

機関番号：24402

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790878

研究課題名 (和文) レプチンの膵β細胞機能と量における役割

研究課題名 (英文) Role of leptin in pancreatic beta-cell growth and function

研究代表者

森岡 与明 (MORIOKA TOMOAKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：30382154

研究成果の概要 (和文)：膵β細胞におけるレプチンシグナルの欠損は、GLP-1、スルホニル尿素剤や遊離脂肪酸によるインスリン分泌促進効果を増強し、GLP-1の効果についてはcAMP-CREB経路の促進によるものが考えられた。また遊離脂肪酸の膵ラ氏島への慢性投与後のインスリン分泌能は、レプチンシグナルの欠損により顕著に障害された。以上より、レプチンが栄養素や薬剤によるβ細胞機能調節に関与する可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：We found the insulinotropic effects of GLP-1, sulfonylureas and free fatty acid (FFA) are enhanced in mouse pancreatic islets lacking leptin signaling. GLP-1-induced intracellular cAMP-CREB pathway was enhanced in those β-cells. Furthermore, the detrimental effect of chronic FFA treatment on insulin secretion, or “lipotoxicity”, was augmented in islets lacking leptin signaling. These results indicate leptin signaling modulates nutritional or therapeutic insulin secretion in pancreatic β-cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・糖代謝異常，糖尿病，シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

肥満を伴う糖尿病においては、脂肪細胞由来の種々の液性因子、いわゆる「アディポカイン」が末梢組織のインスリン感受性のみな

らず、膵β細胞の機能と量をも調節することが示唆されている。我々は以前より、肥満状態において高濃度に認められ食欲抑制作用を有するレプチンに着目し、その膵β細胞

胞における役割を検討する目的で臍特異的レプチン受容体欠損マウス(臍 ObR-KO)を作成し、解析を進めてきた。当マウスにおいては対照に比べ、グルコース応答性インスリン分泌能の増強と臍 β 細胞増殖の促進を認め、さらに食餌性肥満により誘導される臍 β 細胞機能・増殖能や全身の耐糖能はより顕著に障害された(Morioka T, et al, *J Clin Invest* 117: 2860, 2007)。

これらの結果から、レプチンが直接的に臍 β 細胞の機能と増殖を制御し、肥満・インスリン抵抗性状態における臍 β 細胞代償不全に関与する可能性が示唆された。しかしながら、肥満・糖尿病状態にみられる高インスリン血症や臍 β 細胞障害、およびそれらの栄養素・栄養状態や薬剤による調節に対して、臍 β 細胞におけるレプチンシグナルの果たす役割とその機序は未だ十分に解明されてはいない。

2. 研究の目的

(1) 臍 β 細胞レベルでのレプチン作用障害と、glucagon-like peptide (GLP)-1, 遊離脂肪酸や糖尿病治療薬であるスルホニル尿素剤のインスリン分泌促進効果との関連性とそれらの機序につき検討する。

(2) 遊離脂肪酸の慢性投与により誘導される β 細胞機能障害(“脂肪毒性”)とレプチンシグナルとの関連性と機序につき検討する。

本研究によりレプチンが消化管ホルモン、栄養素や薬剤による臍 β 細胞機能調節や脂肪毒性において果たす役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GLP-1 の臍 β 細胞作用に及ぼすレプチンシグナルの影響

①臍 ObR-KO マウスおよび対照(ObRlox)マウス臍より単離しサイズマッチした単一ラ氏島を微小循環チップにて灌流し、グルコース応答性(3, 8, 15 mM)刺激後のラ氏島細胞内カルシウムイオン($[Ca^{2+}]_i$)の変化を蛍光色素比色法(fura-2)により、インスリン分泌(GSIS)を連続的イムノアッセイにより測定する。同時にレプチンやGLP-1投与を行いそれらの $[Ca^{2+}]_i$ とGSISに対する効果を検討する。

②siRNA法によりレプチン受容体(ObR)をノックダウンしレプチンシグナルを70%以上減弱させたMIN6細胞株(MIN6-siObR細胞)を用い、GLP-1アナログのエキセンジン4投与による細胞内シグナルをCREB蛋白のリン酸化

