

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591132

研究課題名（和文） インクレチンによる膵β細胞増殖・抗アポトーシス作用の細胞内メカニズムの検討

研究課題名（英文） Investigation for intracellular mechanisms of pancreatic β-cell proliferation and anti-apoptotic effect of incretin

研究代表者 清野 裕 (SEINO YUTAKA)

京都大学 医学研究科 名誉教授

研究者番号：40030986

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病では小胞体ストレス(ERS)がβ細胞機能の障害の一因であることが指摘されている。インクレチンの一つ、GLP-1の受容体作動薬 exendin-4(Ex-4)の投与により、Akita マウスのβ細胞障害が抑制され、β細胞の数・量が保たれた。このβ細胞保護効果は、インスリン非依存的に血糖を低下するフロリジンを用いた場合は認められなかったことから血糖低下効果とは独立した作用であることが示唆された。β細胞のアポトーシス、ERS マーカーである CHOP の発現が著明に減少していたことから、Ex-4によるβ細胞保護効果はERSの軽減を介してアポトーシスを抑制して発揮されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Endoplasmic reticulum stress (ERS) is one of the contributing factors in the development of type 2 diabetes. Exendin-4 (Ex-4), a potent GLP-1 receptor agonist, significantly reduced blood glucose levels and preserved β-cell mass and the number of islets in Akita mice, an animal model of ER stress-mediated diabetes. Since there was no such effect observed in the mice treated with phlorizin, an insulin-independent glucose-lowering drug, the effects were suggested to be independent of glucose-lowering effect of Ex-4. Akita mice treated with Ex-4 showed a significant decrease in apoptosis of β-cells and significantly reduced CHOP mRNA and protein levels in β-cells, suggesting that β-cell protective effects of Ex-4 were achieved mainly through a reduction of ER stress-mediated β-cell damage and apoptotic cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

1. 研究開始当初の背景  
GLP-1 や GIP などのインクレチンは腸管か

ら分泌されるホルモンであり、研究代表者らは、これらのインクレチンが食後早期に膵β

細胞からのインスリン分泌を増強し食後高血糖の抑制に働くこと (*Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; *Am J Physiol*, 2003; *Eur J Endocrinol*, 2004; *Diabetes*, 2004 など) や、GIP が脂肪細胞にも直接作用し糖や脂肪の取り込みを促進させることを明らかにしてきた (*Nature Med*, 2002)。また、これらインクレチンは、細胞内 cAMP 濃度の調節によってインスリン分泌を促進するが、同時に膵β細胞の再生・増殖を促進する (*Diabetes*, 2001; 2004 など) ほか、アポトーシスを抑制する (*Endocrinology*, 2003 など) ことも報告されている。膵β細胞の増殖に cAMP-PKA を介した経路が関与していること (*Mol Cell Biol*, 2004 など) が報告されており、インクレチンによる膵β細胞増殖にも PKA を介した経路の関与が想定されるが、その下流の詳細な機構は明確にはなっていない。さらに、PKA を介した経路のみならず、EGF 受容体から PI-3 キナーゼを介した経路などいくつかの経路の関与が示唆されているが、インクレチンの生体内での膵β細胞の再生・増殖、アポトーシス抑制の効果や、その詳細な細胞内機構などについては不明な点が多かった。一方、膵β細胞機能の障害は糖尿病発症の重要な要因であり、2 型糖尿病において膵β細胞は経年的に機能が低下すると同時に数的・量的にも減少することが、UKPDS などの大規模臨床試験で示唆されている。特に日本人の 2 型糖尿病はインスリン分泌不全が主体となることが多く、進行性にインスリン分泌が低下する。この膵β細胞障害の機序の一因として、小胞体ストレス(ERS)が注目されている。

現在臨床応用され糖尿病治療の新たな選択肢として定着しつつあるインクレチンシグナルを活用したインクレチン関連糖尿病治療薬 (GLP-1 受容体作動薬や DPP-4 阻害薬) は、インスリン分泌を増強させるだけでなく、長期的使用により膵β細胞量を増加させ糖尿病を改善する効果や、糖尿病早期より使用することにより膵β細胞の減少を抑制する効果が期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、インクレチンによる膵β細胞増殖や抗アポトーシス作用について、その細胞内情報伝達機構を明らかにすることを目的とした。実験には、ERS が原因で糖尿病を発症する自然発症糖尿病マウスをモデル動物とし、GLP-1 シグナルの増強が、ERS によって惹き起こされる膵β細胞障害に与える効果について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象：モデル動物

