

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591051

研究課題名 (和文) 膵β細胞の増殖機構とその破綻の分子生物学的研究

研究課題名 (英文) Molecular biology of pancreatic islet β cell proliferation and failure

研究代表者

大杉 満 (OHSUGI MITSURU)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00420216

研究成果の概要 (和文)：(1)膵β細胞の IRS-2 量調節では、グルコース刺激が重要である。(2)グルコース刺激が CaMK-4、CREB を介して IRS-2 を調節している。(3)db/db マウスなどの膵β細胞代償不全モデルでは、グルコース・センシングに重要なグルコキナーゼ、Glut2 の発現低下が見られ、糖流入が減ることにより、IRS-2 が低下し、膵β細胞の保護システムが破綻すると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：(1) High glucose levels or glucose stimulation predominantly control pancreatic β cell IRS-2 levels. (2) A transcription factor CREB is critical for regulating β cell IRS-2 expression levels. Calmodulin dependent kinase 4 is stimulated by glucose, and the kinase appears to be the key component of complex regulation of CREB activation in pancreatic β cells. (3) In models of pancreatic β cell failure, such as db/db mice, critical molecules of glucose sensing, including glucokinase and glucose transporter 2, are downregulated, thus leading to a net decrease in glucose flux to β cells. With resultant reduction in IRS-2 levels, pancreatic β cell lose a key component of adaptive β cell proliferation and survival.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：膵β細胞、IRS、CREB

1. 研究開始当初の背景

肥満・インスリン抵抗性を基盤とする2型糖尿病の発症過程では、膵β細胞が初期にはインスリン分泌と細胞量を増大させて適応するが、それら適応が破綻すると糖尿病を発症すると考えられている。膵β細胞のインスリン分泌や増殖の代償的適応とその破綻の分子メカニズムを理解することは、効果的な糖尿病の予防と治療戦略を立てる上で重要と考えられる。

研究代表者が科学研究費補助金を受けて行った研究などで以下の事実を明らかにしてきた。(A) 膵β細胞に於けるインスリン受容体シグナル、なかでもIRS-2タンパクの重要性。培養細胞を用いた研究や(*J. Biol. Chem.* 280, 4992-5003, 2005、*Diabetes* 54, 968-975, 2005) 遺伝子改変動物を用いた報告(IRS-1ノックアウトマウス、IRS-2ノックアウトマウス、視床下部・β細胞特異的IRS-2ノックアウトマウス)、さらに共同研究

による遺伝子改変動物（ β 細胞特異的インスリン受容体欠損マウス、同IGF-I受容体欠損マウス*Nat. Genet.* 38, 583-588, 2006）によってインスリン受容体は膵 β 細胞において増殖、細胞死への抵抗性など多岐にわたる機能を担っていることが示された。インスリン受容体シグナルの中でもIRS-2が膵島 β 細胞の増殖において重要な役割を果たす。IRS-2欠損マウスではインスリン抵抗性に加え膵 β 細胞の増殖障害をきたし糖尿病を発症することを報告した(*Diabetes* 49:1880-1889, 2000)。膵 β 細胞特異的IRS-2欠損マウスを作成し、このマウスでも膵 β 細胞の増殖障害とインスリン分泌低下による耐糖能異常を呈すること(*J. Clin. Invest.* 114: 917-927, 2004)、さらに(*J. Clin. Invest.* 117, 246-257, 2007) IRS-2ノックアウト動物では高脂肪食負荷に対する代償性の膵島増殖・過形成が見られないこと、また膵 β 細胞の代償性肥大が促進される状況(高脂肪食負荷時)でも、膵 β 細胞におけるグルコース代謝が障害されているグルコキナーゼ欠損マウスにおいてIRS-2タンパクが上昇しないこと、これを発生工学的手法でIRS-2を上昇させると一部ではあるが糖尿病を改善できることから、膵 β 細胞の代償的過形成におけるIRS-2タンパクの重要性を提唱してきた。さらにIRS-2の発現調節メカニズムの詳細を研究し、現在までにグルコース刺激によってcAMP Responsive Element Binding Protein (CREB)が活性化されることによりIRS-2の発現が亢進することを見出した。

