

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16526

研究課題名(和文)膵細胞におけるHSP72によるグルカゴン分泌調節機構の解明

研究課題名(英文)The elucidation of regulatory mechanisms of glucagon secretion through HSP72 in pancreatic alpha cells.

研究代表者

北野 さやか (KITANO, SAYAKA)

熊本大学・病院・医員

研究者番号：10855745

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)：TC細胞やdb/dbマウスにおいてHSP72を活性化させると培養液中及び血中グルカゴン濃度の低下や、膵島の免疫染色においてMET群でグルカゴン染色面積が低下した。また細胞内ストレスの減弱、インスリンシグナルの改善を認めた。以上からHSP72は膵細胞の保護作用及があることが分かった。さらに、膵細胞特異的HSP72発現マウスの作成を行ったため、時期・臓器特異的にHSP72を活性化させ膵細胞におけるHSP72の働きにより糖代謝がどのように変化するか今後さらに解析していく予定とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HSP72発現レベルを増強させることによって、生活習慣病や慢性炎症を改善し、糖尿病発症予防から治療まで、さらには細胞保護効果から細小血管合併症の抑制、また心血管系の保護にも働くことから大血管合併症の進行抑制にも寄与できる可能性が期待できる。今回その中でも膵臓における膵細胞保護作用、インスリン分泌能への作用は解明されつつあるものの、膵細胞における作用は依然として不明なままである。そこで、今回膵細胞におけるHSP72の機能が明らかとなれば、膵細胞におけるHSP72の細胞保護作用も合わせ膵臓のHSP72をターゲットとした創薬へ寄与できる可能性が広がる。

研究成果の概要(英文)：Activation of HSP72 in TC cells and db/db mice decreased glucagon levels in culture medium and blood, and reduced glucagon staining area in the MET group in immunostaining of pancreatic islets. In addition, intracellular stress was attenuated and insulin signaling was improved. These results indicate that HSP72 has a protective effect on pancreatic α -cells. Furthermore, since mice expressing HSP72 specifically in pancreatic α -cells were generated, we plan to further analyze how glucose metabolism is altered by HSP72 in pancreatic α -cells by activating HSP72 in a time- and organ-specific manner.

研究分野：代謝内科学分野

キーワード：HSP72 膵細胞 細胞内ストレス 糖代謝 グルカゴン分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、インスリン抵抗性や慢性炎症に伴う細胞内ストレスでその活性が低下し、このストレスを減弱させると抗糖尿病効果が得られる新たな糖尿病治療のターゲットとして「熱ストレス応答経路(heat shock response: HSR)」に着目して研究を継続している。HSRを制御する主要分子HSP72の発現は、インスリンシグナルにより調節されているため、インスリン抵抗性やインスリン分泌不全ではHSP72発現が低下する。HSP72は、通常温熱刺激により誘導される分子シャペロンで、生体における種々のストレス因子に対して抵抗性を獲得するために発現が誘導される。HSP72発現を誘導するものとして熱ショックの他にも、虚血、運動、放射線といった物理的刺激や、酸化ストレス、小胞体ストレス、 β -adrenergic signal といった細胞内シグナル、ゲラニルゲラニルアセトン(Geranylgeranylacetone: GGA)、デキサメサゾン、アスピリン、NSAIDsなどの薬剤がある。HSP72は小胞体ストレスや酸化ストレスといった様々なストレスから細胞保護的に働いており、その他にも異常蛋白の修復、アポトーシスの抑制、タンパク質の活性制御、炎症性シグナル分子の抑制にも寄与する。したがって、2型糖尿病患者ではHSP72の発現が低下しており、さらにそのことがインスリンシグナルを減弱するといった悪循環に陥っていることが示唆され、これを代償できない場合には生体の代謝恒常性維持機構の破綻を来すこととなる。逆に、HSP72の発現を増強させると細胞機能回復と炎症シグナルの抑制を介した糖代謝、インスリン抵抗性の改善につながり、糖尿病治療の新たな一手となり得る。

2. 研究の目的

HSP72発現レベルを増強させることによって、生活習慣病や慢性炎症を改善し、糖尿病発症予防から治療まで、さらには細胞保護効果から細小血管合併症の抑制、また心血管系の保護にも働くことから大血管合併症の進行抑制にも寄与できる可能性が期待できる。しかし、このような臨床的効果が認められる一方、HSP72発現が個々の臓器においてどのように作用しているかは不明な点が多く残されており、その中でも膵臓における膵 β 細胞保護作用、インスリン分泌能への作用は解明されつつあるものの、膵 α 細胞における作用は依然として不明なままである。そのため、本研究ではマウス膵臓 α 細胞由来の α TC clone6 cell (以下 α TC cell) を用いてHSP72過剰発現またはノックダウンを行い膵 α 細胞における細胞ストレスマーカーがどのように変化するかを検討し、また全身性HSP72ノックアウトマウス(以下 HSP72KO)を用いて膵島におけるグルカゴンの分泌を評価することで、膵 α 細胞におけるHSP72の機能を理解することを目的とする。さらに、HSP72KOの膵 α 細胞特異的にHSP72を発現回復させ、臓器間・分子相互作用の解析を行う。膵 α 細胞におけるHSP72の機能が明らかとなれば、膵 β 細胞におけるHSP72の細胞保護作用も合わせ膵臓のHSP72をターゲットとした創薬へ寄与できる可能性が広がる。

