

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17503

研究課題名（和文）膵細胞における細胞内代謝変化に着目した糖尿病病態の解明

研究課題名（英文）Research for intracellular metabolism in pancreatic beta-cell under diabetic condition

研究代表者

野本 博司（NOMOTO, Hiroshi）

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50862330

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らは糖尿病状態において、膵細胞の細胞内エネルギー代謝が酸化リン酸化から解糖系へとシフトするという細胞内代謝変化に着目し、その機序として膵島における解糖系酵素PFKFB3の発現亢進が重要であることを明らかとてきた。本申請課題において、日本人2型糖尿病患者の膵細胞においてもPFKFB3が種々の程度に発現していることを明らかとし、病態との関連も示した。さらに肥満糖尿病モデル動物や膵細胞株を用いて、この細胞内代謝変化に可逆性があり、糖尿病治療の内容により異なる影響を与えることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題により、日本人の2型糖尿病患者において膵細胞の細胞内代謝異常と密接に関連するPFKFB3の発現が亢進していることが明らかとなった。患者背景や背景膵の組織像がこのPFKFB3の発現に関連し、さらに種々の糖尿病病態への介入が更新したPFKFB3の発現を改善させることが明確となった。今後は糖尿病病態下で発現が増強しているPFKFB3の意義の解明や、直接の治療標的となりうるかの検討を行うことが必要である。

研究成果の概要（英文）：We focused on the intracellular metabolic changes in pancreatic β -cells in which energy metabolism shifts from oxidative phosphorylation to glycolysis via PFKFB3 expression in diabetic conditions.

In this application, we clarified that PFKFB3 is expressed at various levels in the pancreatic β -cells of Japanese subjects with type 2 diabetes, and showed its relationship closely correlated with patients' background. Furthermore, using obese diabetic model mice and pancreatic β -cell strains, we demonstrated that this intracellular metabolic change is reversible and that intervention on diabetic condition can affect different outcome on intracellular metabolisms.

研究分野：糖尿病・内分泌

キーワード：糖尿病 膵細胞 細胞内代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の病態を考えるうえで、進行性に低下する膵細胞の機能・量の調節機構を解明することは重要である。一方で、治療の観点からは膵細胞の各種ストレスに対する保護・代償メカニズムについての理解も同様に必要である。近年、2型糖尿病モデル動物の膵島では、十分な酸素下においても癌細胞と同様に解糖系が亢進しており(Warburg効果)、この病態がインスリン分泌不全へ関与していることが提唱された¹⁾。しかしその詳しいメカニズムは不明であった。これまで申請者は、欧米人のヒト膵島ならびに糖尿病モデル動物を用いて、代謝ストレスがミトコンドリアの機能障害を惹起し酸化的リン酸化を障害し、これがHIF1 /PFKFB3経路を活性化させ、細胞内代謝を解糖系にシフトさせることで膵細胞の機能障害に関与する可能性を示してきた^{2), 3)}。しかし欧米人とわれわれ日本人とでは糖尿病の病態が大きく異なるため、このような変化が同様に生じているかは定かではなかった。また、具体的にどのような代謝ストレスがこのような細胞内代謝変化を引き起こすのか、さらには糖尿病病態への治療介入により細胞内代謝変化が是正されるのかは未知であった。

2. 研究の目的

(1) 欧米人の糖尿病患者剖検膵や単離膵島で確認された、糖尿病病態下における膵細胞のPFKFB3活性化を中心とした細胞内代謝変化が、遺伝的背景・ライフスタイル・糖尿病病態・膵島病理所見の大きく異なる日本人糖尿病患者においても確認されるのかを検討する。

(2) 膵細胞の細胞内代謝変化を引き起こす原因については未知の部分が多い。培養細胞や動物モデルを用いてどのような刺激が細胞内代謝変化を引き起こし、さらには糖尿病病態への治療介入がこの変化を是正させうるかを、特に肥満・糖尿病病態に着目して生化学的・分子生物学的に明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 日本人糖尿病患者における膵細胞の細胞内代謝変化の検討