2. 研究の目的

肥満・インスリン抵抗性を基盤とする2型糖尿病の発症過程では、膵 β 細胞が初期にはインスリン分泌と細胞量を増大させて適応しているが、その二面の適応が破綻した際に糖尿病を発症すると考えられている。膵 β 細胞のインスリン分泌や増殖の代償的適応とその破綻の分子メカニズムを理解することは、効果的な糖尿病の予防と治療戦略を立てる上で重要と考えられる。本研究では次の三点を目的とする。(A) グルコース刺激・CREB活性化の膵 β 細胞増殖における重要性の確立。(B) 膵 β 細胞の機能・増殖破綻において、グルコース流入障害・IRS-2増加障害が果たす役割を明らかにすることを通じ、(C)膵 β 細胞の代償性肥大及び機能破綻を統一的に説明するモデルを提唱することを目的とする。

3. 研究の方法

A. カルモジュリン依存性キナーゼ(CaMK)ノックアウトマウスの膵 β 細胞の検討
カルモジュリン依存性キナーゼの中でもCaMK-IVがCREB活性化やIRS2発現調節に重要な役割を果たしていることを見出した。

CaMK-IVノックアウトマウスを入手し、現在実験のための繁殖中である。

今までの報告では、それらノックアウトマウスの糖代謝に関する報告はない。マウスを飼育する過程で以下のような点に着目して観察する。

- 体重、空腹時血糖、空腹時インスリン値、随時血糖値、随時インスリン値
- グルコース負荷試験、インスリン負荷試験を経時的に行う。
- 膵 β 細胞量。これは主に免疫組織学的検討を行う。
- 膵島における、IRS2量、CREBのリン酸化

必要に応じて、膵 β 細胞の代償的肥大を促すために、高脂肪食負荷か視床下部破壊なども考慮する。

B. 膵島代償破綻モデルにおける検討

同じレプチン作用欠損動物であってもdb/dbマウスと、ob/obマウスでは膵 β 細胞の代償能力に違いがある。db/dbマウスでは高血糖が持続し、膵島が癩痕化することから重度の糖尿病を発症する。それに対しob/obマウスでは、高血糖に対し膵島が持続的に増殖・肥大し、高インスリン血症によって血糖がある程度低下することが知られている。この二つのモデルに着目し、以下の検討を加える。

- 経時的に血糖値、インスリン値、耐糖能、膵島の免疫組織学的検討を行う。
- 遺伝子発現のパターンを、膵 β 細胞機能にとって重要と考えられる遺伝子の一群に焦点をあてて、解析を加える。Glut2、グルコキナーゼ、SUR1、Kir6.2、Pdx1、Hnf4 α などを予定している。

前述(c)は、機能が分かっている遺伝子に焦点をあてて解析を行うが、遺伝子の網羅的解析からも得られる情報は多いと考えられるため、DNAマイクロアレイによる解析も行う。本来はdb/dbマウスとob/obマウスの膵島遺伝子の発現解析を直接行いたい、マウスの遺伝子背景の違いを持ち込み解析が困難になることが予測される。そのため、db/dbマウスにはdb/+マウス、ob/obマウスにはB6Jマウスと遺伝子背景のそろったコントロールをおくことで、解析時の交絡因子を少なくする。

