

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18016

研究課題名（和文）血管内皮PDK1が全身の糖代謝及び膵細胞に及ぼす病態生理学的役割の解明

研究課題名（英文）The role of vascular endothelial PDK1 on glucose metabolism and beta-cell function

研究代表者

小畑 淳史（Obata, Atsushi）

川崎医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：10771298

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ(PDK1)はインスリンシグナルにおいて非常に重要な役割を果たすキナーゼである。我々は、PDK1を血管内皮特異的に欠損させたマウスを用いることで、血管内皮のPDK1が、インスリン分泌に重要な役割を果たす膵細胞の血管構築、血流を保持する事で、膵細胞量、機能維持に非常に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮におけるインスリンシグナルについては、インスリン受容体は膵細胞機能、量には関与がないこと、その下流にあるIRS2は生体内においては膵細胞における血流の維持によりインスリン分泌に重要な役割を果たすが、単離した膵細胞は機能的に問題がないと報告されている。我々はインスリンシグナルのさらなる下流であるPDK1に着眼し、血管内皮PDK1は膵細胞の血管構築や血流に非常に大切な役割を果たし、膵細胞量、機能維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。このことで、血管内皮PDK1に着眼した新たな糖尿病治療法開発へのシーズとなる成果となったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is known that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) plays very important roles in insulin signaling. In this study, we elucidated that vascular endothelial PDK1 plays a pivotal role in the maintenance of pancreatic beta cell mass and function in adult male mice via maintaining vascular structure and blood flow in pancreatic beta cell.

研究分野：糖尿病・内分泌・代謝学

キーワード：PDK1 膵細胞 vascularity 血流 虚血 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)は、insulin receptor-PI3 kinase の下流にあり、血管内皮細胞の増殖や生体での血管拡張作用を調節している。本研究では血管内皮特異的 PDK1 欠損マウスを用いて、血管内皮 PDK1 が全身の糖代謝及び膵細胞へ及ぼす影響を包括的に解析することで血管内皮における PDK1 の病態生理学的役割の解明を目指す。さらにヒト血管内皮で得られたデータをもとに、血管内皮 PDK1 の発現制御に迫る。

2. 研究の目的

血管内皮細胞は、各種生理活性因子の分泌などにより血流・血管新生・血管透過性を制御している。血管内皮細胞自身の増殖や機能維持には、様々なシグナル伝達機構が関与しており、特に phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)は、insulin receptor-PI3 kinase の下流にあり、血管内皮細胞の増殖や生体での血管拡張作用を調節している。本研究では血管内皮特異的 PDK1 欠損マウス(VEPDK1KO マウス)を用いて、血管内皮 PDK1 が全身の糖代謝及び膵細胞へ及ぼす影響を包括的に解析することで血管内皮における PDK1 の病態生理学的役割の解明を目指す。さらにヒト血管内皮で得られたデータをもとに、血管内皮 PDK1 の発現制御に迫る。

3. 研究の方法

(1)1 型糖尿病モデル ストレプトゾトシン (STZ) 誘導性高血糖マウスを用いた解析

6 週齢の VEPDK1KO マウス及びコントロールマウスに STZ150 μ g/g を腹腔内投与し、高血糖を誘発する。STZ で高血糖を誘発した VEPDK1KO マウスは、骨格筋においてインスリン抵抗性が増悪しており、eNOS の発現低下に伴い、骨格筋の vascularity が減少し、PGC1 の発現低下を介して mitochondrial biogenesis が低下することが分かっている。骨格筋での糖取り込みを評価するため、2DG uptake を in vivo そして ex vivo で評価すること、ミトコンドリアの機能が実際に落ちているかフラックスアナライザーにより酸素消費量を測定すること、運動耐性に変化がないかトレッドミルで評価する。

(2)血管内皮 PDK1 が膵細胞に及ぼす影響の解析

VEPDK1KO マウスは通常食 12 週齢負荷において腹腔内ブドウ糖負荷試験ではコントロールマウスと血糖値は同等であったが、インスリン値は低値であった。経口ブドウ糖負荷試験では耐糖能が KO マウスで有意に増悪していた。単離膵島を用いてグルコース応答性インスリン分泌を評価したところ、KO マウス由来の単離膵島でグルコース応答性インスリン分泌は低下しており、Ex-4 を添加しても KO マウスで反応は減弱していた。また膵細胞量は減少し、膵島内 CD31 陽性面積は減少していた。単離膵島の mRNA 発現を見ると、インスリン及びその転写因子やインクレチン受容体等の膵細胞機能に関わる重要な遺伝子は KO マウスで有意に低下していた。HIF1 やその下流遺伝子の動きからも現段階で KO マウスでは膵細胞における vasculature の減少及び血流低下により、膵島において虚血が惹起され、ER stress を介して膵細胞量、機能が低下していると想定している。今後 Microsphere を用いた実際の膵島血流量の測定、また、膵細胞機能低下の原因として虚血以外の因子として血管構造に変化がないか、電子顕微鏡での血管内皮の構造評価や、血管新生に関わる angiocrine factor に変化がないかを評価する。

