

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750336

研究課題名(和文) 細胞における核内DGK 機能不全がもたらす脂質代謝異常と2型糖尿病発症との関連

研究課題名(英文) The role of nuclear DGKdelta on lipid signaling in pancreatic beta-cells and its involvement in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.

研究代表者

金子 雪子 (Kaneko, Yukiko)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：00381038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵細胞に高発現するDGK が細胞機能に及ぼす影響について検討を進めた。本研究において、DGK は細胞核に局在すること、細胞特異的DGK 欠損マウス(DGK KO)において、小型の膵島数が増加することで血清インスリン値の増加や随時血糖値の低下、耐糖能の改善がもたらされることが明らかとなった。また、DGK KOにおいて細胞量が保持される結果、streptozotocin誘発血糖値上昇が抑制されることがわかった。本研究により、細胞核内に発現するDGK が細胞増殖を抑制的に制御しており、その発現抑制により細胞の増殖が促進される結果、耐糖能改善をもたらすことが示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the role of diacylglycerol kinase (DGK) on the function of pancreatic β -cells. The expression of DGK was detected in the nucleus of β -cells. To explore the function of DGK in pancreatic β -cells, we used a Cre/loxP system to create mice with β -cell specific disruption of DGK (DGK KO). DGK KO showed lower blood glucose and higher plasma insulin levels compared with the control mice and improvement of glucose tolerance. DGK KO also showed an increase in the number of small islets. Moreover, the deficiency of DGK in β -cells led to a significant decrease in the progression of streptozotocin-induced hyperglycemia and β -cell loss. Based on the present results, we propose that the inhibition of DGK, which acts as a suppressor of β -cell proliferation, could be a novel therapeutic target for diabetic mellitus.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病 膵細胞 ジアシルグリセロール ジアシルグリセロールキナーゼ 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は進行すると、膵β細胞の破壊や脱落により、β細胞量が減少することが知られている。すなわち、β細胞の破壊的病変により引き起こされる1型糖尿病はもとより、β細胞量の減少を伴う2型糖尿病病態に対しても、膵β細胞機能を維持、回復することは、治療する上で非常に重要である。しかしながら、現在、β細胞量の回復を主眼とした糖尿病治療薬はない。

Diacylglycerol (DAG) は、遺伝子発現やイオンチャネル活性、細胞の増殖・分化など、様々な細胞機能の制御に関わる生理活性脂質である。膵β細胞において、DAGはprotein kinase C活性化やインスリン開口放出における膜融合調節タンパク質に結合し、インスリン分泌を制御することが知られている。また、慢性高血糖状態下においては、過剰にβ細胞内へと流入したグルコースにより、de novoのDAG産生が亢進し、細胞内DAGが蓄積する(*J Clin Invest.*, 85, 482-490, 1990)。細胞内に蓄積したDAGは膵β細胞の機能障害を引き起こすことが報告されており、膵β細胞の機能維持にDAG量の調節が重要であることが考えられる。Diacylglycerol kinase (DGK) はDAGを代謝しホスファチジン酸へと変換する酵素であり、細胞内DAG量を厳密に制御し、細胞内局所的なDAG枯渇シグナリングに重要な役割を果たしている。近年、骨格筋において、DGKδの発現・活性の低下によるDAGの量的制御の崩壊が、脂質代謝異常やインスリン抵抗性による2型糖尿病病態形成の一因であるという報告がなされ(*Cell*, 132, 375-86, 2008)、糖尿病下ではDGKの活性変化により脂質バランスの崩壊が起こっていると考えられる。しかしながら、これまでに膵β細胞におけるDGKを介した脂質シグナリング制御についての報告はほとんどなされておらず、また、糖尿病病態形成時におけるDGKを介した脂質シグナリングの機能変化についても不明である。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、type I DGKであるDGKαおよびγが膵β細胞の細胞質に高発現しており、インスリン分泌に対して促進的に働く調節因子であることを証明した(*Endocrinology*, 154, 4089-4098, 2013)。本研究では、β細胞に高発現していること、糖尿病発症に関連深いアイソザイムであることから、DGKδの膵β細胞における機能に着目し、

