

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860689

研究課題名(和文)膵細胞におけるPI3キナーゼとGLP-1シグナルの役割と機能解析

研究課題名(英文)Functional Analysis of PI3K and GLP-1 in pancreatic beta cells.

研究代表者

諏訪内 浩紹 (Suwanai, Hirotugu)

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞は、PI3Kがインスリン分泌を調節する鍵分子である。膵細胞特異的PI3Kノックアウトマウスの膵島のマイクロアレイ解析を行った結果、egfrの発現が低下をしていた。DB/DBマウスの膵島でも発現低下が認められた。DB/DBマウスにGLP-1アナログを投与したところ血糖降下作用は全く認められなかった。また、膵細胞株の実験より、akt-foxo1経路がegfrの発現に重要であることが示された。GLP-1は、GLP-1受容体を介しegfrを活性化させ作用する。糖尿病では高血糖によりfoxo1が核内に移行、その結果、egfrの発現が低下してGLP-1アナログが作用しなかったことが予想された。

研究成果の概要(英文)：Deletion of class IA phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), using a mouse model lacking the pik3r1 gene specifically in β cells and the pik3r2 gene (bDKO mouse) results in glucose intolerance and reduced early insulin secretion. Glucose intolerance has not been alleviated with administration of GLP-1 analog in bDKO mice. Microarray analysis showed the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR). EGFR is reported to be necessary to act GLP-1 analog through betacellulin, EGFR agonist. EGFR expression in islets is suppressed in diabetic DB/DB mice. EGFR is regulated by AKT/Foxo1 pathway in vitro model. This result indicated that EGFR, regulated by PI3K AKT/ Foxo1 pathway in pancreatic β cells, is important for GLP-1 signaling.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病 膵細胞 GLP-1

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化や、交通機関の発達による運動量の低下によって、糖尿病患者数が増加している。糖尿病の病態解明と治療法の開発は現代社会において喫緊の課題となっている。糖尿病は、膵細胞のインスリン分泌が相対的に低下し、また、インスリン作用の不足により血糖値が上昇する病気である。当研究グループは、膵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 がインスリン分泌を調節する鍵分子であることを解明してきた。近年、GLP-1 アナログ製剤が糖尿病治療に使用されてきている。一方で、GLP-1 不応性の糖尿病もあり、また、GLP-1 アナログ製剤を中止すると、糖尿病は再増悪してしまう。

GLP-1 シグナルと PI3K の関与を解明するため、膵細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスに浸透圧ポンプにて GLP-1 アナログを投与した。その結果、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、膵細胞特異的 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、膵細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスでは、GLP-1 シグナルが膵細胞に十分に伝わらないことがわかった。また、GLP-1 アナログの投与により、経口血糖負荷試験では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示唆された。

次に、膵細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスと野生型マウスの単離膵島から mRNA を抽出しマイクロアレイ解析 (Affymetrix, GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array) を行った。その結果、アポリタンパク質、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、膵島内で脂質代謝異常が生

じていることが示された。また、GLP-1 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。

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 (Agilent, 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 ブロープ中、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、miR-223 など、これら 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。MIN6 細胞に PI3K 阻害薬であるワートマニン、Ly294002 を投与した実験では、48 時間の投与により ABCA1 の発現低下と miR-223 の発現上昇を認めた。

これらの結果より、1) PI3K はインスリンの初期分泌に関与しており、特に GLP-1 シグナルに必須である、2) PI3K は脂質代謝、ミトコンドリア機能、GLP-1 受容体、microRNA の発現など多岐に関与している、3) GLP-1 アナログには膵細胞外作用が存在することがわかった。

2. 研究の目的

これまでの研究結果より、1) PI3K によりコントロールされている microRNA があり、microRNA の発現が変化すること、2) 発現が変化した microRNA が、脂質代謝遺伝子の発現を低下させている可能性があること、3) 脂質代謝遺伝子の発現低下により、膵細胞に脂肪毒性が生じ、インスリン分泌が起きている可能性があることが考えられた。