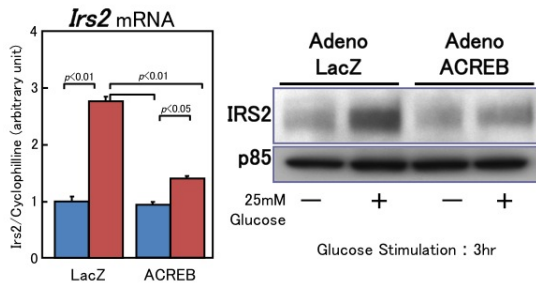
4. 研究成果

(1) 膵 β 細胞 IRS-2はグルコース刺激により上昇し、CaMK-4-CREBの経路で主に調節される。

マウス個体の絶食・再摂食の実験、高インスリン・正常血糖クランプ試験、単離膵島へ

の刺激実験、阻害剤を用いた検討などから、膵β細胞 IRS-2 はグルコースの刺激により調節され、ブドウ糖代謝が必要であること、カルシウム流入が必要であること、CaMK-4 を介した転写因子 CREB の活性化が転写調節に重要であることを見出した。(図)

また、グルコース刺激により、膵島 CaMK-4 が活性化されることも見出した。

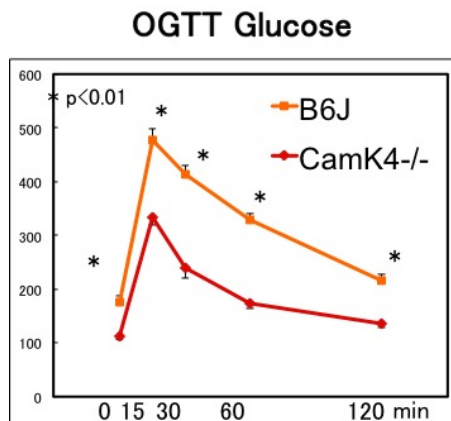


(2) CaMK-4 ノックアウトマウスの解析

(1)の結果を受けて、CaMK-4 ノックアウトマウスの表現系解析に進んだ。

CaMK-4 ノックアウトマウスとその対照の B6J マウスに高脂肪食をかけ、糖負荷試験による耐糖能、インスリン感受性、膵β細胞量、を計測した。

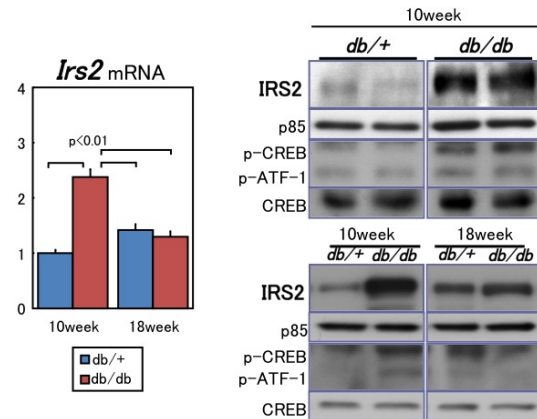
図に見られるように CaMK4 ノックアウトマウスは高脂肪食負荷においては対照マウスに比べ、耐糖能が良好であった。インスリン感受性は両群で変化がなく、インスリン分泌が亢進していたことから、膵β細胞量の増加ならびに、インスリン分泌能亢進が考えられた。



CaMK-4 ノックアウトマウスの単離膵島を用いた実験から、むしろグルコース刺激下での IRS-2 上昇は亢進していた。生理的な条件では、CREB のリン酸化を主に担うのは CaMK-4 であり、他のキナーゼを抑制していることが示唆された。CaMK-4 をノックアウトするような条件では、PKA などのキナーゼにより CREB がリン酸化され得るという複雑な調節システムを持つことが判明した。

(3) 糖尿病モデル動物での IRS-2 量調節

経時的に耐糖能が悪化し、膵β細胞量も低下する db/db マウスと、同じレプチン作用不全がありながら、膵β細胞が代償性肥大を続ける ob/ob マウスを比較した。膵β細胞が代償性肥大を起こしている 10 週齢の db/db マウス膵島では、IRS-2 が上昇しているが、それが破綻した 18 週齢では IRS-2 は対照マウスの膵島と変わらない量になっていた。対照的に ob/ob マウス膵島では週齢が進んでも IRS-2 量は高いままで維持されていた。分子メカニズムとしては db/db マウス膵島ではグルコキナーゼ、Glut2 など糖流入に重要な遺伝子発現の低下が見られ、これが膵島 IRS-2 低下に至ることが考えられた。



