

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293208

研究課題名(和文) 2型糖尿病における膵 細胞機能障害の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of pancreatic alpha cell failure in type 2 diabetes

## 研究代表者

北村 忠弘 (KITAMURA, TADAHIRO)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：20447262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病では、膵 細胞機能不全に加えて、 細胞機能不全も重要であるが、その分子機序は未解明である。そこで、我々は 細胞特異的にNAD依存性脱アセチル化酵素であり、細胞のエネルギーセンサーでもあるSirt1を欠損、あるいは過剰発現するマウスを作製し、解析した結果、 細胞においてSirt1は細胞の分化、増殖を負に制御し、グルコース反応性のグルカゴン分泌は正に制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic alpha cell dysfunction as well as beta cell dysfunction is known to be important for pathophysiology of type 2 diabetes. However, its molecular mechanism has been unclear. Thus, we generated both knockout mice and knockin mice in which Sirt1, an NAD-dependent deacetylase and a cellular energy sensor, lack or overexpress specifically in alpha cells. The metabolic profiles and histological analysis revealed that Sirt1 negatively regulates alpha cell differentiation/proliferation, and positively regulates glucose-dependent glucagon secretion.

研究分野：内分泌学

キーワード：グルカゴン Sirt1

### 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国における糖尿病患者数は840万人と、50年前に比べて38倍に激増している。従って、糖尿病に対する新しい治療法、あるいは予防法の開発が、医学研究者にとって急務である。これまで、糖尿病研究者の多くは、2型糖尿病に伴うβ細胞障害(インスリン分泌障害)に着目し、その分子機序の解明とβ細胞機能を改善する薬剤の開発に力を注いできた。しかしながら、2型糖尿病では、α細胞におけるグルカゴン分泌抑制の障害も認められる。通常、食後にグルカゴン分泌が低下するが、2型糖尿病はこの反応が障害されている。2型糖尿病におけるα細胞機能障害のメカニズムは全く不明である。最近、インクレチン関連薬が糖尿病治療に使用される様になってから、血糖コントロールにおけるグルカゴン分泌抑制の重要性が再認識され始めた。しかしながら、グルカゴン分泌抑制のメカニズムに関しては、あまり研究されていない。その最大の理由は、血中グルカゴン濃度を正確に測定できる系が存在しないからである。申請者はこの問題を克服すべく、高感度・高特異性グルカゴン測定系の開発を行った。現在、ヒトとげっ歯類に共通して標準的に使用されているグルカゴン測定キットはグルカゴンのC末端アミノ酸配列に対する抗体を用いたものである。プログルカゴンは翻訳後に様々なプロセッシングを受け、いくつかの異なるペプチドが産生されるが、C末抗体ではグルカゴン(33-61)以外にグリセンチン(1-61)と交叉反応が起こり得る。また、従来測定系は感度が低く、測定に血漿100ulが必要となる為、マウスの採血量に限界があった。一方、申請者が開発した測定系はC末抗体とN末抗体のサンドイッチ法であり、グリセンチン(1-61)との交叉反応は全くなく、感度は従来測定系の10倍以上であった。本研究課題ではマウス血中グルカゴン濃度の測定をグルカゴンサンドイッチ ELISAを用いて行った。

### 2. 研究の目的

申請者は最近、細胞内エネルギーセンサー分子である Sirt1 が膵臓ではラ氏島細胞に特異的に発現していることを確認した(未発表)。しかしながら、細胞における Sirt1 の役割については全く不明である。一方、申請者は以前に Sirt1 が FoxO1 を脱アセチル化することで FoxO1 の転写活性を調節することを報告している(Kitamura et al. Cell Metab 2005)。また、β細胞では Sirt1 は UCP2 を制御することでインスリン分泌に関与すること、FoxA2 の転写調節を介してβ細胞の分化や増殖を制御することが報告されており、同様のメカニズムがα細胞にも存在するならば、Sirt1 が UCP2 や FoxA2 を介して血中グルカゴン濃度の調

節に関与している可能性がある。従って、本研究課題では細胞における Sirt1 の生理的役割、並びに糖尿病病態との関連を明らかにするために、細胞特異的にこれらの遺伝子を改変したマウス(ノックアウトマウスとノックインマウス)を作製し、その表現型の解析を行った。本研究課題は、これまでほとんど注目されてこなかったα細胞におけるグルカゴン分泌抑制障害のメカニズムを分子レベルで解明しようと試みる点でユニークであり、その成果はα細胞における Sirt1 を操作することで、糖尿病の病態を改善する新しい治療法の開発につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

本研究課題では Cre-loxP システムを用いて膵α細胞特異的に Sirt1 をノックアウト(loss of function)あるいはノックイン(gain of function)したマウスを作製し、その表現型解析、各種代謝パラメータの測定、各種負荷試験、膵臓の組織学的解析を行うことで、Sirt1 のα細胞における生理的役割を解析した。血中グルカゴン濃度の測定には申請者が開発したサンドイッチ ELISA 系を用いた。詳しくは以下に記載する。

