

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650153

研究課題名(和文) 生体内におけるインスリン波形の意義の解明

研究課題名(英文) Understanding of the in vivo temporal patterns of insulin

研究代表者

久保田 浩行(Kubota, Hiroyuki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40376603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の血中インスリンパターンはホメオスタシスに重要であることが知られている。我々は培養細胞を用いてインスリンの時間パターン重要性を明らかにしたが、生体内におけるインスリンの時間パターンの意義は未だ不明のままである。そこで、本申請では「萌芽研究」として、生体を用いた任意のインスリンの時間パターンを与える系の確立を行った。その結果、頸静脈からソマトスタチンを注入することで、内在性のインスリン分泌を抑制し、同じく頸静脈からグルコースを注入することで血糖値を一定にした状態で、腸管静脈(門脈に直接つながる静脈)からインスリン刺激する、系の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：It is reported that temporal patterns of blood insulin are important for physiological homeostasis. We revealed that the importance of temporal patterns of insulin using cultured cells, however, the importance in our body remains unknown. In this proposal, as a "Challenging Exploratory Research", we established an experimental system to stimulate rats by a direct insulin injection. As results, we can stimulate rats under conditions of (i) a somatostatin injection via jugular vein to suppress the endogenous insulin release, (ii) a glucose injection via jugular vein to maintain blood glucose level and (iii) an insulin injection via mesenteric vein.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：インスリン 時間パターン システム生物学

1. 研究開始当初の背景

我々は分子の時間波形に情報がコードされるといふ“時間情報コーディング”の概念を世界に先駆けて提唱し、成果を挙げている。近年、この概念が注目されているが、生体内でそのメカニズムが明らかにされた例はない。一方、インスリンの血中波形は、平時の基礎分泌と食後の追加分泌、更に 15 分程度の周期的刺激からなることが知られている。我々は“時間情報コーディング”の概念から、これらの血中波形にある種の情報がコードされているのではないかと着目した。実際に、2 型糖尿病の初期にはインスリンの時間パターンが変化して総量の増加に伴い肝臓での脂肪合成は上昇するが、糖放出抑制は減少する。また、インスリンの 15 分程度の周期的刺激は一定刺激よりも肝臓からの糖の放出抑制を優位に抑制することが報告されている。上記のようなインスリン波形の重要性に関する論文は数多く報告されているものの、その分子メカニズムに踏み込んだ研究報告はない。

2. 研究の目的

生物に限られたシグナル伝達経路を用いて数多くの刺激に対応している。つまりシグナル伝達経路の本質の一つは、多彩な入出力を限られた分子またはネットワークにコードするシステムにある。我々は生体内において複数の時間波形を持つインスリンに注目し、実験とモデル解析から AKT 経路がインスリンの時間波形の情報を多重にコードし得ることを明らかにした。生体内におけるインスリン波形への情報の多重化の可能性は強く示唆されたが、未だ生体内において同様な機構が存在するかは不明である。そこで本申請では、生体内におけるインスリン波形の生理的意義を明らかにし、時間情報コーディングの概念の生体内での実証を目的とする。

3. 研究の方法

本申請では Fao 細胞を用いて明らかにした

“時間情報コーディング”の概念が生体内でも存在するかどうかを明らかにすることを目的としている。そこで以下の 2 つの研究を行う。生体内の細胞の応答に近い初代培養肝臓細胞の再現性の良い系を確立し、生体内においても AKT がインスリンの波形の情報を多重にコードし、その波形に依存して下流の各経路を個別に制御していることを明らかにする。さらに、微分方程式モデルを作成することで Fao 細胞のシステムと比較し、どのように AKT がインスリン波形の情報を多重にコードし、下流の各経路を個別に制御しているかを明らかにする。最終的に初代培養肝臓細胞に生体内のインスリン様の波形を与え、その意義を検討する。として、マウスまたはラットの「肝臓」を用いて“時間情報コーディング”の概念の生体での実証を行う。実際には、マウスまたはラットの頸静脈からソマトスタチンならびにグルコースを添加し、内在性のインスリン分泌を抑制した状態で血糖値を一定にする。上記条件下で、生体内においてもインスリンが分泌される、門脈からインスリンを注入し、生体内の分泌パターンを模した刺激（パルスやランプ刺激）を行うことで、培養細胞系で明らかにしたインスリン波形の意義の生体内での実証を行う。

