

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09846

研究課題名(和文) 妊娠期の膵 細胞増殖におけるPDZ binding kinaseの役割

研究課題名(英文) The role of PDZ binding kinase in beta cell proliferation during pregnancy

研究代表者

荻原 健 (OGIHARA, Takeshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60399772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠期には膵 細胞が代償性に増殖し、インスリン分泌量の増加を通じて血糖値の恒常性が維持されている。我々は、妊娠期のマウス膵島においてPDZ binding kinase (Pbk) の発現が増加することを見出した。Pbkは癌細胞において細胞増殖に関与するとの報告があるため、Pbkが妊娠期の 細胞増殖に関与するとの仮説を立て、その検証を行った。解析の結果、Pbkはエストロゲン応答性に発現が増加し、Ccnb1の発現増加を介して 細胞増殖に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は1型糖尿病あるいは2型糖尿病に限らず、その発症には 細胞量の低下が関与している。現在、 細胞を補充する治療として、臨床現場で提供されている唯一の方法が膵/膵島移植であるが、ドナー不足により適応が極めて限定される。本研究は、妊娠期に 細胞が増加することに着目し、その新規メカニズムの一端を明らかにしている。患者自身の 細胞を十分に増やすことができれば、血糖値の改善や正常化が可能となる。本研究は、 細胞の増殖を標的とする新たな糖尿病治療法開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The proliferation of pancreatic β -cells is enhanced to enable an increase in β -cell mass during pregnancy. To elucidate the mechanisms involved, we investigated islets from pregnant and nonpregnant mice by gene expression profiling, and found that the expression of Pbk is increased in pregnant mouse islets compared with control mouse islets. Among the pregnancy hormones, treatment with estradiol upregulated Pbk expression. Knockdown of Pbk reduced BrdU incorporation in MIN6 cells, which was accompanied with a decreased expression of Ccnb1, a regulatory gene involved in mitosis. Ccnb1 expression was augmented in mouse islets during pregnancy. The forced expression of Pbk in isolated mouse islets increased Ccnb1 expression, and the Pbk inhibitor HI-TOPK-032 suppressed Ccnb1 expression in islets isolated from pregnant mice. Our results suggest that Pbk contributes to the expansion of islets during pregnancy, and Ccnb1 may assist Pbk in its role in β -cell proliferation.

研究分野：糖尿病

キーワード：細胞 Pbk Ccnb1 Estradiol p53 糖尿病 妊娠

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病は、糖代謝異常に伴う血糖値の上昇を特徴とし、血糖上昇に付随して様々な合併症を併発する疾患である。高血糖により引き起こされる細小血管障害(網膜症・腎症・神経障害)あるいは大血管障害(脳梗塞・心筋梗塞・閉塞性動脈硬化症)が重症化した場合には、生活の質が著しく損なわれ、生命予後にも影響を及ぼす。血糖低下作用を主に担うホルモンがインスリンであり、インスリンを分泌する膵β細胞の機能不全が、糖尿病の発症に重要な役割を占めている。1型糖尿病は、自己免疫を主因とする膵島炎によりβ細胞が破壊され、インスリン分泌量が絶対的に不足する疾患である。2型糖尿病では発症前段階において、インスリン抵抗性の上昇に応じてインスリン分泌量は一時的に増加するが、代償機構の破綻に伴いβ細胞量が漸減し、インスリン分泌量が相対的に不足することによって血糖値が上昇する。従って、1型糖尿病あるいは2型糖尿病にかかわらず、β細胞の絶対量を増加させることが、究極的な糖尿病治療と目されている。