その役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) DGKδ局在の検討：マウスβ細胞株MIN6細胞およびC57BL/6Jマウス膵薄切切片における免疫組織化学染色により、DGKδの局在の検討を行った。さらに、細胞分画法により、MIN6細胞を核画分、細胞質画分、細胞膜画分へと分画し、ウェスタンブロッティング法により、DGKδの局在の検討を行った。
- (2) DGKδをノックダウンしたMIN6細胞の機能解析：エレクトロポレーション法によりマウス膵β細胞株MIN6へDGKδsiRNAを導入し、およそ8割以上のDGKδの発現抑制を確認した。このDGKδノックダウンMIN6細胞(DGKδKD)を用いて、パッチインキュベーション法によるインスリン分泌反応および、BrdUの取り込みによる細胞増殖能の検討を行った。
- (3) βDGKδKOマウスの表現型の解析：Rat insulin promoter II (RIP)下流に組み換え酵素Creの配列を持つRIP-Creマウスと標的配列loxPでDGKδを挟んだDGKδ^{lox/lox}マウスを用いた。RIP-Cre homoマウスとDGKδ-loxPマウスを交配し、産まれた仔(βDGKδ hetero KO)をさらにDGKδ-loxPマウスと交配して産まれた仔の中からRIP-Cre/DGKδ^{lox/lox}マウス(βDGKδ KO)を識別した。各離乳時に耳や尾の先端を切断したものを試料とし、total DNAを抽出した。抽出したDNAを用いてPCRあるいはreal-time PCRを行い、CreならびにDGKδ-loxPの発現の判定を行った。controlマウスとしてRIP-Cre heteroマウスを用いた。βDGKδKOマウスの体重、血糖値、血中インスリン濃度、耐糖能(経口糖負荷試験により測定)ならびに、単離した膵島を用いグルコース誘発インスリン分泌反応を測定し、コントロールマウスと比較した。
- (4) βDGKδKOマウス膵島の形態変化の解析：βDGKδKO膵臓の凍結薄切切片を作製し、インスリン抗体を用いた免疫染色によるβ細胞量の解析や膵島の数、大きさの解析を行った。また、単離膵島からRNAを抽出し、細胞細胞増殖関連遺伝子の発現の検討を行なった。
- (5) STZ誘発糖尿病におけるβDGKδKOの抗糖尿病効果の検討：5週齢βDGKδ hetero KOおよびcontrolマウスにstreptozotocin

(STZ) 200mg/kg を腹腔内投与した。投与後、体重ならびに血糖値測定を行い、STZ投与後 11 日目において、血糖値 300 mg/dl を超えるマウスを糖尿病発症モデルと判断し、以降の検討に用いた。

4. 研究成果

- (1) DGK δ 局在の検討：免疫染色法による結果から、DGK δ は主に β 細胞核に局在していた。また、細胞分画法による検討からDGK δ は核分画に発現していることがわかった。以上の結果から、DGK δ は主に膵 β 細胞の核に局在することが示唆された。
- (2) DGK δ をノックダウンしたMIN6細胞の機能解析：膵 β 細胞におけるDGK δ の機能を明らかにするために、MIN6細胞のDGK δ をノックダウンし、インスリン分泌、細胞増殖機能への影響について検討を行った。その結果、インスリン分泌能に変化は認められなかったが、細胞増殖の指標であるBrdUの取り込み量の増大が認められ、DGK δ は膵 β 細胞増殖調節に関わることが示唆された。
- (3) β DGK δ KO の表現型の解析：膵 β 細胞におけるDGK δ の役割を明らかにするために、 β 細胞特異的DGK δ 欠損マウス(β DGK δ KO)を作製し、その表現型を解析した。 β DGK δ KOの体重はcontrol マウスと比較し、変化がないことを確認した。ところが、随時血糖値は有意に低値を示し、血中インスリン濃度も有意に増大していることが明らかとなった。また、OGTTによる糖負荷後30、60、120分後の各時点における血糖値の上昇が有意に低く、耐糖能の亢進が認められた。そこで、膵 β 細胞のインスリン分泌能について評価するため、単離膵島を用いてパッチインキュベーション法によりグルコース誘発インスリン分泌反応の測定を行った。その結果、 β DGK δ KOでは control マウスと比較して単離膵島からのGSISに変化は認められなかった。以上の結果から、 β 細胞特異的DGK δ 欠損により、血漿中インスリン値の上昇を伴う耐糖能の亢進、血糖値の低下が認められたが、 β 細胞からのインスリン分泌能に影響はないことが示された。
- (4) β DGK δ KO 膵島の形態変化の解析： β DGK δ KOから摘出した膵臓の凍結薄切切片を作製し、インスリン抗体免疫染色による β 細胞量、および膵島数の解析、抗Ki67抗体免疫染色による細胞増殖能の確認を