これらを解明するため、膵細胞における PI3K と GLP-1 シグナルの関係、膵細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスの作成と解析、を主な目的とした。

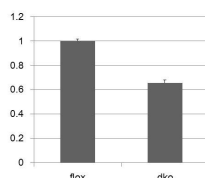
3. 研究の方法

膵細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスに GLP-1 アナログを長期投与した群と PBS を投与コントロール群、ワイルドタイプマウスに GLP-1 アナログを長期投与した群と、PBS を投与したコントロール群の 4 群から膵島を単離し、マイクロアレイ解析を行った。また、膵細胞株である MIN6 細胞に、dominant negative AKT アデノウイルス、foxo1 の dominant negative を発現させる foxo1-aaa アデノウイルス、constitutive nuclear を発現する foxo1-ADA アデノウイルスなどで PI3K/AKT/Foxo1 経路を解析した。

4. 研究成果

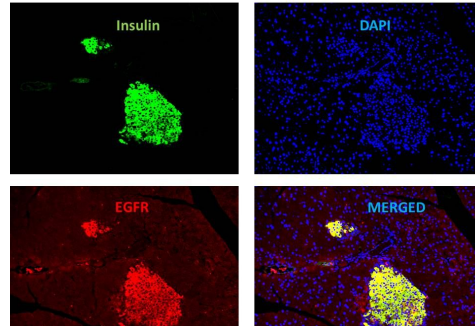
膵細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスに GLP-1 アナログを長期投与した群と PBS を投与コントロール群、ワイルドタイプマウスに GLP-1 アナログを長期投与した群と、PBS を投与したコントロール群の 4 群から膵島を単離し、マイクロアレイ解析を行った結果、インスリンにコントロールされている *glut2*, *gjd2* などの遺伝子の他、*egfr* (epidermal growth factor receptor) の発現が膵細胞特異的 PI3K ノックアウトマウスの群で低下をしていた。

膵β細胞特異的PI3Kノックアウトマウスの膵島におけるEGFRの発現

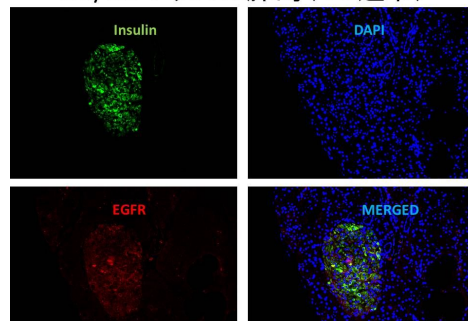


膵島の *egfr* 発現解析をしたところ有意な低下を認めた。DB/DB マウスの膵島でもコントロールマウスと比べ発現低下が認められた。

Misty/Mistyマウスの膵島(10週令)

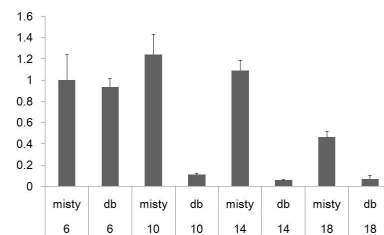


DB/DBマウスの膵島(10週令)



コントロールマウスでも18週になると6週に比べて発現が低下していることより高週齢となると *egfr* の発現が低下していた。

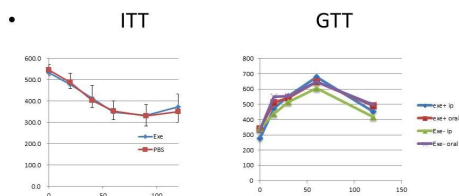
Misty/MistyマウスとDB/DBマウスの膵島におけるEGFRの発現



DB/DB マウスに GLP-1 アナログを長期投与したところ血糖降下作用は全く認められなかった。また、膵細胞株である MIN6 細胞に、dominant negative AKT を発現するアデノウイルスを感染させると *egfr* の発現が有意に低下した。foxo1 の dominant negative を発現させる foxo1-aaa アデノウイルス感染により *egfr*