#### (1) 細胞特異的 Sirt1 ノックアウトマウス(-Sirt1 KO)の作製と解析

Glucagon-Cre マウスと Sirt1 flox マウス(ハーバード大学、Alt 教授から供与)を交配し、細胞特異的 Sirt1 ノックアウトマウスを作製した。作製したマウスの各種代謝パラメータ(空腹時、及び随時血糖値、血漿グルカゴン、インスリン、GLP-1 値など)の測定に加え、各種負荷試験(糖負荷テスト、インスリン耐性テスト)及び高インスリン低血糖クランプ実験を施行中のグルコース注入量(内因性の肝糖産生量を表す)と血中グルカゴン濃度を評価した。また、膵臓の組織学的解析を行い、細胞量やβ細胞量を調査した。さらに、β細胞では Sirt1 が UCP2 の発現量を制御することが報告されていることから、細胞の培養細胞株(TC細胞)を用いて、Sirt1 阻害薬添加時の UCP2 の発現量を調査した。

#### (2) 細胞特異的 Sirt1 ノックインマウス(-Sirt1 KI)の作製と解析

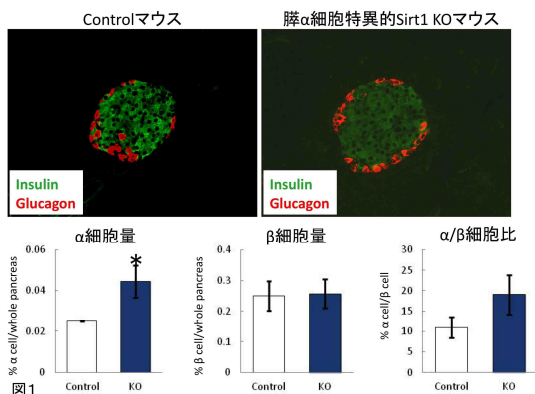
上記の -Sirt1 KO に加えて、gain of function の検討として Glucagon-Cre マウスを Rosa26-Sirt1 マウスを交配し、細胞特異的 Sirt1 ノックインマウスを作製した。使用した Rosa26-Sirt1 マウスの Transgene は Rosa26 locus に loxP 配列に挟まれた形で Pgk-Neo カセット(stop コドン含む)を挿入し、下流に野生型の Sirt1 を polyA と共に配置している。この transgene を相同性組み換えで内因性 Rosa26 locus に導入したマウスを既に作製済みであり、Glucagon-cre マウスと交配

することで、Cre レコンビナーゼが発現する細胞でのみ Pkgk-Neo カセットが除かれ、内因性の Rosa26 プロモーターによって Sirt1 が発現するようになる。これらのマウスの解析については上述の Sirt1 ノックアウトマウスに準じて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞特異的 Sirt1 ノックアウトマウスの解析結果

まず、マウスの膵臓の組織学的解析を行ったところ、細胞量にはコントロールマウスと差が認められなかったが、細胞量は有意に増加していた(図1参照)



しかしながら、マウスの血糖値、及び血中グルカゴン濃度は空腹時、随時ともにコントロールと差がなく、糖負荷試験を行ったが、耐糖能も全く正常であった。そこで、インスリン負荷試験を行った所、図2上に示すように KO マウスでは低血糖からの回避が遅延していることが判明した。また、その際の血中グルカゴン濃度は KO マウスで有意に低下していることも明らかとなった(図2上、下参照)。

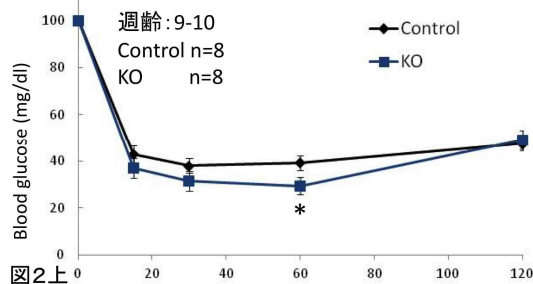


図2上 血中グルカゴン濃度  
Insulin 負荷後30分

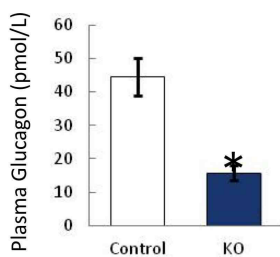


図2下

次に、さらに詳細に解析するために、高インスリン低血糖クランプ実験を行ったところ、インスリンによる低血糖誘導早期にはグルコース注入量が KO マウスで多く(従って、内因性糖産生が低下しており)その後は逆転して KO マウスで注入量が減少し(従って、内因性糖産生は亢進している)ことが判明した(図3参照)