(3)血管内皮 PDK1 の発現制御の解明

我々は 1 型、2 型糖尿病モデルマウスで血管内皮 PDK1 の発現が異なることを示した。実際に、ヒト大動脈血管内皮において、肥満に相関して血管内皮 PDK1 の mRNA 発現が減少していることを明らかにした。また、高脂肪食 20 週負荷マウスの大動脈初代培養細胞で PDK1 の発現が低下していることを見出した。肥満に関する因子、具体的には脂肪毒性や高インスリン、あるいは糖毒性などに着目し、ヒト臍帯動脈内皮細胞あるいはマウス大動脈初代培養細胞を用いて、パルミチン酸刺激、インスリン刺激、グルコース刺激により PDK1 の発現に変化がないか検討する。

4. 研究成果

(1)1 型糖尿病モデル ストレプトゾトシン (STZ) 誘導性高血糖マウスを用いた解析

STZ を用いた系では、1 型糖尿病モデルマウスでは血管内皮 PDK1 はコントロールマウスと比較して発現が上昇していることを我々は明らかにしている。そこで VEPDK1KO マウスを用いて、1 型糖尿病における血管内皮 PDK1 の役割について詳細に検討した。結果、VEPDK1KO マウスは STZ で 1 型糖尿病を惹起すると、骨格筋における vascularity が低下し、骨格筋においてインスリン抵抗性が惹起されることを明らかにした。「恒常性に発現する」とされていた PDK1 は実は病態により血管内皮においては発現量が変化することを明らかにしたのは我々の研究が初めてである。本研究内容は今後論文投稿を行っていく予定である。

(2)血管内皮 PDK1 が膵細胞に及ぼす影響の解析

この実験系は血管内皮 PDK1 が膵細胞量・機能について評価した研究となる。血管内皮におけるインスリンシグナルについては、インスリン受容体は膵細胞機能、量には関与がないこと、その下流にある IRS2 は生体内においては膵細胞における血流の維持によりインスリン分泌に重要な役割を果たすが、単離した膵細胞は機能的に問題がないと報告されている。我々はインスリンシグナルのさらなる下流である PDK1 に着目し、血管内皮 PDK1 は膵細胞の血管構築や

血流に非常に大切な役割を果たし、膵細胞量、機能維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。このことで、血管内皮 PDK1 に着眼した新たな糖尿病治療法開発へのシーズとなる成果となったと考えられる。(Obata A, Kimura T, Obata Y, et al. Vascular endothelial PDK1 plays a pivotal role in the maintenance of pancreatic beta cell mass and function in adult male mice. Diabetologia. 2019;62(7):1225-1236. doi:10.1007/s00125-019-4878-1)

(3)血管内皮 PDK1 の発現制御の解明

この実験系はヒトでの血管内皮 PDK1 の mRNA 発現量は肥満と相関して低下していることから、「恒常的に発現している」とされていた PDK1 の発現がいかに制御されているのかを明らかにするために行った研究である。マウスにおいては、1 型糖尿病モデル、肥満 2 型糖尿病モデル(db/db マウス)、および高脂肪食負荷マウス(20 週間負荷)の血管内皮では、タンパクレベルで PDK1 の発現が変化することを明らかにし、その発現制御の一因として脂肪毒性や糖毒性に着眼した。ヒト臍帯動脈血管内皮細胞株を用いて、パルミチン酸負荷、ブドウ糖負荷などを行い PDK1 の mRNA の変化やタンパクレベルでの発現の変化を評価した。特にパルミチン酸負荷では濃度を上昇させると PDK1 の発現が mRNA のレベルでは低下するが、タンパクレベルでは逆に発現が上昇するという乖離現象が確認された。そのため、PDK1 の発現制御については、PDK1 だけでなく、そのリン酸化蛋白や、それらの分解過程に至る詳細な検討が必要であると考えられた。今後それらの点を評価していくことで、より詳細な PDK1 発現調整メカニズムについて新たな見地が得られると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Obata A, Kimura T, Obata Y, Shimoda M, Kinoshita T, Kohara K, Okauchi S, Hirukawa H, Kamei S, Nakanishi S, Mune T, Kaku K, Kaneto H	4. 巻 62
2. 論文標題 Vascular endothelial PDK1 plays a pivotal role in the maintenance of pancreatic beta cell mass and function in adult male mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 1225 ~ 1236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00125-019-4878-1.	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 -

1. 著者名 Kaneto H, Kimura T, Obata A, Shimoda M, Kaku K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Multifaceted Mechanisms of Action of Metformin Which Have Been Unraveled One after Another in the Long History.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22052596.	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 -

1. 著者名 Kaneto H, Obata A, Kimura T, Shimoda M, Kinoshita T, Matsuoka TA, Kaku K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Unexpected Pleiotropic Effects of SGLT2 Inhibitors: Pearls and Pitfalls of This Novel Antidiabetic Class.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 3062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22063062.	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 -

1. 著者名 Sanada J, Obata A, Obata Y, Fushimi Y, Shimoda M, Kohara K, Nakanishi S, Mune T, Kaku K, Kaneto H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Dulaglutide exerts beneficial anti atherosclerotic effects in ApoE knockout mice with diabetes: the earlier, the better.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80894-x.	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 -

1. 著者名 Kaneto H, Obata A, Kimura T, Shimoda M, Sanada J, Fushimi Y, Katakami N, Matsuoka T, Kaku K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Notable Underlying Mechanism for Pancreatic β -Cell Dysfunction and Atherosclerosis: Pleiotropic Roles of Incretin and Insulin Signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 9444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21249444.	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------