

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790939

研究課題名(和文)PI3キナーゼとGLP-1シグナルの膵細胞における役割と新規糖尿病治療薬の開発

研究課題名(英文)Research of PI3Kinase and GLP-1 signal in pancreatic beta cells

研究代表者

諏訪内 浩紹 (Suwanai, Hirotsugu)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60624939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞特異的PI3Kノックアウトマウスではインスリン分泌能低下が示されたことより、インスリン分泌を調節する重要な経路として注目されている。このマウスにGLP-1アナログを投与し経口や腹腔内のブドウ糖負荷試験を行った結果、ブドウ糖腹腔内投与ではGLP-1アナログを投与しても血糖値の改善、インスリン分泌の回復は認められなかった。ブドウ糖経口負荷試験では血糖値の改善が認められたものの、インスリン分泌の回復は認めなかった。マイクロアレイ解析にて、脂質代謝、ミトコンドリア関連遺伝子などの発現が低下していたことより、膵細胞のPI3Kは、脂質代謝、ミトコンドリア関連遺伝子を調節している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：GLP-1 is important for regulation of insulin secretion in pancreatic beta cells but the signaling of GLP-1 is not well known. We previously reported that inhibition of class IA phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), using a mouse model lacking the pik3r1 gene specifically in beta cells and the pik3r2 gene systemically (beta DKO mouse), results in glucose intolerance and reduced early insulin secretion. We investigated the relation of GLP-1 and PI3K. The administration of GLP-1 analog in beta DKO mice didn't recover the early insulin secretion. The microarray analysis showed the down-regulation of lipid and mitochondria related genes and GLP1 receptor gene. This result indicated that PI3K in pancreatic beta cells is important for lipid and mitochondria homeostasis and regulate expression of GLP-1 receptor.

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：糖尿病 膵細胞 インスリンシグナル GLP-1シグナル

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は世界中で現代社会が直面している最も大きな問題の1つである。我が国でも食生活の欧米化に伴う脂質摂取量の増加、交通機関が発達したことによる生活習慣の変化を原因として糖尿病患者数が著明に増加している。厚生労働省の2007年国民健康・栄養調査結果によると糖尿病が強く疑われている人が約890万人、糖尿病の可能性を否定できない人を含めると約2,210万人と他国と同様に患者数は増加の一途を辿っている。これら糖尿病は、膵臓のβ細胞から分泌されるインスリンの量が減少して、全身でインスリン作用が低下し、血糖値が上昇する病気である。当研究グループは、細胞自身においてもインスリン作用が重要であり、インスリンによって活性化されるPI3Kがインスリンの分泌を調節する鍵分子であることを解明してきている(1, 2)。

細胞特異的PI3Kノックアウトマウスでは、インスリンの分泌を調節する様々な蛋白の量が低下し、ブドウ糖に反応して分泌されるインスリンの量が低下した。一方、PI3Kの働きを回復させると、インスリンの分泌も回復した。また、肥満糖尿病(メタボ型)のマウスでもPI3Kの量や働きが低下しており、インスリンの分泌が減少していたことより、PI3Kの働きを強める作用があるインスリンの分泌が低下するとβ細胞でのインスリンの作用が弱くなり、PI3Kの働きが悪くなって、ますますインスリンの分泌が低下するという悪循環に陥っていることが分かった。細胞でのPI3Kの働きを高める薬物が、この悪循環を断ち切る糖尿病治療薬として期待されている(3)。

まず、細胞特異的PI3Kノックアウトマウスとコントロールマウスに対し、GLP-1アナログであるExendin-4を腹腔内に1回投与をし、直後に経口と腹腔内注射でブドウ糖を投与比較した。その結果、

細胞特異的PI3Kノックアウトマウスへブドウ糖を腹腔内投与したマウスでは、他のマウスに比べ血糖値の改善が弱かった。

そこで、経口ブドウ糖投与後に早期インスリン分泌を測定した。その結果、コントロールマウスにGLP-1アナログを投与した群では著明にインスリン分泌の回復が見られたものの、その他の群でのインスリン分泌は回復しなかった。

GLP-1アナログ長期投与のインスリン分泌を検査するために、浸透圧ポンプを皮下に埋めGLP-1アナログの4週間継続投与を行い、インスリン分泌試験を行った。その結果、細胞特異的PI3Kノックアウ

