫。FoxM1/PLK1/CENP-A シグナルを介した膵 細胞量の代償性制御機構の解明。第 55 回日本臨床分子医学会，東京，2017, 4.
15. 井上亮太、白川純、富樫優、寺内康夫。グルコースおよびインスリンシグナルの変動に伴う膵島 UCP2 発現の検討。第 32 回日本糖尿病・肥満動物学会年次學術集会，名古屋，2018, 2.
16. 大森一乃、中村昭伸、土田和久、高橋清彦、北尾直之、三好秀明、寺内康夫、渥美達也。血糖降下作用が膵 β 細胞量と肝臓に与える影響。第 32 回日本糖尿病・肥満動物学会年次學術集会，名古屋，2018, 2.
17. 奥山朋子、白川純、寺内康夫。膵島における Fibulin-5 の発現制御機構の解析。第 32 回日本糖尿病・肥満動物学会年次學術集会，名古屋，2018, 2.
18. 京原麻由、白川純、木村鮎子、平野久、寺内康夫。血清プロテオミクスにより同定された soluble EGFR は糖尿病治療効果を反映する血清バイオマーカー候補である。第 32 回日本糖尿病・肥満動物学会年次學術集会，名古屋，2018, 2.
19. 白川純、寺内康夫。膵 細胞における insulin-like growth factor-2 受容体 (IGF2R) の役割。第 91 回日本内分泌学会學術總會，宮崎，2018, 4.
20. 井上亮太、白川純、富樫優、寺内康夫。膵 細胞における UCP2 発現上昇の意義の検討。第 61 回日本糖尿病学会年次學術集会，東京，2018, 5.
21. 京原麻由、白川純、木村鮎子、平野久、寺内康夫。血清プロテオーム解析により同定された soluble EGFR の糖尿病バイオマーカーとしての検討。第 61 回日本糖尿病学会年次學術集会，東京，2018, 5.
22. 白川純、Rohit N Kulkarni, 寺内康夫。Insulin-like growth factor-2 受容体 (IGF2R) の膵 細胞における役割。第 61 回日本糖尿病学会年次學術集会，東京，2018, 5.
23. 奥山朋子 白川純 金滝聡一郎 寺内康夫。膵島における S100A8/A9 の発現制御機構の解析。第 33 回日本糖尿病・肥満動物学会學術集会，福岡，2019, 3.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~nai3naib/wp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：白川 純

ローマ字氏名：Shirakawa Jun

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：70625532

研究分担者氏名：富樫 優

ローマ字氏名：Togashi Yu

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：10710444

研究分担者氏名：伊藤 譲

ローマ字氏名：Ito Yuzuru

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：00512980

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田島 一樹

ローマ字氏名：Tajima Kazuki

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：客員研究員

研究者番号(8桁)：00725236

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。