(4) 結論

以上の解析から、(1)膵β細胞の IRS-2 量調節では、グルコース刺激が重要である。(2)グルコース刺激が CaMK-4、CREB を介して IRS-2 を調節している。(3) db/db マウスなどの膵β細胞代償不全モデルでは、グルコース・センシングに重要なグルコキナーゼ、Glut2 の発現低下が見られ、糖流入が減ることにより、IRS-2 が低下し、膵β細胞の保護システムが破綻すると考えられる。

5. 主な発表論文

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)、すべて査読有り

1. Hashimoto S, Okamoto M, Awazawa M, Okazaki Y, Ohsugi M, Inabe K, Umehara T, Yoshida M, Kakei M, Kitamura T, Luo J, Kulkarni RN, Kahn CR, Kasai H, Cantley LC, Kadowaki T: Class IA Phosphatidylinositol 3-Kinase in Pancreatic β Cells Controls Insulin Secretion by Multiple Mechanisms. *Cell Metab.* 2010 Dec 1;12(6):619-32.
2. Okazaki Y, Eto K, Yamashita T, Okamoto M, Ohsugi M, Noda M, Terauchi

- Y, Ueki K, Kadowaki T : Decreased Insulin Secretion and Accumulation of Triglyceride in beta Cells Overexpressing a Dominant-Negative Form of AMP-Activated Protein Kinase. *Endocr J*. 2010;57(2):141-52
3. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki I, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R : CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* 2009;15(8):914-20.
 4. Hashimoto H, Arai T, Mori A, Kawai K, Hikishima K, Ohnishi Y, Eto T, Ito M, Hioki K, Suzuki R, Ohsugi M, Saito M, Ueyama Y, Okano H, Yamauchi T, Kubota N, Ueki K, Tobe K, Tamaoki N, Kadowaki T, Kosaka K : Reconsideration of Insulin Signals Induced by Improved Laboratory Animal Diets, Japanese and American Diets, in IRS-2 Deficient Mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009 Nov;117(10):577-86
 5. Watanabe T, Kubota N, Ohsugi M, Kubota T, Takamoto I, Iwabu M, Awazawa M, Katsuyama H, Hasegawa C, Tokuyama K, Moroi M, Sugi K, Yamauchi T, Noda T, Nagai R, Terauchi Y, Tobe K, Ueki K, Kadowaki T : Rimobant ameliorates insulin resistance via both adiponectin-dependent and adiponectin-independent pathways. *J Biol Chem*. 2009 Jan 16;284(3):1803-12.
 6. Hashimoto H, Eto T, Kamisako T, Hoya N, Hatakeyama T, Arai T, Yokosuka M, Ohnishi Y, Ito M, Hioki K, Suzuki R, Ohsugi M, Saito M, Ueyama Y, Yamauchi T, Kubota N, Tobe K, Kadowaki T, Tamaoki N, Nomura T, Kosaka K : An Efficient Reproductive Method for Irs2(-/-) Mice with C57BL/6Jx129/SvEv Genetic Background. *Exp Anim*. 2008;57:407-11.
 7. Takamoto I, Terauchi Y, Kubota N, Ohsugi M, Ueki K, Kadowaki T : Crucial role of insulin receptor substrate-2 in compensatory beta-cell hyperplasia in response to high fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes Obes Metab*. 2008;10(Suppl 4):147-56.