(ウェスタン解析)やホスホジエステラーゼ(PDE)酵素活性の測定により解析する。

(2) 血糖降下薬スルホニル尿素(SU)剤の臍 β 細胞作用に対するレプチンシグナルの影響

①前述の臍 ObR 欠損ラ氏島の灌流実験においてグリベンクラミド(1 μ M)を投与し $[Ca^{2+}]_i$ の変化とインスリン分泌への影響を対照ラ氏島と比較検討する。

②MIN6-siObR細胞においてグリベンクラミド(1 μ M)投与によるインスリン分泌の変化をstatic incubation法により測定し対照細胞と比較検討する。またSU受容体発現量をリアルタイムPCR法とウェスタン解析により検討する。

(3) 臍 β 細胞における遊離脂肪酸の効果とレプチンシグナルとの関連

①臍 ObR 欠損ラ氏島の灌流実験においてパルミチン酸(0.5 mM)をグルコース刺激と同時に投与(10分間)し、その $[Ca^{2+}]_i$ 変化とインスリン分泌に対する急性効果を検討する。

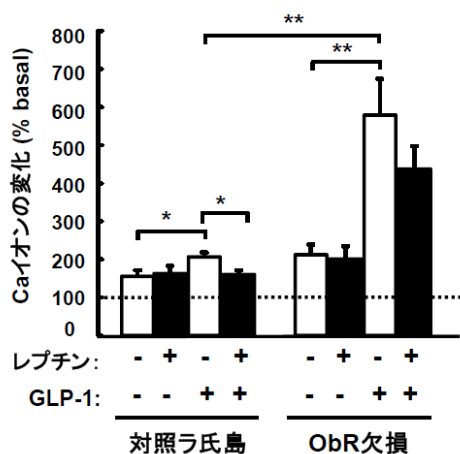
②臍 ObR 欠損ラ氏島の灌流実験においてグルコース刺激前にパルミチン酸(0.5mM)を48時間投与し、グルコース応答性 $[Ca^{2+}]_i$ 変化とインスリン分泌への影響を脂肪酸の慢性効果として対照ラ氏島と比較検討する。

③MIN6- β 細胞株においてパルミチン酸(0.5 mM)投与48時間後の小胞体ストレス状態を解析し、レプチンシグナルとの関連性につき検討する。

4. 研究成果

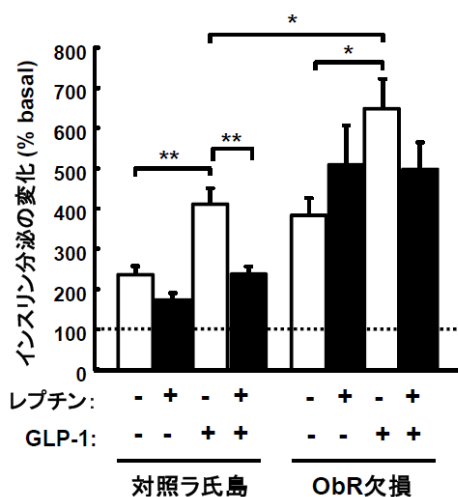
(1) ObR 欠損ラ氏島において GLP-1 効果は増強する。

①対照マウス臍ラ氏島において、GLP-1(10nM)は糖応答性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を32.9%増強し(vehicle: 156% vs. GLP-1; 207%), その効果はレプチンの同時投与(10 nM)により22.7%減弱した(leptin; 160%) (図1A左, *, $P < 0.05$)。一方ObR-KO臍ラ氏島においては、糖応答性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇へのGLP-1効果は対照に比べ有意に増強し(ObRlox; 206.6% vs. ObR-KO; 579%), この効果はレプチンによる抑制を受けなかった(図1A, **, $P < 0.01$)。



(図 1A: GLP-1 による膵ラ氏島 [Ca²⁺]_i の変化)

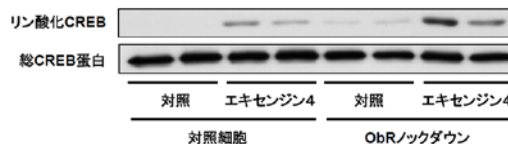
また、糖応答性 [Ca²⁺]_i 上昇に対する効果に合致して、GLP-1 は対照マウスにおいて GSIS を有意に増強させ (vehicle; 239% vs. GLP-1; 414%), この効果はレプチンにより抑制された (leptin; 240%) (図 1B 左, **, *P* < 0.01). 一方, ObR-KO 膵ラ氏島において GLP-1 投与は対照よりも強い GSIS の増強効果を発揮し (ObR-KO; 650%), その効果はレプチンによる抑制を受けなかった (図 1B 右, *, *P* < 0.05). 同じグルコース濃度で比較しても ObR-KO ラ氏島における GLP-1 効果の増強は対照に比して有意であり, グルコース刺激による効果とは独立していると言えた. なお, サイズマッチした膵ラ氏島のインスリン含量と GLP1 受容体発現量は対照と ObR-KO とで同程度であった.