Akita マウスは、インスリン 2 遺伝子の点突

然変異により、インスリン A 鎖と B 鎖を結合する S-S 結合が形成されなくなることから、蛋白構造が変化した異常インスリンが小胞体に蓄積することで、ERS を介したアポトーシスが惹起され、高度の膵β細胞障害を来たす自然発症糖尿病モデルマウスである。

### (2) 薬物投与、組織学的検討

この Akita マウスに対し、GLP-1 アナログである exendin-4 (Ex-4) を 2 週齢から 4 週齢までの 2 週間、24nmol/kg、1 日 2 回腹腔内投与し、血糖値、膵ラ氏島の形態的变化および小胞体ストレスマーカー (CHOP) に関して、PBS 投与群と比較した。また同時にアポトーシス (TUNEL)・細胞増殖能 (PCNA) についても免疫染色を用いて組織学的に検討した (図 1)。さらに血糖値の改善による膵島保護効果と GLP-1 シグナル固有の作用とを区別するため、Akita マウスにフロリジンを投与し、Ex-4 投与群と同等の血糖値に低下させた群で、同様の検討を行った。

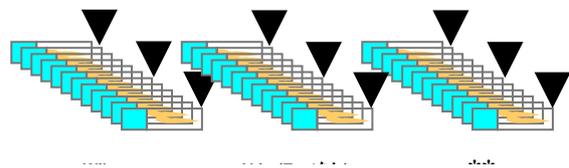


図 1 組織学的検討 (インスリン染色)

各群の膵臓摘出標本から 5 枚おきに 5 枚の切片を抽出、インスリン染色し、陽性領域の面積・数を測定した。

### (3) 分子生物学的検討

それぞれのマウスより、コラゲナーゼ法により膵島を単離し、RT-PCR 法にて messenger RNA を抽出した。ERS の関連分子の発現について、CHOP, Bip, XBP-1, 細胞増殖には Cyclin-D1 について、定量的 real time PCR を用いて検討した。また、糖毒性解除の影響が見られない条件下での Ex-4 の膵β細胞における小胞体ストレス関連分子の発現を比較するため、Akita マウスに Ex-4 を 2 日間投与し、同様に検討を行った。

### (4) Akita 細胞を用いた蛋白発現の検討

Akita マウスと同様インスリン 2 遺伝子の異常をもつ膵β細胞株の Akita 細胞をもちいて、ERS のマーカーの発現について、Western blot 法を用いて検討した。

## 4. 研究成果

### [研究の結果]

(1) Ex-4 投与群では PBS 投与群に比し血糖値の上昇が有意に抑制されていた (図 2)。そこで、フロリジン群では、フロリジンを同等の血糖になるよう調整して投与した。観察期間中の各群の体重に著明な差は見られなかった。

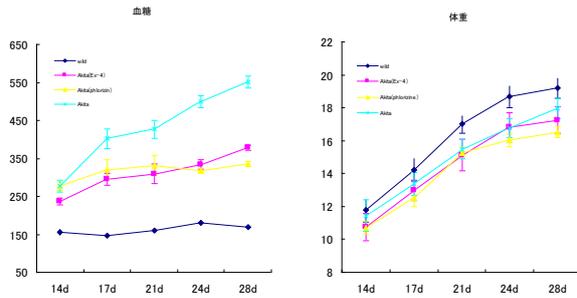
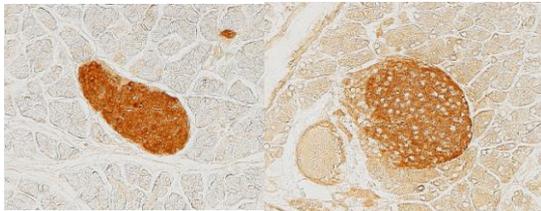