日本人剖検膵を用い、糖尿病の有無・程度によって膵島(特に膵細胞)における細胞内代謝が変化しているかを免疫組織学的に検討した。弘前大学に保管されている非糖尿病患者・2型糖尿病患者のパラフィン包埋ヒト膵組織から4 μ m厚の切片を作成し、PFKFB3・インスリン・グルカゴンなどに対する抗体を用いて蛍光多重免疫染色を行った。1切片あたり100個の膵島を蛍光顕微鏡(BZ-X710, KEYENCE)を用いて撮影し、PFKFB3陽性膵細胞比率ならびにPFKFB3の蛍光シグナル強度を解析装置(BZ-X Analyzer, KEYENCE)を用いて定量し比較検討した。さらに膵細胞のPFKFB3陽性細胞率と各種患者背景情報、ならびに膵の病理学的所見との関連について、検討を行った。本検討は北海道大学病院 生命・医学系研究倫理審査委員会の承認を受け施行された(自019-0300)。

(2) 膵細胞株・マウス膵島を用いた解糖系へ細胞内代謝をシフトさせる因子の探索

膵細胞株ならびにマウス単離膵島を用い、どのような刺激や負荷が膵細胞のPFKFB3の発現を上昇させるかを探究し、更に糖尿病病態への種々の介入により是正しうるかを検討した。事前検討において、過食に伴う肥満・糖尿病を発症するob/obマウスにおいて膵細胞のPFKFB3陽性細胞率が上昇し、週数の進行とともにこの陽性率が上昇することを明らかとしていた。

① 膵細胞株 INS-1 832/13細胞ならびにマウス単離膵島を用いた検討

グルコース濃度変化により膵細胞におけるPFKFB3の発現が変化するかを検討した。INS-1 832/13細胞株を低~高グルコース環境で24時間培養し、細胞を回収しPFKFB3を始めとする遺伝子・タンパク質の発現解析を行った。次に高グルコース環境で培養した細胞を低グルコース環境に戻すことで、PFKFB3の発現に変化を生じるかを検討した。これらの実験をC57BL/6Jマウスの単離膵島においても検討した。

ob/obマウスを用いた検討

6週齢の雄性ob/obマウスを2群に分け自由摂餌下、あるいは2g/日の摂餌制限下にて4週間飼育し、その間の血糖値・体重・摂餌量について検討した。対照群として同週齢の雄性ob/+マウスを用いた。インスリン抵抗性評価や糖負荷試験ののちに安楽死させ、膵の摘出ないし膵島の単離を行い、これらを用いて免疫染色やPFKFB3を始めとする遺伝子・タンパク質の発現解析を行った。次に8週齢の雄性ob/obマウスを3群に分け、自由摂餌下、2g/日の摂餌制限下、SGLT2阻害薬の投与下にて4週間飼育し、上記と同様の解析を行った。介入方法の違いによる遺伝子発現変化を網羅的に解析するために、単離膵島を用いたDNAマイクロアレイ解析も追加した。

4. 研究成果

(1) 剖検膵切片の検討を、2型糖尿病患者18例、非糖尿病症例18例の計36名において行った。年齢・BMIは、それぞれ70.3±7.7 vs 64.3±12.8歳、22.7±4.4 vs 23.3±4.5 kg/m²であり、2型糖尿病症例における糖尿病罹病期間は11.3±9.7年であった。剖検膵切片の蛍光免疫染色におけるPFKFB3陽性率は、膵細胞では2型糖尿病症例で有意に高値であり(23.9±16.2% vs 11.0±8.7%, p<0.05)膵細胞では両群間での陽性率に差を認めなかった。膵細胞におけるPFKFB3陽性細胞率と膵細胞容積の間には有意な負の相関を認めた。2型糖尿病症例においてPFKFB3陽性細胞率と年齢、罹病期間との間に相関を認めなかったが、BMIと負の相関を認めた。膵の組織学的所見との関連については、膵細胞のPFKFB3陽性率と膵島のアミロイド沈着率との間に、2型糖尿病症例において正の相関を認めた(ρ=0.50, p<0.05)。膵の線維化面積との関連においても、2型糖尿病症例において正の相関を認めた(ρ=0.84, p<0.05)。これらのことから、日本人の2型糖尿病においても膵細胞におけるPFKFB3の種々の程度での発現亢進が確認され、背景となる病態、膵の病理変化との関連があることが示唆された。細胞質におけるPFKFB3の過剰な発現は解糖系代謝を亢進させるが、核における発現が特に増強していた。一般に核におけるPFKFB3の発現は細胞増殖や保護のシグナルに関連することから、糖尿病病態下でのストレス応答の一環である可能性も想定される(図1)。