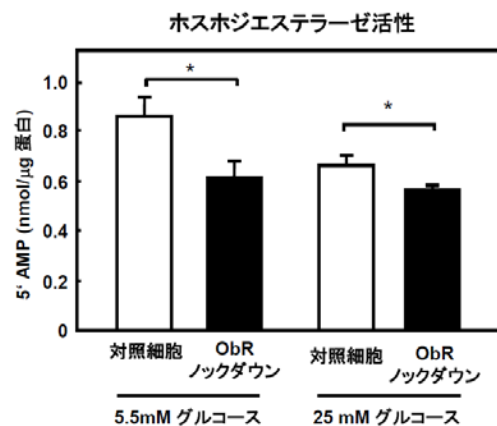
(図 1B: GLP-1 によるラ氏島インスリン分泌の変化)

②レプチンシグナルの減弱した MIN6-siObR 細胞において, GLP-1 アナログ (exendin-4, 10 nM) により誘導される CREB 蛋白のリン酸化は

対照細胞に比して有意に増強した (図 1C). ホスホジエステラーゼ (PDE) は細胞内 cAMP の分解酵素であり cAMP/PKA シグナル伝達経路を負に調節する. MIN6 細胞においては PDE3B アイソフォームが最も豊富に発現しており, その遺伝子・蛋白発現量は ObR ノックダウンにより影響を受けなかった. しかしながら PDE 酵素活性は MIN6-siObR 細胞において対照細胞に比べ有意に減弱しており (図 1D), それによる細胞内 GLP-1/cAMP/CREB シグナル伝達の増強が示唆された.



(図 1C: 膵 ObR をノックダウンした MIN6 β 細胞における GLP-1 シグナルの増強効果)



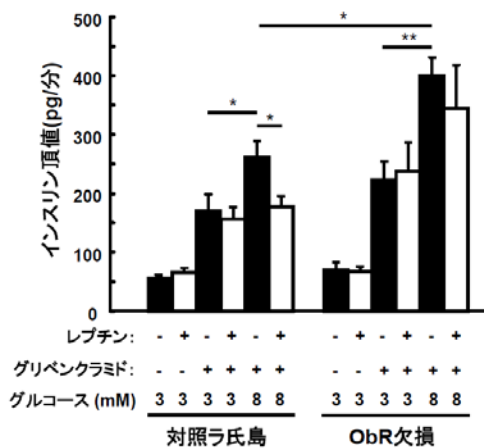
(図 1D: 膵 ObR をノックダウンした MIN6 β 細胞における GLP1 誘導性の PDE 活性抑制効果)

(2) ObR 欠損膵ラ氏島において SU 剤は [Ca²⁺]_i とは独立して GSIS を増強する.

① SU 剤グリベンクラミド (1 μM) は, 対照, ObRKO とも同様に膵ラ氏島の [Ca²⁺]_i を約 5 倍程度増強させ, [Ca²⁺]_i はグルコース刺激やレプチン投与による影響を受けなかった. この結果はグリベンクラミドの投与により β 細胞の ATP 感受性 K チャネルが完全に閉鎖し, 細胞内 Ca²⁺流入が飽和状態にあることを示唆するものであった.