図2 随時血糖・体重

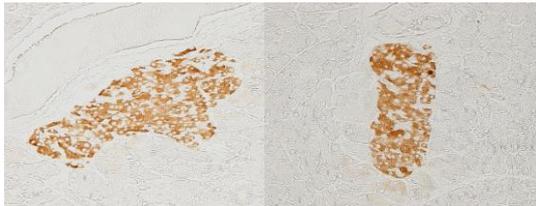
(2) 膵ラ氏島の組織学的検討: Ex-4 投与群では PBS 投与群に比べ膵ラ氏島面積は高値で、PBS 投与群に見られたインスリン染色陽性部分の染色性低下や形状の崩壊が抑制されていた(図 3,4)。一方、PBS 投与群・フロリジン投与群の間には有意な差を認めなかった。



Wild(正常)の膵島



PBS 群の膵島

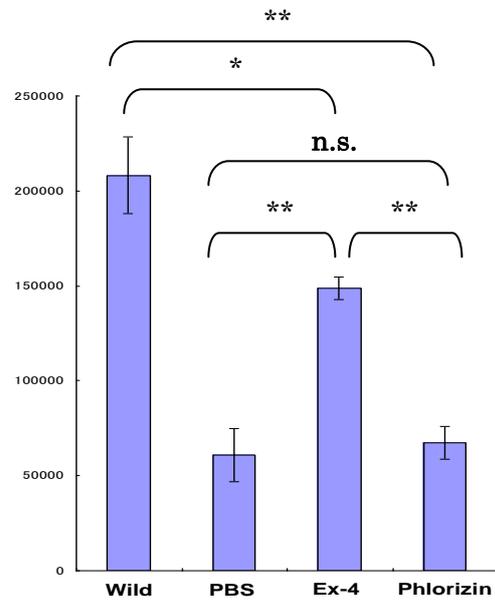


Ex-4 群の膵島

図3 膵ラ氏島の組織

(3) ERS に対する影響の検討: 定量的 real time PCR を用いて検討した膵島での CHOP の mRNA 発現量は、Ex-4 投与群で PBS 群に比し有意に低値であった(図 5)。また免疫染色により比較した膵ラ氏島単位面積あたりの TUNEL 陽性細胞数は Ex-4 投与群で有意に減少し(図 6)、PCNA 陽性細胞数は増加の傾向を示した(図 7)。同様の傾向がフロリジン投与群においても認められたが、Ex-4 投与群はフ

ロリジン群に対しても有意に TUNEL 陽性細胞数を抑制していた。



(\* p<0.05, \*\*p<0.01)

図4 インスリン陽性細胞面積の比較

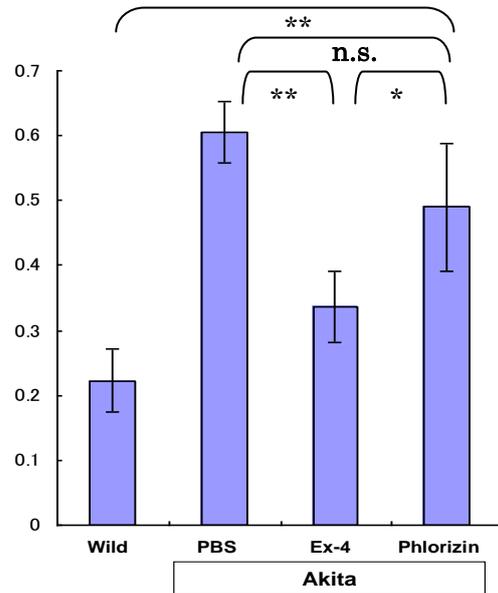
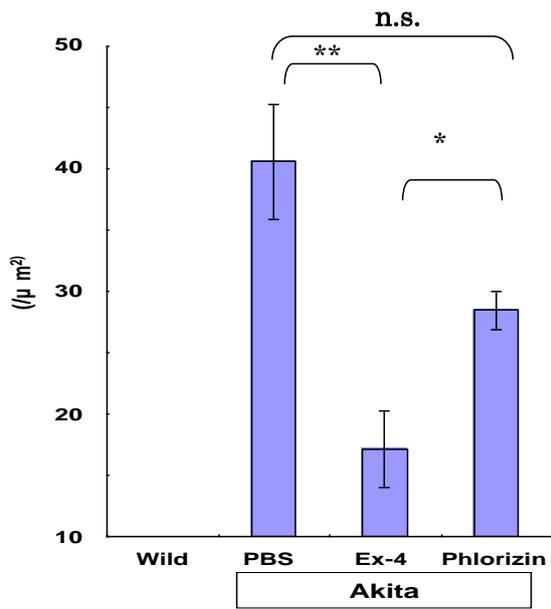