トマウスにGLP-1アナログを4週間投与した群では、インスリン初期分泌の軽度回復が認められた。

これらの現象より考えられることは、1) GLP-1アナログの長期投与によりインスリン分泌が一部回復したことより、GLP-1シグナルは部分的にPI3Kを介さないでβ細胞にインスリン分泌を働きかける経路がある可能性、2) GLP-1アナログの投与により完全にはインスリン分泌が回復しないことより、GLP-1シグナルはPI3Kを経由する、3) GLP-1アナログの直前投与により、経口血糖負荷試験では著明に高血糖が抑制されたことより、インスリン分泌以外のインクレチン効果が作用している可能性がある、ということである。

【参考文献】

- 1) Ueki et al. Nature Genetics 38:583-588,2006.
- 2) Kubota et al. Journal of Clinical Investigation 114:917-927,2004
- 3) Kaneko K et al. Cell Metabolism 12:619-632,2010.

2. 研究の目的

研究期間内に以下のことを明らかにすることを目的とした。1) 細胞のGLP-1シグナルとPI3Kの解明、2) GLP-1アナログの細胞に対するグルカゴン抑制など、細胞以外の作用機序である。これらの研究により、PI3KとGLP-1シグナルの関係を明確にすることで、より詳細なGLP-1のシグナリングを発見する可能性がある。また、日本人に特有なインスリン初期分泌の低下を再現した細胞特異的PI3Kノックアウトマウスを用いPI3Kの働きを回復させる薬物の探索をすることで、従来の治療に抵抗性の糖尿病の新しい治療薬を発見できる可能性を秘めている。現在糖尿病の治療は経口血糖降下薬、インスリン皮下注射、GLP-1アナログなどの治療がある。しかし、このような治療でも回復しない患者は多く存在し、その多くはインスリン分泌が枯渇している。そのため、細胞におけるそのシグナリングをより詳細に解明し、

そのシグナルに合致した治療薬ができるよう効率的に実験を進めてゆくことが重要と考えている。

3. 研究の方法

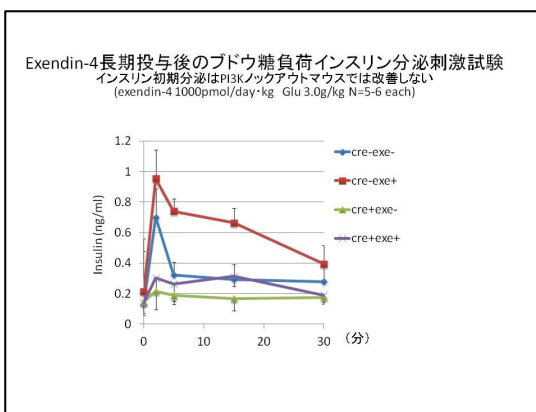
PI3K の構成遺伝子の一つである *pik3r1* 遺伝子は *p85a*、*p55a*、*p50a* の3つのPI3キナーゼ(PI3K)調節サブユニットをコードしている。共通のエクソン 7 の両端に loxP 配列を導入し、Cre 発現下では上記3分子がすべて発現しないような遺伝子改変マウス *pik3r1-flox* マウスを作成した。このマウスとβ細胞特異的 Cre トランスジェニックマウス(RIP-Cre)マウス、さらにPI3K の別な構成遺伝子である *p85* をコードする *pik3r2* の発現を欠落させた *pik3r2* ノックアウトマウスを交配し、膵細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスを得て、インスリン分泌の低下をはじめとするβ細胞の機能低下を認めていることを発表している。

この膵β細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスと GLP-1 アナログの評価を詳細に行う。具体的には、膵島の組織学的な評価や、膵島を単離し mRNA, microRNA やタンパク質のシグナルを GLP-1 アナログ投与とそのコントロール群において行う。また、*in vivo* のみならず、*in vitro* での実験も平行して行う。膵細胞株である MIN6 細胞に PI3K 阻害薬である Wartmannin や Ly294002 を投与し、その下流にある mRNA, microRNA の発現などを評価する。平行して、*glucagon-cre* トランスジェニックマウスを得て、膵細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスを作成する。