行った。その結果、 β DGK δ KOにおけるインスリン陽性領域である β 細胞量については微増にとどまった。一方、 β DGK δ KO膵臓中の膵島数に関しては有意な増加が認められた。そこで、膵島の大きさごとに分類したヒストグラムを作製し、さらにインスリン陽性細胞中のKi-67陽性細胞の割合を算出した。その結果、 β DGK δ KOにおいて膵臓単位面積当たりの膵島出現数およびKi67陽性細胞の割合は、直径60 μ m以下の小型の膵島群において顕著に増加していることがわかった。また、 β DGK δ KOの単離膵島において細胞周期関連遺伝子の発現が有意に増大していた。以上の結果から、 β 細胞特異的DGK δ 欠損により小型の膵島の出現が増加することが明らかとなった。すなわち、DGK δ は膵 β 細胞核内において β 細胞増殖抑制に寄与すること、核内DGK δ の発現低下により β 細胞増殖が惹起されることが示唆された。

- (5) STZ誘発糖尿病における β DGK δ KOの抗糖尿病効果の検討：DGK δ 欠損による β 細胞増殖亢進作用が、果たして抗糖尿病作用を有するのかについて、STZを用いた糖尿病モデルマウスを用いて検討をおこなった。STZ投与 β DGK δ heteroKOマウスでは60日後における随時血糖値が、STZ投与controlマウスと比較し有意に低下していた。また、膵臓凍結薄切切片を用いた免疫染色法により、STZ投与controlマウスの膵臓では β 細胞が著しく減少している一方で α 細胞の割合が増加していたことから、STZにより β 細胞が特異的に破壊されていることが確認できた。そこで、DGK δ 欠損が β 細胞量および膵島形態に与える影響について免疫染色法により解析した結果、controlマウスと比較し β DGK δ heteroKOマウスではインスリン陽性細胞面積が有意に増大し、膵島あたりの β 細胞の割合も増加していた。以上の結果から、 β DGK δ heteroKOマウスでは β 細胞量の保持により、血糖値の上昇が抑制されていることが示唆された。すなわち、 β 細胞におけるDGK δ の機能を抑制することで、 β 細胞増殖亢進作用による β 細胞量の保持の結果、STZ誘発糖尿病マウスの高血糖症状が緩和されることが示唆された。

上記の結果より、 β 細胞核に発現するDGK δ の発現を抑制することにより β 細胞増殖が引き起こされ、耐糖能が亢進することが示された。DGK δ の発現低下により核内にはDAGの蓄積が起こっていると推測

でき、核内DAG量と細胞増殖には密接な関係があると考えられていることから、本研究においても、DGK δ 欠損により増大した核内DAGが細胞周期を亢進することで、 β 細胞増殖を引き起こしていると考えられた。さらに、DGK δ 欠損により糖尿病の症状が緩和したことから、DGK δ が β 細胞増殖を目的とした新規糖尿病治療標的として非常に有用である可能性が本研究より明らかとなった。

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 6 件)

Miki Takii, Yukiko K. Kaneko 他 8 名: In sulinitropic and anti-apoptotic effects of nobiletin in INS-1D β -cells. *J Functional Foods*. 30, 8-15 (2017) 査読有 DOI: 10.1016/j.jff.2016.12.037

Yukiko K. Kaneko: Development and analysis of novel therapeutic targets to improve pancreatic β -cell function in type 2 diabetes. *Yakugaku Zasshi*, 136, 1623-1629 (2016) DOI:10.1248/yakushi.16-00211 査読有