図5 CHOP mRNA の比較



(\* p<0.05, \*\*p<0.01)

図6 膵島あたりのTUNEL陽性細胞数の比較

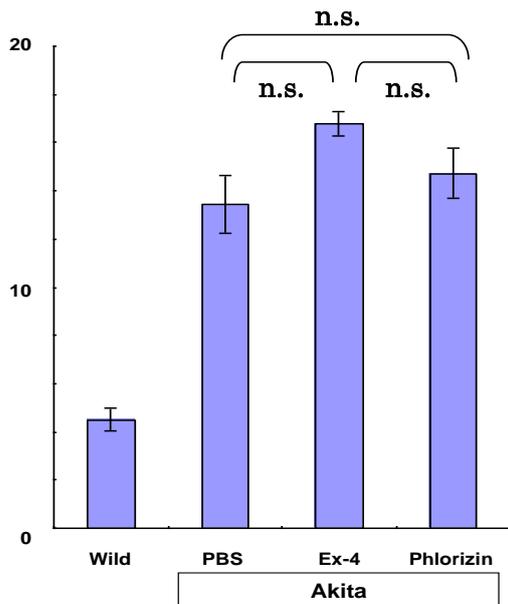


図7 膵島あたりのPCNA陽性細胞数の比較

(4) Akita マウスに対する Ex-4 短期投与  
Ex-4 投与による糖毒性解除の影響が見られない条件下での、膵β細胞における小胞体ストレス関連分子の発現を比較するため、Akita マウスに対する Ex-4 2 日間投与を行い、膵β細胞を単離、RT-PCR 法により CHOP, Bip, XBP-1 の発現を PBS 投与群と比較した。また同様に増殖の指標として Cyclin-D の発現も比較した。2 日間の投与では、PBS 投与群、Ex-4 投

与群で、血糖値・体重ともに有意な差を認めなかった。

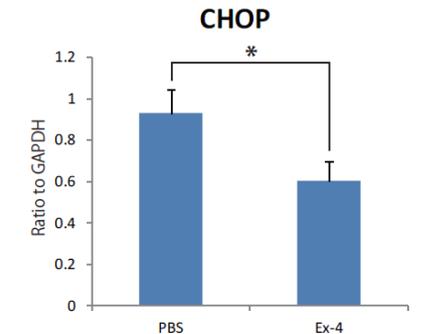
Ex-4 (0.1mg/kg, 1 日 2 回, 腹腔内投与 日齢 21 日から 23 日, n=4)

随時血糖・体重

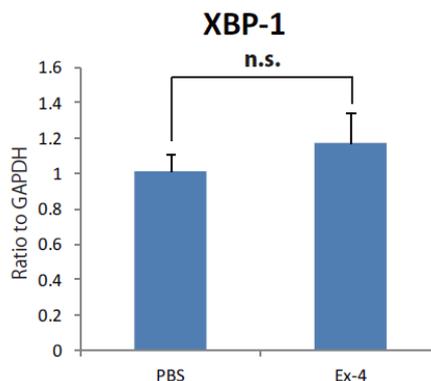
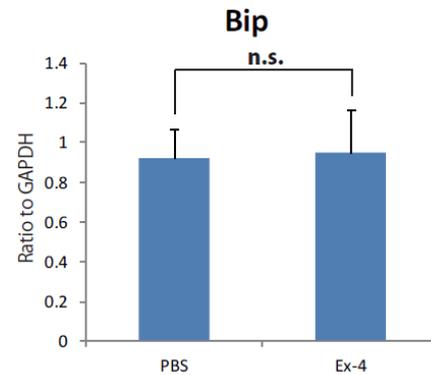
血糖(mg/dl)	21d	23d
PBS	432.4±24.8	501.3±13.2
Ex-4	420.9±19.9	498.8±20.3

体重(g)	21d	23d
PBS	15.6±0.45	16.6±0.67
Ex-4	15.4±0.60	16.9±0.56

(5)CHOP に関しては Ex-4 投与群で PBS 投与群にくらべ有意に低値であったが、Bip および XBP-1 については両群で有意な差を認めなかった。Cyclin-D についても両群で有意な差を認めなかった(図 8)。