現在、β細胞を補充する治療として、臨床現場で提供されている唯一の方法が膵臓もしくは膵島移植である。ただし、日本ではドナー不足により膵臓/膵島の入手が極めて困難であることから、適応症例に限られており、膵臓/膵島移植が受けられる患者は極少数である。iPS細胞の出現に伴い、将来は膵再生医療によりβ細胞の補充が可能になることが予想される。ただし、再生医療は個々の患者の病状に応じたオーダーメイド治療とも捉えられ、治療コストは高額であることが考えられる。以上より、糖尿病患者自身のβ細胞量を保持し、インスリン分泌能を可能な限り維持する方法が確立できれば、iPS細胞を用いずとも血糖値管理が容易となり、より多くの糖尿病患者がその恩恵を享受できる可能性があり、医療経済面と併せて、その有用性が期待される。

(2) 妊娠中は胎盤から分泌される胎盤ラクトゲンなどの影響によりインスリン抵抗性が誘導されるが、インスリン分泌量が増加することで、糖代謝の恒常性が維持されている。齧歯類の解析では、妊娠に伴い母体においてβ細胞量が増加することが報告されている。妊娠期には、エストロゲン等の妊娠ホルモン分泌が増加しており、β細胞はそれらに対する受容体を有していることから、妊娠期のβ細胞増殖機構は、肥満に伴うインスリン抵抗性に応じた代償性β細胞増殖機構とは異なることが想定されている。

我々は妊娠期のβ細胞増殖に着目し、妊娠マウスと非妊娠マウスから膵島を採取し、マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現を網羅的に解析した結果、セロトニンの合成酵素である Tryptophan hydroxylase 1 (Tph1) が妊娠膵島に発現することを発見し、セロトニンがプロラクチン応答性に生成され、妊娠期のβ細胞増殖に関与することを報告している (Kim H, et al: Nature Med 16, p804, 2010, Iida H, **Ogihara T**, et al: J Mol Endocrinol 55, p41, 2015)。そして、マイクロアレイの追加解析を施行した結果、マウス膵島においてリン酸化酵素 PDZ binding kinase (Pbk)の発現が妊娠応答性に増加することを見出した。

(3) Pbk は T lymphokine-activated killer の cDNA ライブラリーから同定された 36kDa の蛋白であり、p38MAP kinase をリン酸化する MAPKK-like protein として報告された。ヒト正常組織における Pbk の発現は限定的であり、精巣や胎生期の神経前駆細胞での発現が確認されている。そして、Pbk は、白血病細胞・乳癌・大腸癌・肺癌・肝細胞癌などの癌細胞に高発現することが報告され、更なる解析から、Pbk は細胞周期に介入し、腫瘍増殖作用を有すると考えられている。Kim らは、大腸癌を移植したマウスに Pbk 阻害薬である HI-TOPK-032 を投与し、腫瘍増殖抑制効果を報告しており、Pbk は抗癌剤の新たな分子標的としての役割が期待されている (kim DJ, et al: Cancer Res 72, p3060, 2012)。以上の前提から、Pbk はβ細胞においても細胞増殖に関与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究において、申請者は Pbk が妊娠期のβ細胞増殖に関与するとの仮説を立てた。癌細胞を対象とした先行研究では、Pbk による細胞増殖作用を検証し、その下流として複数の経路を提示している。Ayllon らは、Pbk が p38MAPK の活性化を通じて、IGF-1 依存性の腫瘍増殖を促すと報告した (Ayllon V and O'Connor R: Oncogene 26, p3451, 2007)。また、転写因子 p53 はサイクリン依存性阻害因子である CDKN1A (p21) のプロモーター領域に結合し、p21 の発現を促して細胞周期を抑制することが知られている。Pbk は p53 と複合体を形成し、p53 の抑制を介して細胞増殖を促進すると報告された。その際、Pbk が p53 の転写活性機能を抑制するとの説、あるいは Pbk が p53 蛋白の安定性を低下させるとの説が提唱されている (Hu F, et al: Oncogene 29, p5456, 2010, Namdi AK, et al: BBRC 358, p181, 2007)。更に、Pbk は Pten の発現を低下させ、PI3 kinase の活性化を維持することで細胞増殖を促すと報告する研究グループもある (Shih MC, et al: Oncogene 31, p2389, 2010)。まとめると、Pbk は、(i) p38MAPK 経路、(ii) p53-p21 経路、(iii) PI3K/Akt 経路を介して腫瘍増殖を制御する可能性がある。それらを参考にしつつ、我々の研究の目的はβ細胞における Pbk の細胞増殖作用を検証し、そのメカニズムの詳細を解析することである。