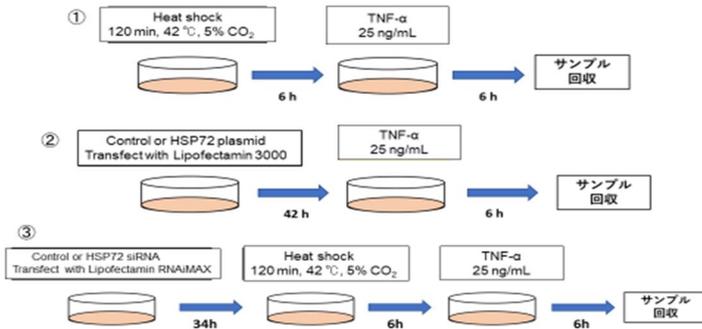
3. 研究の方法

- 1) α TC cell を用いてHSP72過剰発現を行いグルカゴン分泌、細胞ストレスマーカーの変化を解析する。
- 2) HSP72KOの膵島を単離し、ストレス負荷によるグルカゴン分泌・膵 α 細胞機能評価を行う。
- 3) db/db マウスに温熱微弱電流刺激(MET)を行いグルカゴン・膵 α 細胞機能の評価。
HSP72KOに代わり、db/db マウスにMET処置をしHSP72を誘導することで膵 α 細胞機能の評価。
- 4) HSP72KOに対し、膵 α 細胞特異的にHSP72を発現回復させるトランスジェニックマウスを作成し代謝状態・体組成・慢性炎症などを検討、膵 α 細胞におけるHSP72の役割を解明する。

- 1) α TC cell を用いてHSP72過剰発現または発現抑制を行いグルカゴン分泌、細胞ストレスマーカーの変化を解析する。

α TC cell に熱ショック、HSP72過剰発現プラスミド、HSP72 siRNA を用いてHSP72を過剰発現または発現抑制を行い、以下のような解析を行う。代謝状態・体組成・慢性炎症などを検討、膵 α 細胞におけるHSP72の役割を解明する。

αTC cell を用いたHSP72過剰発現または発現抑制実験



- ・小胞体ストレスマーカー (Bip、CHOP、PERK など) の変化を解析。
- ・グルカゴン分泌刺激を行い、グルカゴン分泌量を測定。
- ・グルカゴン分泌 (MafB、Arx、PAX6 など) に関連する遺伝子発現。

- ・炎症性ストレスマーカー (JNK、NF-κB、IL-6 など) の変化を解析。

2) HSP72KO の膵島を単離し、ストレス負荷によるグルカゴン分泌・膵α細胞機能評価を行う。

- ・高脂肪食負荷を行った HSP72 ノックアウトマウスの膵島を単離し、グルコース刺激に対するグルカゴン分泌刺激を施行。グルカゴン分泌 (MafB、Arx、PAX6 など) に関連する遺伝子発現の変化を調査する。

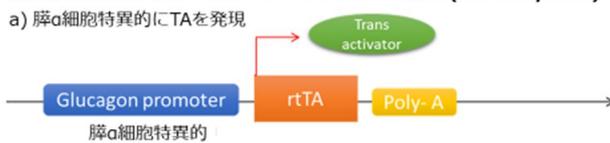
3) db/db マウスの膵島におけるグルカゴン・膵α細胞の発現を評価する。

db/db マウスへ MET 処置を行い以下のような解析を行う。

- ・蛍光免疫染色による膵島形態学的調査 (α 細胞量、膵島内の α 細胞と β 細胞の比率など)
- ・空腹時血漿中インスリン・グルカゴン濃度の測定。

4) HSP72KO に対し、膵α細胞特異的に HSP72 を発現回復し代謝状態・体組成・慢性炎症などを検討し、膵α細胞における HSP72 の役割を解明する。

膵α細胞特異的にHSP72をマーカーとともに発現制御 (Tet-on system)



b) 膵α細胞特異的にTA発現があり、そこにDox-ONにてmCherryとHSP72発現を増強



c) HSP72 KOに時期・膵α細胞特異的にHSP72発現を回復させて表現型を検討する。

- ・左記の図の様に a.b 各々のベクターを共発現するマウスラインを構築し、HSP72KO と交配する。

- ・DOX 投与の時期により、時期特異的・臓器特異的 HSP72 発現回復モデルマウスを作成。

- ・高脂肪食負荷を行い、糖代謝・体組成など表現型を検討する。

4. 研究成果

1)