\*p<0.05



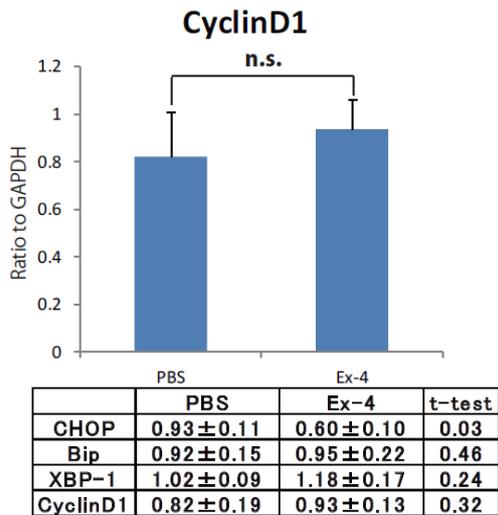


図8 RT-PCRによるERストレス、細胞増殖マーカーのmRNA発現の検討

(6) Akita細胞に対するEx-4の効果

Akitaマウスの同様の変異を持つ膵β細胞の細胞株であるAkita細胞に対してEx-4を投与し、小胞体ストレスマーカーであるCHOP, Bipの発現をWestern blot法を用いて、タンパクレベルで経時的に評価した(n=5)(図9)。

Exendin-4 50nM or Vehicle

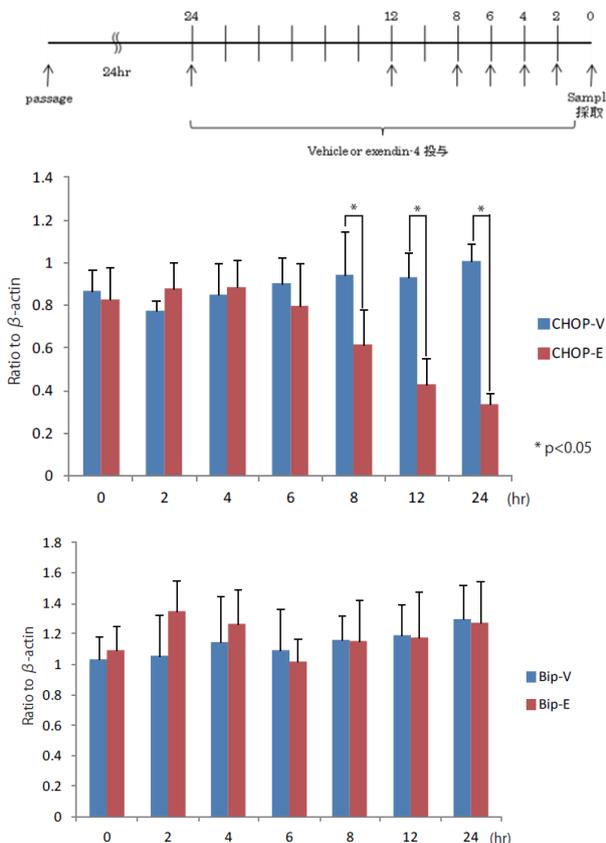


図9 Akita細胞におけるCHOP, Bipの蛋白発現

CHOPに関してはEx-4投与群でPBS投与群にくらべて有意に低値であったが、Bipについては両群で有意な差を認めなかった。

Akitaマウスに対してEx-4を2週間投与した際にはCHOP, BipともmRNAの発現低下を認めたが、今回の短期投与および細胞株に対する投与では、Bipに関して発現低下は認められなかった。このことから、膵β細胞においてEx-4は、CHOPの発現に対してより直接的に作用しており、vivoの2週間投与で認められたBipの発現低下は、糖毒性解除を介した間接的な効果である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(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)

Yamane S, Hamamoto Y, Toyoda K, Seino Y, Inagaki N et al. GLP-1 receptor agonist attenuates ER stress-mediated β-cell damage in Akita mice. *Journal of Diabetes Investigation* 2: 2011: 79-154. 査読有 DOI:10.1111/j.2040-1124.2010.00075.x

Ogawa E, Yamane S, Toyoda K, Seino Y, Inagaki N et al. The effect of gastric inhibitory polypeptide on intestinal glucose absorption and intestinal motility in mice *Biochemical Biophysical Research Communication* 404: 2011: 115-120. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.077