3. 研究の方法

妊娠及び非妊娠マウスから脾臓を単離し、Pbkの発現量を定量的RT-PCR法、またはウェスタンブロット法で確認する。

β 細胞の腫瘍株であるMIN6細胞において、RNA干渉法を用いてPbkの発現を抑制、あるいはPbk阻害薬HI-TOPK-032で前処理した後にBrdU導入率を測定し、細胞増殖能を評価する。更に、前述の検体を用いて、定量的RT-PCR法およびウェスタンブロット法にて細胞増殖に関与する因子を解析し、Pbkを抑制することによって生じ得る細胞内シグナル伝達系の変化を明らかにする。

単離脾臓に対してPbk阻害薬HI-TOPK-032を投与することでPbkの作用を抑制、あるいはアデノウイルスを用いてPbkを過剰発現することでPbk作用を増強させた上で検体を採取し、細胞内シグナル伝達系へ及ぼす影響を比較検討する。

4. 研究成果

(1) 妊娠マウスと非妊娠マウスから脾臓を採取し、それらの遺伝子発現を比較したマイクロアレイの解析結果では、非妊娠マウスに比して妊娠マウスの脾臓においてPbkの発現増加を認めた。定量的RT-PCR法を用いて追試した結果、非妊娠マウスの脾臓と比較し、妊娠マウスの脾臓でPbkの発現が、約3倍に増加していた(図1A)。続いてウェスタンブロット法で検証した結果、妊娠マウスの脾臓でPBKの蛋白量が増加傾向であった(図1B)。興味深いことに、既報においてPbkの発現調節に関与すると報告されている転写因子E2f1も、妊娠期の脾臓において発現が約2倍に増加していた(図1B)。以上より、マウスの脾臓においてPbkは妊娠期に発現が増加することが確認された。

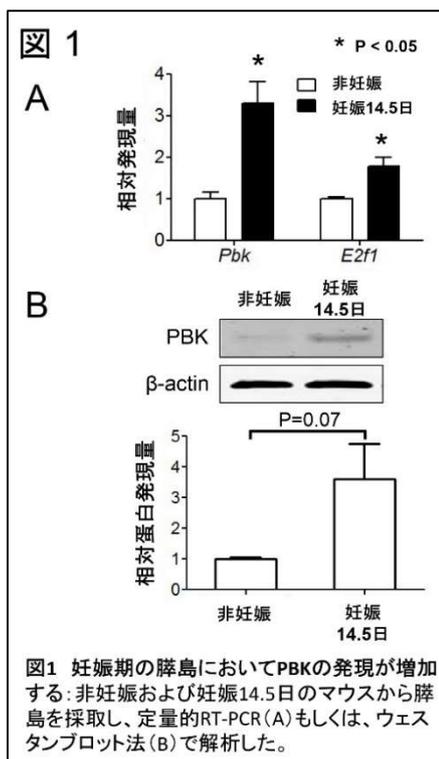


図1 妊娠期の脾臓においてPBKの発現が増加する:非妊娠および妊娠14.5日のマウスから脾臓を採取し、定量的RT-PCR(A)もしくは、ウェスタンブロット法(B)で解析した。