Yukiko K. Kaneko, Tomohisa Ishikawa: Regulation of lipid metabolism by diacylglycerol kinase in pancreatic β -cell. *Yakugaku Zasshi*, 136, 461-465 (2016) 査読有 DOI: 10.1248/yakushi.15-00246-1

Taiji Sato, Yukiko K. Kaneko, Toshiaki Sawatani, Akiko Noguchi, Tomohisa Ishikawa: Obligatory role of early Ca^{2+} responses in H_2O_2 -induced β -cell apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.* 38(10), 1599-1605 (2015) 査読有 DOI: 10.1248/bpb.b15-00396

Yukiko K. Kaneko, Tomohisa Ishikawa: Diacylglycerol signaling pathway in pancreatic β -cells: the essential role of diacylglycerol kinase in the regulation of insulin secretion. *Biol. Pharm. Bull.* 38(5), 669-673 (2015) 査読有 DOI: 10.1248/bpb.b15-00060

Yukiko K. Kaneko, Miki Takii, Yumiko Kojima, Hiroko Yokosawa, Tomohisa Ishikawa: Structure-dependent inhibitory effects of green tea catechins on insulin secretion from pancreatic β -cells. *Biol. Pharm. Bull.* 38(3), 476-481 (2015) 査読有 DOI: 10.1248/bpb.b14-00789

[学会発表](計 37 件)

中山貴寛、金子雪子、佐藤太治、石渡千裕、石川揚子、木村悠希、石川智久: ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウスにおける膵 β 細胞ジアシルグリセロールキナーゼ δ 欠損の影響、日本薬学会第137年会、2017年3月26日(仙台)

澤谷俊明、金子雪子、石川智久: 膵 β 細胞におけるI型ジアシルグリセロールキナーゼ機能抑制は細胞内 Ca^{2+} 濃度を二面性に制御する、第90回日本薬理学会年会、2017年3月16日(長崎)

石渡千裕、金子雪子、佐藤太治、中山貴寛、石川揚子、石川智久: ジアシルグリセロールキナーゼ δ は膵 β 細胞において細胞増殖抑制に働く、日本薬学会第136年会、2016年3月27日(横浜)

澤谷俊明、金子雪子、石川智久: 細胞内DAGの蓄積によるインスリン分泌抑制機構の解析と2型糖尿病病態との関連、日本薬学会第136年会、2016年3月27日(横浜)

金子雪子、佐藤太治、石渡千裕、中山貴寛、石川智久: 【ワークショップ】DGシグナリングと糖尿病関連疾患 Functional role of diacylglycerol kinase δ in pancreatic β -cells. BMB 2015 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月2日(神戸)

石渡千裕、金子雪子、佐藤太治、中山貴寛、石川揚子、千葉里菜、藤貫貴大、石川智久: 膵 β 細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼ δ の役割の解明、第133回日本薬理学会関東部会 2015年10月10日(千葉)

金子雪子: 薬学会東海支部学術奨励賞受賞講演: 2型糖尿病による膵 β 細胞機能障害からの回復を目指した新規糖尿病治療標的の探索と機能解析 第61回日本薬学会東海支部大会 2015年7月4日(名古屋)

金子雪子、石川智久: 一般シボゾウム カルシウムシグナル制御研究から見えてきた内分泌・免疫系疾患の新たな創薬標的。糖尿病創薬標的としての膵 β 細胞脂質代謝制御。日本薬学会第135年会 2015年3月27日(神戸)

石川智久、**金子雪子**：シホジウム38：ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)の創薬ターゲットとしての可能性 インスリン分泌調節におけるタイプIジアシルグリセロールキナーゼの役割. 第88回日本薬理学会年会 2015年3月20日(名古屋)

金子雪子、佐藤太治、石渡千裕、千葉里菜、藤貫貴大、石川智久：膵β細胞核内ジアシルグリセロールキナーゼδの機能解析 第60回日本薬学会東海支部大会、2014年7月5日(三重)

〔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://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~pharmaco/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

金子 雪子 (KANEKO YUKIKO)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：00381038

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()