Yabe D, Seino Y. Two incretin hormones GLP-1 and GI: comparison of their actions in insulin and β cell preservation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107: 2011: 248-256. 査読有 DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2011.07.010

Himeno T, Seino Y et al. Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice. *Diabetes* 60: 2011: 2397-2406. 査読有 DOI: 10.2337/db10-1462

Seino Y. Understanding the incretin effect. *Journal of Endocrinology and Metabolism* 96: 2011: 934-935. 査読無 DOI: 10.1210/jc.2011-0329

Yabe D, Seino Y. Two incretin hormones GLP-1 and GIP: Comparison of their actions in insulin secretion and  $\beta$  cell preservation. Progress in Biophysics and Molecular Biology 2011 査読有 DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2011.07.010

矢部大介、清野裕  
Immunoassays for incretin hormones GIP and GLP-1. 日本臨床 69: 2011: 946-950. 査読無 DOI:該当無し

矢部大介、清野裕  
The history of incretin hormones. 日本臨床 69: 2011: 755-760. 査読有 DOI:該当無し

Kawasaki Y, Toyoda K, Yamane S, Seino Y, N.Inagaki et al. Exendin-4 Protects Pancreatic Beta Cells from the Cytotoxic Effect of Rapamycin by Inhibiting JNK and p38 Phosphorylation. Hormone and Metabolic Research 42:2010:311-317. 査読有 DOI: 10.1055/s-0030-1249035

Maida A, Seino Y, et al. Differential importance of glucose-dependent insulinotropic polypeptide vs glucagon-like peptide 1 receptor signaling for beta cell survival in mice Gastroenterology. 137:2009: 2146-57. 査読有 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.09.004

[学会発表] (計 7 件)

山根俊介、原田範雄、山田千積、豊田健太郎、浜本芳之、清野裕、稲垣暢也  
GLP-1 アナログによる Akita マウスの小胞体ストレス減少効果  
第 5 回日本糖尿病学会年次学術集会 2009 年 5 月 21 日, 大阪

山根俊介、浜本芳之、原田範雄、豊田健太郎、清野裕、稲垣暢也  
GLP-1 receptor activation attenuates beta cell damage in Akita mice  
第 45 回欧州糖尿病学会 2009 年 9 月 30 日 ウィーン、オーストリア

清野裕  
Clinical Implication of Incretin Treatment in Asian type 2 Diabetes  
3rd AASD Plenary Lecture 2011 年 7 月 22-24 日, 北京、中国

矢部大介、清野裕  
Incretin-Based Drugs; Potential and

Problems in Asian Countries  
4th Asian Islet Biology and Incretin Study Group (AIBIS) Symposium, Plenary Lecture, 2011 年 7 月 22-24 日, 北京、中国

清野裕  
糖尿病専門診療のあり方  
第 54 回 日本糖尿病学会年次学術集会 Symposium 16, 2011 年 5 月 21 日, 札幌

矢部大介、清野裕  
日本人 2 型糖尿病患者にインクレチン関連薬の有効性—日本人のインクレチン分泌と実臨床での効果を踏まえて  
第 54 回 日本糖尿病学会年次学術集会 Symposium 2, 2011 年 5 月 21 日, 札幌

山根俊介、原田範雄、豊田健太郎、清野裕、稲垣暢也  
The effects of glucose and meal ingestion on incretin secretion in Japanese subjects with normal glucose tolerance.  
47<sup>th</sup> annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes 2011 年 9 月 14 日, リスボン、ポルトガル

[その他]  
ホームページ等  
[http://metab-kyoto-u.jp/to\\_doctor/achievements\\_2004.html](http://metab-kyoto-u.jp/to_doctor/achievements_2004.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清野 裕 (SEINO YUTAKA)  
京都大学・医学研究科・名誉教授  
研究者番号：40030986

### (2) 研究分担者

浜本 芳之 (HAMAMOTO YOSHIYUKI)  
公益財団法人田附興風会医学研究所 北野病院・第 3 研究部・研究員  
研究者番号：50390787  
豊田 健太郎 (TOYODA KENTAROU)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00447971

### (3) 連携研究者

山根 俊介 (YAMANE SHUNSUKE)  
京都大学・医学研究科・特定助教  
研究者番号：