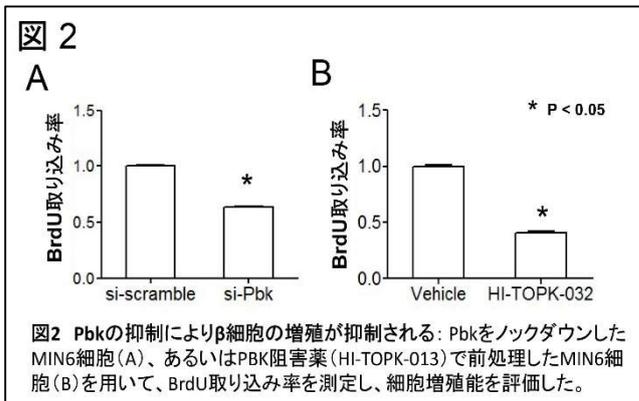


図2 Pbkの抑制により β 細胞の増殖が抑制される: PbkをノックダウンしたMIN6細胞(A)、あるいはPbk阻害薬(HI-TOPK-013)で前処理したMIN6細胞(B)を用いて、BrdU取り込み率を測定し、細胞増殖能を評価した。

(2) 先行研究において、Pbkがp53を介して細胞増殖を制御すると報告されていることから、ウェスタンブロット法を用いてp53発現量を解析した。その結果、MIN6細胞においてPbkをノックダウンすることによりp53の蛋白量が増加した(図3A)。p53の蛋白量増加は、Pbk阻害薬にて処理したMIN6細胞においても確認された(図3B)。p53の作用として、細胞周期に対して抑制的に作用する*Cdkn1a*(p21)の発現増加を介して細胞増殖を低下させることが知られている。定量的RT-PCR法を用いて解析した結果、予想に反して*Cdkn1a*発現量はPbkノックダウンによる影響を受けなかった。脾臓から採取したサンプルに立ち戻り、定量的RT-PCR法で評価した結果、非妊娠マウスと妊娠マウスとの比較において、*Cdkn1a*の発現に有意差を認めなかった。以上より、*Cdkn1a*は、妊娠期の β 細胞増殖には関与しない可能性が示唆された。

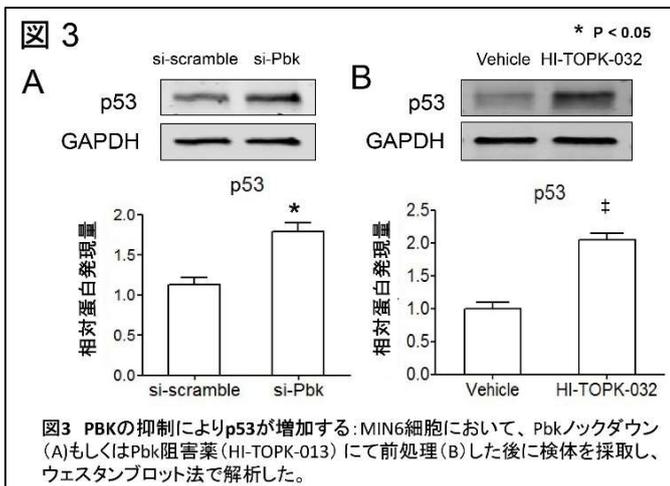


図3 PBKの抑制によりp53が増加する: MIN6細胞において、Pbkノックダウン(A)もしくはPbk阻害薬(HI-TOPK-013)にて前処理(B)した後に検体を採取し、ウェスタンブロット法で解析した。

Pbkが β 細胞においても細胞増殖に関与するかを検証するために、マウスの β 細胞腫瘍株であるMIN6細胞において、RNA干渉法を用いてPbkの発現を抑制した。Pbkをノックダウンすることによって、Pbkの発現量は70%以上低下し、それに付随してBrdU取り込み率が有意に低下した(図2A)。さらに、MIN6細胞をPbk阻害薬HI-TOPK-032で処理したところ、BrdU取り込み率が低下した(図2B)。すなわち、Pbkは β 細胞においても細胞増殖に関与することが示唆された。