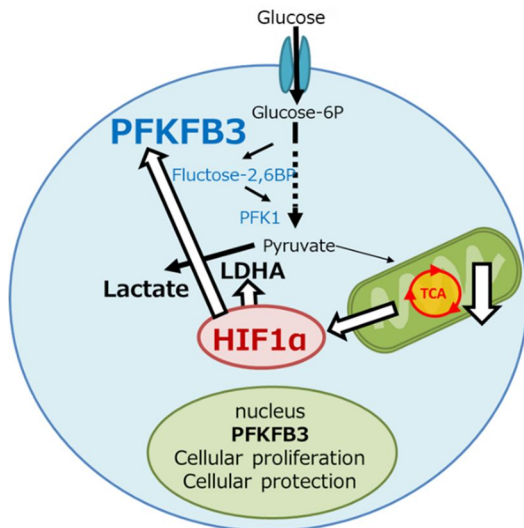


図1 糖尿病における膵細胞の細胞内代謝変化

(2) INS-1 832/13細胞を各種グルコース濃度(5.5mM、11mM、22mM グルコース)で培養し、回収した細胞からタンパク質を抽出し PFKFB3 の発現レベルを比較検討した。5.5mM の培養と比し、11mM、22mM での培養下で、有意に PFKFB3 の発現亢進が確認された。また、同様の実験を C57BL/6J マウスの単離膵島においても施行し、同様の結果を得た。次にグルコース応答性に発現が誘導された PFKFB3 が、培地のグルコース濃度を変化させることで是正されるかを検討した。11mM グルコース環境で培養された INS-1 細胞を、高グルコース環境に一定時間暴露したのちに低グルコース環境へと移行させたところ、高グルコース培地で誘導された PFKFB3 の発現亢進は是正されることが確認された。

週齢の進行とともに膵細胞における PFKFB3 が亢進することを事前に確認した ob/ob マウスを用いて、摂餌制限による体重・高血糖の抑制が PFKFB3 発現上昇を予防しうるかを検討した。6週齢から4週間の摂餌制限により、ob/ob マウスの体重増加は有意に抑制され、随時血糖値は ob/+マウスと同等で推移した。これらのマウスの単離膵島を用いて解糖系酵素群の発現を比較したところ、摂餌制限が行われたマウスの単離膵島では PFKFB3 や LDHA など解糖系酵素群のタンパク発現の亢進が是正されていた。このことより、早期の肥満糖尿病病態への予防的介入が、膵細胞の細胞内代謝変化を防ぐことができる可能性が示唆された。

次にすでに膵細胞の細胞内代謝へ変化が生じている、8週齢の雄性 ob/ob マウスを用いて、各種の肥満糖尿病病態に対する介入がすでに生じた細胞内代謝変化を是正しうるかを検討した。4週間の摂餌制限は、上記の実験と同様に有意に体重・血糖値を低下させた。一方で SGLT2 阻害薬の4週間投与では、血糖値は摂餌制限を行った群と同等に低下したものの、体重は自由摂餌のマウスと同等であった。免疫染色において膵島の PFKFB3 発現は自由摂餌に比し摂餌制限を行った群と SGLT2 阻害薬の投与を行った群において低下しており、単離膵島を用いたウエスタンブロット法による解析でも、同様の結果を認めた。最後に、膵細胞の細胞内代謝を是正しうるこれら2種類の介入において、細胞に生じている変化の違いを明確とするために、単離膵島の DNA マイクロアレイ解析を行った。自由摂餌飼育と比較した際に、摂餌制限を行った群の方が SGLT2 阻害薬による介入よりも多くの遺伝子において発現比率の変化が確認された。パスウェイ解析においては、特に摂餌制限群において酸化的リン酸化やアミノ酸代謝、電子伝達系など、細胞内代謝に関連する経路が有意であった。