4. 研究成果

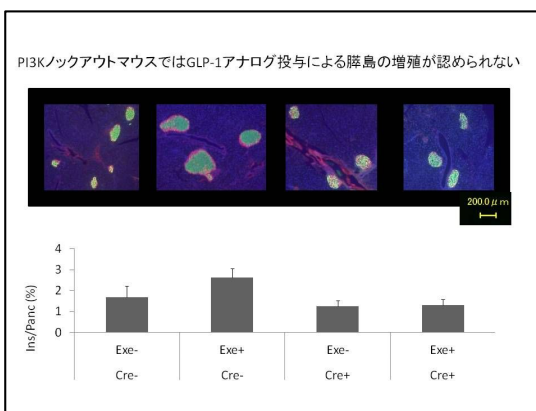
当研究グループは、PI3 キナーゼ(PI3K)/Akt がインスリンの分泌を調節する鍵分子であることを解明してきた。そこで、β細胞の GLP-1 シグナルと PI3K の解

明を中心に行なっている。まず、細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスとコントロールマウスに対し、GLP-1 アナログである Exendin-4 を腹腔内に1回投与をし、直後に経口と腹腔内注射でブドウ糖を投与比較した。その結果、細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスへブドウ糖を腹腔内投与したマウスでは、他のマウスに比べ血糖値の改善が弱かった。

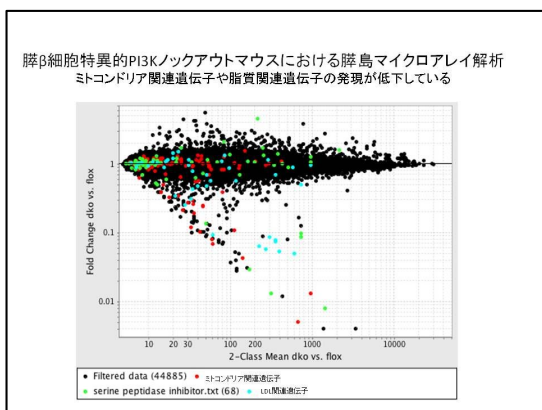


細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスと野生型マウスの単離膵島からメッセンジャーRNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。その結果、アポリポタンパク質、コレステロールのトランスポーターである ABCA1、LDL 受容体が低下しており、脂質代謝異常が生じていることが示された。また、GLP1 受容体の発現低下や、チトクローム *p450* などのミトコンドリア関連遺伝子の発現が著明に低下していることが解明された。

そこで、GLP-1 アナログ長期投与のインスリン分泌を検査するために、浸透圧ポンプを皮下に埋め GLP-1 アナログの4週間継続投与を行い、インスリン分泌試験を行った。その結果、浸透圧ポンプにて GLP1 アナログを投与した野生型マウスでは、腹腔内ブドウ糖負荷試験によりインスリン分泌が上昇し高血糖が抑えられるが、細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスではインスリンの分泌は抑制され高血糖が生じた。

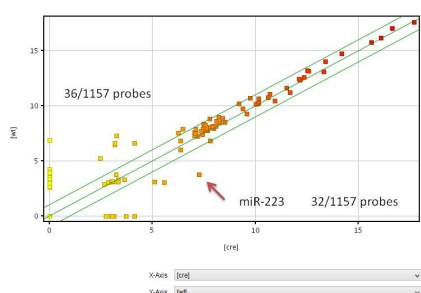


つまり、細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスでは、GLP1 シグナルが細胞に十分に入らないことがわかった。この現象はマイクロアレイ解析で示されたように細胞において GLP1 受容体の発現が低下していることから生じていると考えられた。



膵細胞のインスリン分泌低下は、以前より脂肪毒性やミトコンドリア機能の低下が一因と報告されている。また近年、microRNA によって脂質代謝やミトコンドリア機能が制御されることが解明されている。そのため、アジレント社製 miRNA アレイ (Mouse 8x60K Rel.17.0) を利用し、膵細胞の microRNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、1157プローブ中、32のmicroRNA の発現が増加。36の microRNA の発現が低下していた。In silico 解析により、これらの microRNA の一部が脂質代謝遺伝子などの発現を低下させることが予想された。

膵β細胞特異的PI3Kノックアウトマウスにおける膵島microRNA マイクロアレイ解析
1157プローブ中36のプローブがノックアウトマウスで発現が低下しており、32のプローブが発現上昇していた



現在、GLP-1 アナログのα細胞に対するグルカゴン抑制など、細胞以外の作用機序についても解明を行なっている。そのため、glucagon-Cre ノックアウトマウスを PI3K flox/flox マウスと交配し、膵細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスを作成し、解析を進めているところである。

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 3 件)