また、Pbk は p38MAPK のリン酸化酵素として同定された蛋白質であり、癌細胞において、リン酸化によって活性化された p38MAPK は細胞増殖に関与することが知られている。MIN6 細胞において p38MAPK のリン酸化をウェスタンブロット法で評価したところ、Pbk のノックダウンの有無で、リン酸化に差を認めなかった。PI3K/Akt 経路は、細胞増殖における細胞内シグナル伝達経路の一つである。Pten は PI3K の抑制因子であり、Pbk は Pten の発現を抑制するとの既報がある。MIN6 細胞において、定量的 RT-PCR 法を用いて Pten の発現量を測定したが、Pbk のノックダウンの有無で、Pten の発現量に差を認めなかった。そして、非妊娠期と妊娠期の脾臓において比較したところ、同じく Pten の発現量に差を認めなかった。以上より、p38MAPK 経路、PI3K/Akt 経路は、Pbk 依存性の B 細胞増殖に関与しない可能性が示唆された。

(3) Pbk の抑制による p53 蛋白質量の増加は既報と類似した結果であったが、Cdkn1a の発現量には変化がなく、腫瘍細胞において提示されたメカニズムとは一致しなかった。そのため、Pbk の新たな標的遺伝子の検索を目的として、細胞周期を制御するサイクリン関連の遺伝子発現量を、定量的 RT-PCR 法を用いて測定した。Pbk をノックダウンした MIN6 細胞において、Ccnb1、Ccnb2、Cnd2、Cnd3、Cdk1、Cdk4 の発現低下を認めた。また、Pbk 阻害薬で処理した MIN6 細胞においても、Ccnb1、Ccnb2、Cnd2、Cnd3、Cdk1、Cdk4 の発現量が低下した。

マウスから脾臓を単離し、アデノウイルスを用いて Pbk を過剰発現させた結果、前述の遺伝子の中で、Ccnb1 の発現のみが増加していた(図 4A)。非妊娠マウスおよび妊娠マウスから採取した脾臓を比較したところ、妊娠期に Ccnb1、Ccnb1、Cdk4 の発現増加を認めた(図 4B)。次に、妊娠期に単離した脾臓を Pbk 阻害薬で処理した結果、妊娠に付随して増加していた Ccnb1 の発現が、Pbk 阻害薬の投与により有意に低下していた(図 4B)。

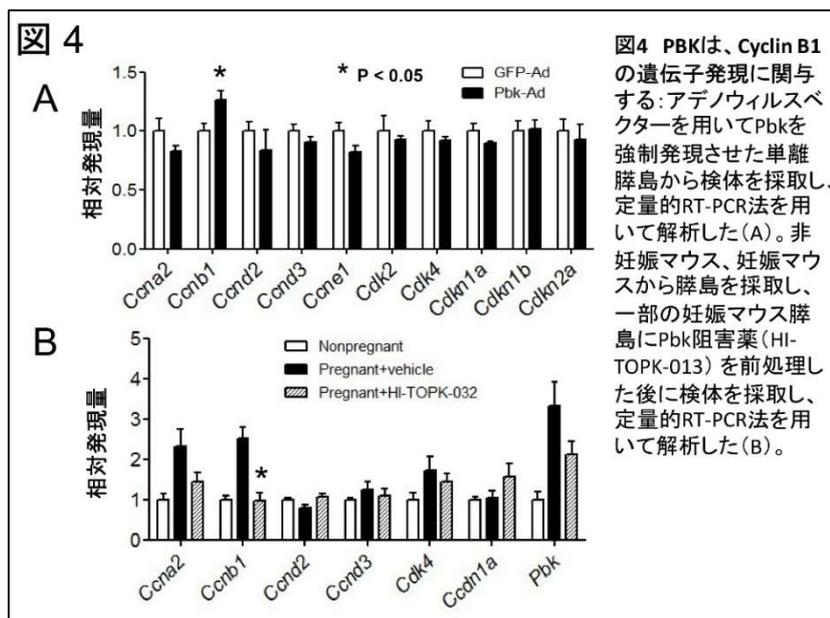


図4 PBKは、Cyclin B1 の遺伝子発現に関する:アデノウイルスベクターを用いてPbkを強制発現させた単離脾臓から検体を採取し、定量的RT-PCR法を用いて解析した(A)。非妊娠マウス、妊娠マウスから脾臓を採取し、一部の妊娠マウス脾臓にPbk阻害薬(HI-TOPK-013)を前処理した後に検体を採取し、定量的RT-PCR法を用いて解析した(B)。