これらの検討により細胞内代謝異常には可変性があり、糖尿病への治療介入の方法による差異が存在しうる事が明らかとなった。

<引用文献>

1) Sasaki M, et al. Diabetes. 2013 Jun;62(6):1996-2003
 2) Nomoto H, et al. Nat Commun. 2019 Jun 18;10(1):2679
 3) Nomoto H, et al. Diabetologia. 2020 Jan;63(1):149-161

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名	Rimi Izumihara, Hiroshi Nomoto, Koki Chiba, Hiraku Kameda, Akinobu Nakamura, Hideaki Miyoshi, Hiroki Mizukami, Tatsuya Atsumi
2. 発表標題	Relation between Metabolic Remodeling in Pancreatic β -cells and Pancreas Histology in Autopsy Cases with Type 2 Diabetes
3. 学会等名	American Diabetes Association 's 83rd Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年	2022年～2023年

1. 発表者名	Koki Chiba, Hiroshi Nomoto, Rimi Izumihara, Hiraku Kameda, Hideaki Miyoshi, Akinobu Nakamura, Tatsuya Atsumi
2. 発表標題	Intracellular Metabolic Change in Rodent Pancreatic β -cells under Diabetic Condition is Flexible and May Compensate for Glucose Intolerance
3. 学会等名	American Diabetes Association 's 83rd Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年	2022年～2023年

1. 発表者名	泉原里美、野本博司、千葉幸輝、亀田啓、中村昭伸、三好秀明、水上浩哉、渥美達也
2. 発表標題	日本人2型糖尿病患者の膵 細胞内代謝変化の機序の解明
3. 学会等名	第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年	2022年～2023年

1. 発表者名	千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、中村昭伸、三好秀明、渥美達也
2. 発表標題	肥満糖尿病病態への介入は膵島の細胞内代謝変化を是正する
3. 学会等名	第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年	2022年～2023年

1. 発表者名 泉原里美、野本博司、千葉幸輝、亀田啓、曹圭龍、中村昭伸、三好秀明、水上浩哉、渥美達也
2. 発表標題 剖検膵を用いた日本人2型糖尿病膵 細胞における代謝リモデリングの検討
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、曹圭龍、中村昭伸、三好秀明、渥美達也
2. 発表標題 肥満糖尿病病態への介入による膵 細胞の細胞内代謝変化
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 千葉幸輝、野本博司、泉原里美、亀田啓、曹圭龍、中村昭伸、三好秀明、渥美達也
2. 発表標題 肥満糖尿病病態への介入による膵 細胞の細胞内代謝変化
3. 学会等名 第35回日本糖尿病肥満動物学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Rimi Izumihara, Hiroshi Nomoto, Koki Chiba, Kyu Yong Cho, Akinobu Nakamura, Hideaki Miyoshi, Hiroki Mizukami, Tatsuya Atsumi
2. 発表標題 Metabolic Remodeling in Pancreatic Beta Cells in Japanese Patients with Type 2 Diabetes
3. 学会等名 American Diabetes Association 's 82nd Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Koki Chiba, Hiroshi Nomoto, Rimi Izumihara, Hiraku Kameda, Kyu Yong Cho, Akinobu Nakamura, Hideaki Miyoshi, Tatsuya Atsumi
2. 発表標題 Effect of Energy Restriction on the Intracellular Metabolism of Rodent Pancreatic Beta-Cells In Vitro and Obese Mice
3. 学会等名 American Diabetes Association 's 82nd Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 野本博司, Slavica Tudzarova, Lina Pei, Chiara Montemurro, Tatyana Gurlo, Peter C. Butler, 中村昭伸, 渥美達也
2. 発表標題 欧米人2型糖尿病膵島ではHIF1 /PFKFB3経路が活性化することで膵島内代謝が解糖系へとシフトする
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
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
---------	---------