 8. Arai T, Hashimoto H, Kawai K, Mori A, Ohnishi Y, Hioki K, Ito M, Saito M, Ueyama Y, Ohsugi M, Suzuki R, Kubota N, Yamauchi T, Tobe K, Kadowaki T, Kosaka K : Fulminant type 1 diabetes mellitus observed in insulin receptor substrate 2 deficient mice. *Clin Exp Med*. 2008;8:93-9
 9. Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Mineyama T, Ogata H, Tokuyama K, Ohsugi M, Sasako T, Moroi M, Sugi K, Kakuta S, Iwakura Y, Noda T, Ohnishi S, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T : Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab*. 2008 Jul 2;8(1):49-64.
 10. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Ohsugi M, Kubota T, Fujiu K, Maemura K, Kubota N, Kadowaki T, Nagai R : SUMOylation of Kruppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta. *Nat Med*. 2008 Jun;14(6):656-66.
- [学会発表] (計 9 件)
1. 勝山修行、大杉満、窪田直人、植木浩二郎、門脇孝、膝島 IRS-2 量調節の分子機構：肥満・糖尿病モデルにおける IRS-2 量、第 3 回日本肥満症治療学会学術集会 (2010 年 9 月 11 日・東京)
 2. 大杉満、勝山修行、窪田直人、植木浩二郎、門脇孝、膝島 IRS-2 量調節の分子機構：分子メカニズム、第 3 回日本肥満症治療学会学術集会 (2010 年 9 月 11 日・東京) 口頭発表
 3. 勝山修行、大杉満、窪田直人、植木浩二郎、門脇孝、膝島 IRS-2 量調節の分子機構 1: 肥満・糖尿病モデルにおける IRS-2 量、第 53 回日本糖尿病学会学術総会 (2010 年 5 月 27 日・岡山) 口頭発表
 4. 大杉満、勝山修行、窪田直人、植木浩二郎、門脇孝、膝島 IRS-2 量調節の分子機構 2: 分子メカニズム、第 53 回日本糖尿病学会学術総会 (2010 年 5 月 27 日・岡山) 口頭発表
 5. 大杉満、窪田直人、小林正稔、笹子敬洋、金子和真、勝山修行、植木浩二郎、門脇孝：膝島代償性増殖とその破綻における膝島 IRS-2 量調節の分子機構 第 59 回日本体質医学会総会 (2009 年 7 月 26 日・東京) 口頭発表
 6. 大杉満、窪田直人、戸邊一之、小林正稔、笹子敬洋、金子和真、勝山修行、植木浩二郎、門脇孝、膝島代償性増殖とその破綻における膝島 IRS-2 量調節の分子機構：CaM キナーゼ 4-転写因子 CREB の役割、第 52 回日本糖尿病学会学術総会 (2009 年 5 月 22 日・大阪) 口頭発表
 7. 勝山修行、大杉満、窪田直人、戸邊一之、

小林正稔、笹子敬洋、金子和真、植木浩二郎、門脇孝、膝島代償性増殖とその破綻における膝島 IRS-2 量調節の分子機構：糖代謝の重要性、第 52 回日本糖尿病学会学術総会（2009 年 5 月 22 日・大阪）口頭発表

8. Mitsuru Ohsugi, Naoto Kubota, Kohjiro Ueki, and Takashi Kadowaki. Glucose-CREB-IRS-2 Pathway is Responsible for the Failure of Compensatory β Hyperplasia in the Progression to Diabetes. American Diabetes Association Annual Scientific Sessions, San Francisco, CA, USA, June 6, 2008. Oral Presentation

9. 大杉満、膝 β 細胞の代償性増殖とその破綻における IRS-2 の役割、第 51 回日本糖尿病学会学術総会（2008 年 5 月 22 日・東京）シンポジスト

〔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：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大杉 満 (OHSUGI MITSURU)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00420216

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

門脇 孝 (KADOWAKI TAKASHI)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：30185889

植木 浩二郎 (UEKI KOHJIRO)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：00396714

窪田 直人 (KUBOTA NAOTO)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：50396719