まとめると、B 細胞において Pbk を抑制すると Ccnb1 の発現が低下し、過剰発現を用いて Pbk 作用を増強すると Ccnb1 の発現が増加していたことから、Ccnb1 は Pbk の標的遺伝子の有力な候補の一つと考えられた。

(4) 妊娠が Pbk 発現増加の契機となっていることから、Pbk の上流シグナルの解析を目的として、単離脾臓を各種の妊娠ホルモン(エストロゲン・プロゲステロン・プロラクチン・HCG)で刺激し、Pbk の発現量を定量的 RT-PCR 法で測定した。その結果、Pbk はエストロゲンの刺激に応じて、Pbk の発現が増加していた(図 5)。MIN6 細胞を用いて追試したところ、エストロゲン応答性の Pbk 発現増加が確認された。

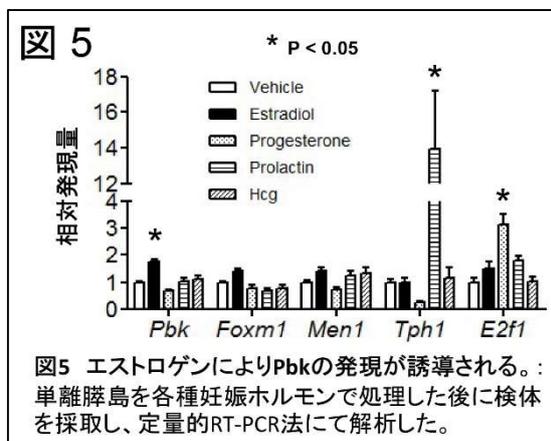


図5 エストロゲンによりPbkの発現が誘導される。: 単離脾臓を各種妊娠ホルモンで処理した後に検体を採取し、定量的RT-PCR法にて解析した。

(5) 以上の解析から、妊娠期の B 細胞において、Pbk はエストロゲン応答性に発現が上昇し、Ccnb1 を介して、細胞増殖を促進する可能性が示唆された。本研究によって、妊娠期に伴う B 細胞増殖の新たなメカニズムの一端が、明らかとなった。ただし、Pbk がどのようなメカニズムで Ccnb1 の発現を制御しているかは未解明である。細胞増殖に重要な役割を果たす p53 の蛋白質量が Pbk の影響を受けて変化することも大変興味深い。p53 の下流には様々な標的が存在するため、p53 が Cdkn1a (p21) 以外の経路を介して、妊娠期の B 細胞増殖に関与している可能性も考えられる。

今後、Pbk作用のより詳細なメカニズムを明らかにし、あるいはPbkの発現調節機構などを解析することによって、 β 細胞増殖を治療戦略とする新たな糖尿病治療法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uesato Tadayoshi, Ogihara Takeshi, Hara Akemi, Iida Hitoshi, Miyatsuka Takeshi, Fujitani Yoshio, Takeda Satoru, Watada Hirotaka	4. 巻 2
2. 論文標題 Enhanced Expression of the Key Mitosis Regulator Cyclin B1 Is Mediated by PDZ-Binding Kinase in Islets of Pregnant Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 207 ~ 219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/js.2017-00338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上里忠好、荻原健、板倉敦夫、竹田省、綿田裕孝
2. 発表標題 妊娠期の細胞増殖におけるPBKの役割
3. 学会等名 第42回日本産婦人科栄養・代謝研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上里忠好
2. 発表標題 妊娠期のマウス臍島においてPBKはCyclin B1の発現増強に関する
3. 学会等名 第35回日本糖尿病・妊娠学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	上里 忠好 (Uesato Tadayoshi)	順天堂大学・医学部・非常勤助手 (32620)	