諏訪内浩紹、植木浩二郎、肥満と生活習慣病”日本医師会雑誌、143 巻・1号、2014、34-38

諏訪内浩紹、植木浩二郎、膵細胞のインスリンシグナル、Current

Therapy、32 巻 4 号、2014、331-334

諏訪内浩紹、山内敏正、植木浩二郎、門脇孝、腸内細菌叢と肥満、内分泌・糖尿病・代謝内科：33 巻 1 号、2011、56-60

[学会発表](計 11 件)

Hirotsugu Suwanai, Yukiko Okazaki, Takahiro Sasako, Toshihiro Umehara, Motoharu Awazawa, Kohjiro Ueki, Takashi Kadowaki "Analysis of GLP-1 signaling and class IA phosphatidylinositol 3-kinase in pancreatic cells." Asia-Pacific Diabetes and Obesity Study Group symposium (Tokyo, Japan, 20131011)

諏訪内浩紹、植木浩二郎、岡崎由希子、笹子敬洋、梅原敏弘、栗澤元晴、門脇孝"膵細胞における PI3 キナーゼと GLP-1 シグナルの解明" 第 34 回日本肥満学会(20131011)

岡崎由希子、岩根亜弥、小林直樹、笹子敬洋、小林正稔、坂田道教、諏訪内浩紹、原一雄、門脇孝、植木浩二郎"ヒト脂肪組織発現解析を用いた病態特異的アディポカインの検索" 第 34 回日本肥満学会(20131011)

小田原紗羅、諏訪内浩紹、大島一憲、三谷康二、高橋克敏、岡崎由希子、植木浩二郎、門脇孝"ピオグリタゾン内服後の浮腫の出現を契機に、Cushing 症候群を伴う副腎癌を発見し

た1例"第50回糖尿病学会 関東甲信越地方会 (20130126)

小田原 紗羅、笹子 敬洋、芥 直子、諏訪内 浩紹、杉森 祐介、榎奥 健一郎、松坂 恵介、鈴木 亮、山内 敏正、植木 浩二郎、門脇 孝
"Weber-Christian 病を背景に全身性脂肪萎縮症を来たし、インスリン抵抗性を主体とした糖尿病と線維化を伴う脂肪肝を呈した一例"第14回日本内分泌学会 関東甲信越支部学術学会 (20130928)

諏訪内 浩紹、小田原 紗羅、岸 暁子、平野 賢二、植木 浩二郎、小池 和彦、門脇 孝"ミトコンドリア糖尿病に膵炎関連遺伝子である SPINK1p.N34S 変異を合併した1例"第596回日本内科学会関東地方会 (20130511)

諏訪内 浩紹、庄嶋 伸浩、植木 浩二郎、門脇 孝"1型糖尿病合併妊娠に対しインスリンポンプを導入し血糖コントロールを改善した1例"第593回日本内科学会関東地方会(20121208)

諏訪内 浩紹、植木 浩二郎、粟澤 元晴、岡崎 由希子、梅原 敏弘、笹子 敬洋、窪田 哲也、窪田 直人、門脇 孝"膵 細胞における PI3 キナーゼと GLP-1 シグナルの解明"第55回日本糖尿病学会年次学術集会(20120519)

岡崎 由希子、植木 浩二郎、岩根 亜弥、小林 直樹、坂田 道教、粟澤 元晴、笹子 敬洋、小林 正稔、梅原 敏弘、諏訪内 浩紹、藤田 逸人、堀越 桃子、大杉 満、窪田 直人、山内 敏正、原 一雄、吉村 浩太郎、光嶋 勲、油谷 浩幸、門脇 孝"ヒト脂肪組織発現解析を用いた病態特異的アディポカインの検索"第55回日本糖尿病学会年次学術集会(20120519)

岡田 啓、飯塚 陽子、寺井 愛、諏訪

内 浩紹、羽田 裕亮、庄嶋 伸浩、岡崎 啓明、山内 敏正、植木 浩二郎、門脇 孝"無 リポ蛋白血症に糖尿病を合併した1例"第585回日本内科学会関東地方会 (20120212)

岡崎 由希子、植木 浩二郎、岩根 亜弥、原 一雄、粟澤 元晴、金子 和真、笹子 敬洋、小林 直樹、小林 正稔、諏訪内 浩紹、坂田 道教、堀越 桃子、大杉 満、山内 敏正、吉村 浩太郎、光嶋 勲、油谷 浩幸、門脇 孝 "ヒト脂肪組織発現解析を用いた病態特異的アディポカインの検索" "第54回日本糖尿病学会年次学術集会(20110520)

〔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
諏訪内 浩紹 (SUWANAI, Hirotsugu)

研究者番号：60624939

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：