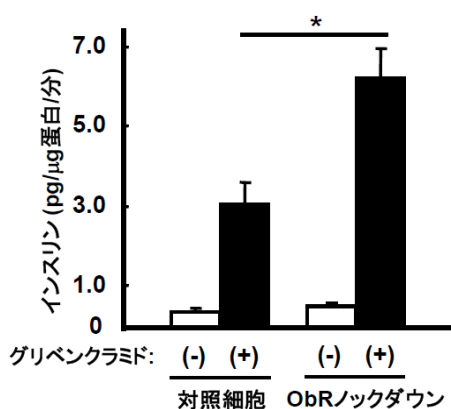
一方, グリベンクラミドによるインスリン分泌反応は上述のように [Ca²⁺]_i に変化の無い状況下においても ObRKO ラ氏島において対照よりも高く (31%), K_{ATP} チャネルとは独立した機序でのインスリン分泌促進効果が示唆された. さらに対照膵ラ氏島において, グリベンクラミドの存在下でグルコース刺激 (3

→8 mM)により 53%のインスリン分泌増強効果を認め、その効果はレプチンにより有意に抑制された。この糖応答性の変化は ObRKO ラ氏島においてより強く示された (図 2A, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)。これらの結果は SU 剤投与下で K_{ATP} チャンネルが完全に閉鎖した状態であっても、グルコースは K_{ATP} チャンネル \sim Ca²⁺ 流入経路とは別の経路を介してインスリン分泌をさらに増強することを示唆するものであった。さらにレプチンはこのグルコースによる K_{ATP} チャンネル非依存性経路を抑制し、ラ氏島の ObR 欠損がその経路を増強することも示唆された。



(図 2A: SU 剤による膵ラ氏島インスリン分泌増強効果)

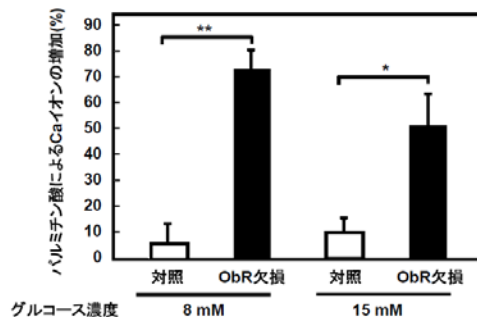
② MIN6-siObR 細胞において、グリベンクラミド刺激によるインスリン促進反応は対照細胞に比して約 2 倍の効果を示し (図 2B, *, $P < 0.01$)、図 2A で認められた膵ラ氏島における SU 剤の効果が β 細胞特異的であることが示された。また対照と ObR-KO 膵ラ氏島において、SUR1 や Kir6.2 といった SU 受容体構成蛋白の遺伝子発現レベルは同等であり、対照細胞と MIN6-siObR 細胞において SUR1 と Kir6.2 の蛋白発現レベルも同等であった。



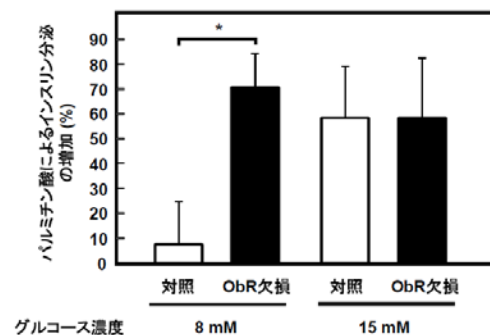
(図 2B: MIN6 細胞における SU 剤によるインスリン分泌増強効果)

(3) ObR 欠損膵ラ氏島において遊離脂肪酸は急性投与ではそのインスリン分泌促進効果を増強し、慢性投与ではより強くインスリン分泌を抑制する。

① グルコース刺激時の遊離脂肪酸 (0.5mM) の同時投与は対照膵ラ氏島における [Ca²⁺]_i 上昇効果を BSA 対照に比して有意に変化させなかったが (glucose 8 mM; 5.4%, 15 mM; 10.0% of BSA control), ObRKO 膵ラ氏島においては [Ca²⁺]_i 上昇効果の有意な増強を示した (glucose 8 mM; 73.4%, 15 mM; 51.5% of BSA control) (図 3A, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)。またインスリン分泌反応も ObRKO ラ氏島においてのみ 8mM glucose の条件下において有意な増強効果を認めた (glucose 8 mM, ObRlox; 7.5%, ObRKO; 70.6% of BSA control) (図 3B, *, $P < 0.05$)。これらの結果より、ObRKO 膵ラ氏島においてパルミチン酸の急性投与により β 細胞のグルコース応答性インスリン分泌能が増強されることが示された。

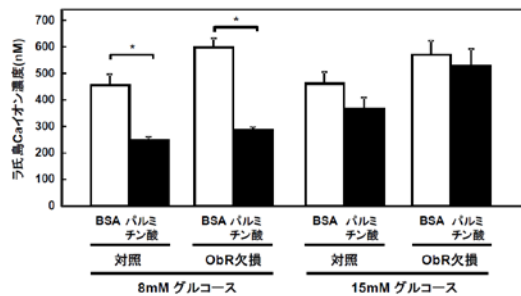


(図 3A: 膵ラ氏島における FFA の急性効果; [Ca²⁺]_i)