α TC cell を用いて HSP72 の発現が膵 α 細胞における細胞ストレス、グルカゴン分泌に与える影響を解析。

α TC 細胞において、ヒートショックは各ストレスシグナルを減弱させ、 α TC 細胞における各ストレスシグナルの減弱には、少なくとも一部に HSP72 が関与していた。HSP72 は α TC 細胞におけるインスリンシグナルを改善させた。HSP72 はグルカゴン転写因子 Pax6 の mRNA レベルに関与している可能性があった。以上から HSP72 は膵 α 細胞の保護作用があることが分かった。また、*in vitro* にて高グルコース刺激、低グルコース刺激の両方で α cell への TNF- α 刺激によりグルカゴン分泌が上昇し、HSP72 過剰発現によりそのグルカゴン分泌が抑制されることが分かった。

2)

HSP72KO の膵島を単離しストレス負荷によるグルカゴン分泌・膵 α 細胞機能評価。通常食で飼育した 24 週齢の WT、HSP72KO から膵島単離を行い TNF α で刺激、その後各 Glucose 濃度の培地に移し、上清のインスリン、グルカゴン濃度を測定。高 Glucose 刺激では、HSP72KO で TNF- α 刺激によりグルカゴン濃度が有意に上昇、逆にインスリン濃度が WT に比較し優位に低下。よって、HSP72 の存在下では高 Glucose・TNF- α 刺激においてインスリン分泌は上昇し、グルカゴン分泌は抑制、またインスリン分泌亢進に伴い、 α 細胞内での負の制御が強くなり、さらにグルカゴン分泌を抑制すると考えられた。

3)

db/db マウスに温熱微弱電流刺激 (MET) を行いグルカゴン・膵 α 細胞機能を評価。HSP72KO に代わり、db/db マウスに MET 処置をし HSP72 を誘導することで膵 α 細胞機能を評価。通常食で飼育、MET 群とコントロール群を比較検討。MET 群では、血中グルカゴン濃度の低下や、膵島の免疫染色において MET 群で有意にグルカゴンの染色面積が低下するなどの結果が得られた。

4)

膵 α 細胞特異的 HSP72 発現マウスの作成 Tet-on 調節プラスミドを組み込んだ Tg マウス、及び Tet-on 応答プラスミドを組み込んだ Tg マウスを作成。それぞれを交配し、Tet-HIP(+/-)/TRE-HSP72(+/-)/HSP72(-/-)を得ている。Tet-on system はドキシサイクリン存在下で目的遺伝子を発現するシステムである。リバーステトラサイクリントランスアクチベーターに DOX が結合すると、応答因子の TRE に結合し目的遺伝子の転写が促進される。また、DOX を除去することで転写を止めることもできる。調整、応答プラスミドが機能するかどうかの確認は細胞実験を用いて行った。プラスミドを Lipofectamin で導入後にドキシサイクリンを導入し、HSP72 の発現を確認した。Tet-HIP + TRE-HSP72 のプラスミド及びドキシサイクリンを負荷すると、HSP72 の発現が上昇し HIP-promoter が正常に作用することが分かった。

膵 α 細胞特異的 HSP72 発現マウスの解析 高脂肪食投与及び 8 週齢でドキシサイクリンを投与しコントロールマウスと発現型の比較を行った。しかし、体組成及び糖代謝に関しては今回コントロールと比較し優位差を認めなかった。今後はドキシサイクリンの投与時期の変更等考慮し改めて実験を行いたいと考えている。

総括

以上の結果より、HSP72 は膵 α 細胞における各ストレスシグナルの減弱、及びインスリンシグナルを改善させることで膵 α 細胞の保護作用があることを示した。また、ストレス状況下において HSP72 の存在はグルカゴン分泌を抑制し糖代謝の改善に寄与している可能性が考えられる。しかし、カテコラミン/糖質コルチコイド等の血糖上昇作用のあるホルモンとの兼ね合いで、結果的に生体での血糖値はどのように変動するかは今後さらに *in vivo* での検討が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 27. 渡邊拓郎、近藤龍也、宮川展和、吉積臨太郎、北野さやか、井形元維、瀬ノ口隆文、松村剛、荒木栄一
2. 発表標題 Heat Shock Protein 72(HSP72)が膵 細胞に及ぼす影響.
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会九州地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊拓郎、近藤龍也、宮川展和、吉積臨太郎、北野さやか、井形元維、河島淳司、瀬ノ口隆文、松村剛、荒木栄一
2. 発表標題 膵 細胞におけるHeat Shock Protein 72(HSP72)の関与
3. 学会等名 第70回日本体質医学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------