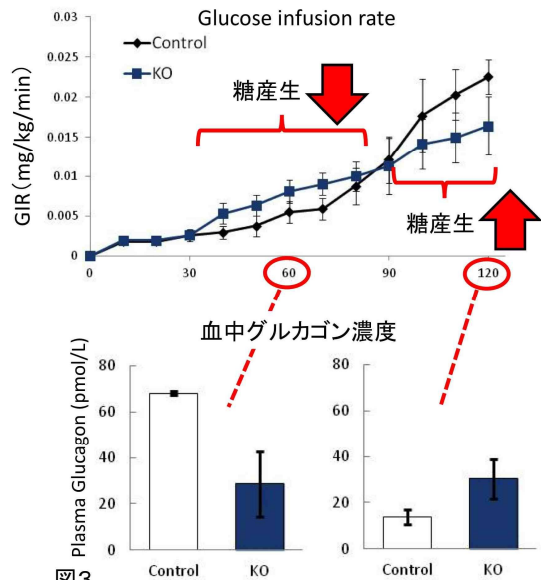


図3

興味深いことに、クランプ早期には KO マウスで血中グルカゴン濃度は低下していたが、その後、コントロール群ではグルカゴン濃度が低下して行くのに対し、KO マウスでは低下せず、結果としてコントロールマウスよりも血中グルカゴン濃度は高い値を示した(図3下)。

##### (2) 細胞特異的 Sirt1 ノックインマウスの解析結果

一方で、KI マウスの方は図4に示すように、インスリン負荷試験でコントロールと全く差がなく、その際の血中グルカゴン濃度も正常であった。

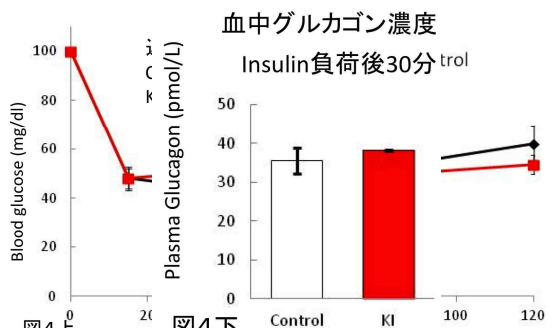


図4上

図4下

グルカゴン濃度の低下が認められた。  
さらに、膵臓の組織学的解析から、KI マウス  
膵α細胞特異的Sirt1 KIマウス

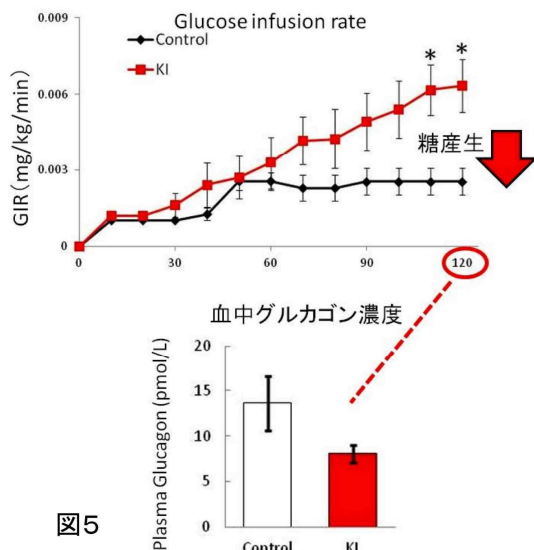


図5

では 細胞量の減少傾向が確認された(図6参照)

従って、細胞特異的 Sirt1KO マウスと KI

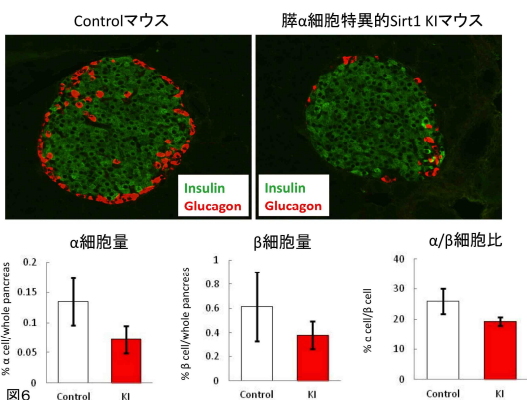


図6

マウスの両方の解析から、細胞の Sirt1 は細胞の分化増殖を負に制御しており、グルカゴン分泌は正に制御している可能性が示唆された。現在、その分子メカニズムを解析中である。

#### 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 1 件)

菊池司、森田恭輔、小林雅樹、佐々木努、北村忠弘、膵細胞における Sirt1 によるグルカゴン分泌制御、第 80 回日本糖尿病学会、平成 28 年 5 月 21 日、国立京都国際会館(京都府、京都市)

[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

<http://taisha.imcr.gunma-u.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北村 忠弘 (KITAMURA Tadahiro)

群馬大学生体調節研究所・教授

研究者番号：20447262

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：