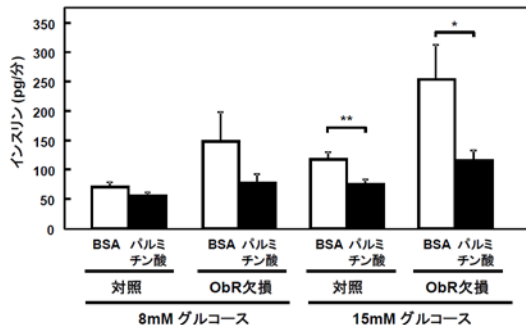
(図 3B: 膵ラ氏島における FFA の急性効果; インスリン分泌)

② グルコース刺激前 48 時間の遊離脂肪酸の慢性投与は, BSA control に比して対照, ObRKO ともにラ氏島の糖応答性 $[Ca^{2+}]_i$ を同程度に減弱させた (ObRlox; 38.5%, ObRKO, 35.9%, 8mM glucose) (図 3C, *, $P < 0.01$).



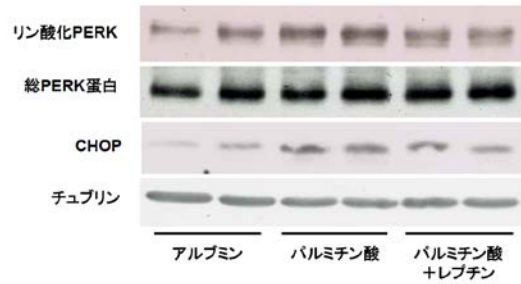
(図 3C: 膵ラ氏島における脂肪酸慢性投与後の糖応答性 Ca^{2+} イオン流入)

またパルミチン酸の慢性投与後の GSIS は対照, ObRKO ともに減弱したが, ObRKO 膵ラ氏島においてより強い抑制効果が認められた (8 mM glucose, ObRlox; 20.1% vs. ObRKO; 47.8%, 15 mM glucose, ObRlox; 37.2% vs. ObRKO; 54.2%) (図 3D, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$). これらよりパルミチン酸の慢性投与による β 細胞機能抑制効果 (“脂肪毒性”) は ObRKO ラ氏島においてより増強することが示された.



(図 3D: 膵ラ氏島における脂肪酸慢性投与後の糖応答性インスリン分泌)

③ MIN6 β 細胞においてパルミチン酸の慢性投与 (48 時間) により protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) のリン酸化や C/EBP-homologous protein (CHOP) 発現の上昇が認められ, 小胞体ストレスの誘導が示唆された. 脂肪酸慢性投与によるこの効果はレプチン (10nM) の同時投与により明らかに減弱しており (図 3E), レプチンによる膵 β 細胞脂肪毒性の抑制効果が示唆された.



(図 3E: MIN6 β 細胞におけるパルミチン酸 48 時間投与による小胞体ストレスの変化)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① 森岡与明, 西沢良記, Rohit N. Kulkarni, レプチンシグナルの β 細胞機能と増殖における役割, 内分泌・糖尿病・代謝内科, 査読無, 30巻, 2010年, 61-69頁

[学会発表] (計 2 件)

① Tomoaki Morioka, et al, Enhanced GLP-1-Induced Insulin Secretion in Islets Lacking Leptin Signaling, Asia Islet Biology & Incretin Symposium 2010, 2010 年 7 月 31 日, ホテルグランヴィア京都 (京都市)

② 森岡与明ほか, レプチンシグナルを欠損する膵 β 細胞において GLP-1 および SU 剤によるインスリン分泌反応は増強する, 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010 年 5 月 28 日, 岡山コンベンションセンター (岡山市)

[その他]

ホームページ:

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/interm2/ggraduate/diabetes02-1.shtml>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森岡 与明 (MORIOKA TOMOAKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師
研究者番号: 3 0 3 8 2 1 5 4

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

Rohit N. Kulkarni

ハーバード大学ジョスリン糖尿病センター・准教授

Robert T. Kennedy

ミシガン大学医学部化学薬理学・教授