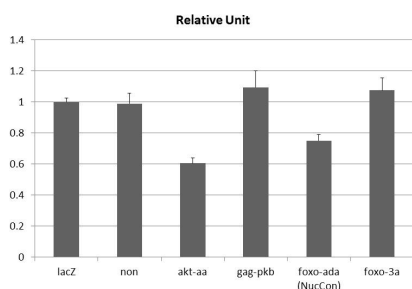
の発現は上昇し、逆に constitutive nuclear を発現する foxo1-ADA アデノウイルス感染により egfr は著明に低下することより、akt-foxo1 経路が egfr の発現に重要であることが示された。

GLP-1受容体アナログを長期投与した DB/DBマウス



GLP-1 は GLP-1 受容体を介して betacellulin を発現させ、egfr を活性化することで膵細胞に作用すると考えられている。これらから、糖尿病では高血糖により膵島が糖毒性にさらされ、foxo1 が核内に移行、その結果、egfr の発現が低下して GLP-1 アナログが作用しなかったことが予想された。現在、Texas A&M University の David Threadgill 教授より供与された EGFR flox/flox マウスと mouse insulin promoter- CRE/ERT マウスと現在交配、研究継続している。

MIN6細胞におけるEGFRの発現



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)

和文論文

諏訪内浩紹、植木浩二郎:【DPP-4 阻害薬登場後の糖尿病治療の変化】膵細胞のインスリンシグナル。カレントセラピー 32(4)331-334、2014

諏訪内浩紹、植木浩二郎:【肥満症の診療 update】肥満と生活習慣病。日本医師会雑誌 143(1)34-38、2014

諏訪内浩紹:【糖・脂質・エネルギー代謝の司令塔としての消化管】腸管免疫と 1 型・2 型糖尿病。内分泌・糖尿病・代謝内科 39(5)1884-2917、2014

〔学会発表〕(計 7 件)

諏訪内、浩紹、澤田、知伸、坂田道教、岡崎、由希子、笹子、敬洋、小林、正稔、吉田、裕樹、植木、浩二郎、門脇、孝:「インターロイキン 27 はインスリン抵抗性や糖尿病発症を抑制している。」第 30 回日本糖尿病合併症学会(2015 年 11 月 愛知・名古屋) Hirotsugu Suwanai, Tomonobu Sawada, Hiroki Yoshida, Takashi Kadowaki and Kohjiro Ueki: Obesity-induced insulin resistance and altered gut microbiota in mice lacking Interleukin-27. 75th Scientific Sessions, American Diabetes Association (Boston, USA, 2015.6)

諏訪内浩紹、澤田知伸、岡崎由希子、笹子敬洋、小林正稔、吉田裕樹、植木浩二郎、門脇孝:「インターロイキン 27 はインスリン抵抗性や糖尿病発症を抑制している」第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会(2015 年 5 月 山口・下関)

諏訪内浩紹、森田あい、澤田知伸、三宅加奈、浅野大樹、鈴木亮、植木浩二郎、黒川峰夫、門脇孝:「2 型糖尿病の加療中に劇症 1 型糖尿病を発症した急

性骨髓性白血病の1例」(症例)第609
回日本内科学会関東地方会(2014年
10月 東京・文京区)

諏訪内浩紹、植木浩二郎、岡崎由希子、
笹子敬洋、小林正稔、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57回日
本糖尿病学会年次学術集会(2014年5
月 大阪・大阪市)

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 β cells. Asia-Pacific
Diabetes and Obesity Study Group
symposium (Tokyo, Japan, 2013.10)

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(2013年10月 東京・千代
田区)

〔その他〕

ホームページ等

<http://dm.umin.jp/dmsd/>

6. 研究組織

(1) 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