4. 研究成果

当初の研究実施計画では初代培養肝細胞を用いた生体内におけるインスリン波形の意義の解明を行う予定であったが(上記 3. 研究の方法)、論文の revise の過程で当該実験を行う必要になり、前倒しで実験を始め、その成果は論文に掲載された (Kubota ら、Mol. Cell, 46, 2012, 820-32)。これにより、当初予定していた上記実験の目標は達成された。

研究方法の の、生体内におけるインスリン波形への情報の多重化を明らかにするには、生体の肝臓に任意のインスリン波形を与える必要がある。通常用いられている生体を用いたインスリンの刺激方法は頸静脈からの注入である。しかしこの方法は、非常に技術を必要とするものであり、さらに、我々の注目している臓器である肝臓に到達するまでにインスリンの波形が「鈍って」しまう（生体内の実際の波形と異なってしまふ）ため実際の入力波形は不明のままである。そこで、ラットの門脈に直接チューブを挿入し、シリンジポンプを用いてインスリン刺激を行う手法を開発に取り組んだ(図1)。



図1: 実験のイメージ図

上記の検討の結果、

門脈を介したインスリン刺激手法の開発では以下のように、技術ならびに手法の確立に成功した。実際には、門脈へのチューブの挿入は非常に難かった。そこで、門脈のすぐ上流に位置する腸管膜静脈からインスリン刺激を行う手法を考案、刺激に成功した。

- ・ 侵襲の少ない手技（1.5cm 程度）でチューブの挿入技術を取得
- ・ ソマトスタチンによる内在性のインスリン分泌抑制を確認（図2：血中インスリン濃度[赤線]の0～75分までの変化）
- ・ グルコースクランプによる血糖維持（150mg/dl）に成功（図2：血中グルコース濃度[青線]の40～105分までの変化）
- ・ 腸管膜静脈を介した門脈へのインスリン刺激により、血中インスリン濃度の上昇を確認（図2：血中インスリン濃度[赤線]の75～105分までの変化）

上記手法により、門脈を介した生体内の直接的なインスリン刺激が行えるようになった。

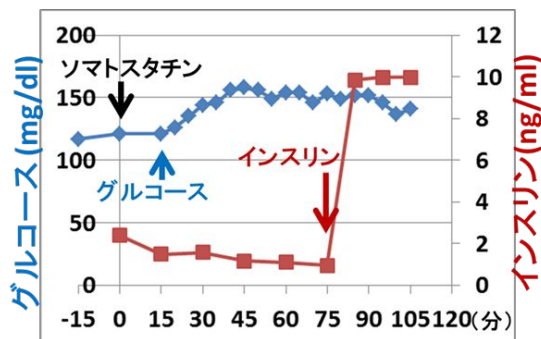


図2: 血糖値、血中インスリン濃度の変化

その結果、肝臓と筋肉における、インスリンの注入に伴うシグナル分子の活性化が確認された(図3)。

この結果、生体を用いて任意のインスリン波形を投与する系の確立に成功した。今後は、

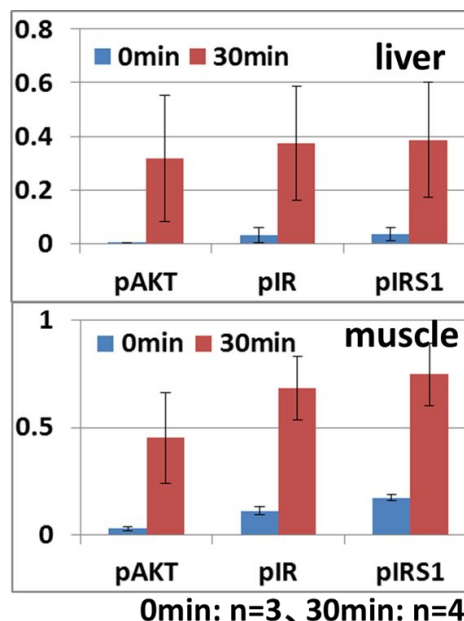


図3: インスリン刺激によるシグナル分子の変化

この系を用いて、“時間情報コーディング”の概念が生体内でも存在するかどうかを明らかにしていく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 浩行 (KUBOTA Hiroyuki)
東京大学・大学院理学系研究科・研究員
研究者番号：40376603

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：