

機関番号：11101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009~2010

課題番号：21790858

研究課題名(和文) 膵β細胞スフィンゴ脂質受容体を標的とした新規 2 型糖尿病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy for type 2 diabetes targeting sphingolipid receptor on pancreatic beta cell

研究代表者 水上 浩哉 (Mizukami Hiroki)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00374819

研究成果の概要 (和文)：

スフィンゴ脂質シグナルを利用した膵β細胞保護作用の可能性を検討するため、Cre-LoxP システムを用いて膵β細胞特異的 S1P1 ノックアウトマウス(β S1P1KO)を作製した。β S1P1KO は in vivo では明らかな形質を示さなかった。しかしながら、β S1P1KO 単離膵島ではコントロール膵島に比し、Forskolin 刺激に対しインスリン分泌促進、細胞内 Ca²⁺の振幅亢進を示した。β S1P1KO 膵島 100 個をストレプトゾトシン (STZ) 誘導 1 型糖尿病モデルマウスに移植すると、コントロールに比し有意な血糖降下作用が認められた。以上からβ細胞における S1P1 シグナルの阻害はストレスに対しβ細胞保護作用を示し、新たな治療標的につながる可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

To evaluate the function of sphingolipid signaling in pancreatic β cells, β cell specific S1P1 knocked out mouse was generated using Cre-Lox P system. β S1P1KO showed no apparent phenotype in vivo. Forskolin potentiated insulin secretion was promoted in isolated islet of β S1P1KO compared to control. In whole islet patch clump, forskolin stimulated hyper-oscillation of Ca²⁺ was observed in β S1P1KO islet even under 500nM S1P. In islet transplantation experiment, marginal number of β S1P1KO islets (100) successively lowered glucose level in STZ induced type 1 diabetic model mouse, but not of control islets. Collectively, inhibition of S1P1 signaling in β cells can lead to protection against β cell injury and lead to a new type of β cell therapy in diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：7207

キーワード：①スフィンゴ脂質、②β細胞、③2型糖尿病、④G 蛋白共益受容体、⑤S1P1

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化に伴い 2 型糖尿病は本邦

において爆発的に増加しており、大きな社会問題となっている。2 型糖尿病の成因として、

日本人においては特に膵β細胞の機能不全が言われてきたが、最近の論文からは進行性β細胞脱落がその本態とされている。それに従って、2型糖尿病におけるβ細胞に対する治療方針も変化してきている。従来のスルフォニルウレア剤では、β細胞インスリン分泌を促進するも、同時にβ細胞の疲弊、脱落を招き、結果としてインスリン導入を早める可能性が指摘されている。単なるインスリン分泌促進だけでなく、β細胞保護を考慮した薬剤の開発が現在急務となっている。申請者はスフィンゴ脂質と疾患の関係について関心をもち、主にその合成酵素欠損疾患モデルマウスについて病態解析を行ってきた。その過程で、脂肪酸の代謝により合成されるスフィンゴ脂質の Sphingosine-1-phosphate (S1P) が、特異的 G 蛋白共役受容体群を介して糖尿病のβ細胞インスリン分泌と強いつながりがある可能性を見出した。さらに、S1P はサイトカインによる膵β細胞死を、特異的受容体群を介して阻害する可能性が示されている。

S1P 受容体群の中でも、S1P1 は生体内に幅広く発現しており、S1P の結合により様々なシグナルを伝達する。成体では S1P1 は血管形成、T リンパ球のホーミングなどに関連している。しかしながら、β細胞における S1P1 の機能は未だ解析されていない。S1P1 は G 蛋白のうち、Gi とのみ共役しており、そのシグナル経路に MAP kinase (Erk) のリン酸化、Akt のリン酸化がある。これら分子のリン酸

化により、β細胞増殖、保護作用が惹起されることが知られている。肥満型糖尿病では、末梢のインスリン受容体の抵抗性の増強により、代償性の膵島過形成、終局的にβ細胞脱落を呈する。高脂肪状態では、血清 S1P 量が2倍に増加することが報告されており、その受容体である S1P1 を介したβ細胞増殖、保護作用の可能性が強く予想される。

2. 研究の目的

今回の研究では、β細胞 S1P1 のβ細胞保護効果に焦点を当てる。そのためには (1) β S1P1KO を用いた in vivo でのβ細胞における S1P1 の機能評価、特にβ細胞増殖に関する評価、(2) β S1P1KO 単離膵島を用いた ex vivo における膵島機能の評価、(3) ストレスに対する S1P1 の役割を検討するため、β S1P1KO 膵島を用いた膵島移植実験における生着率の評価をそれぞれ行う。

3. 研究の方法

I. β細胞特異的S1P1欠損マウス(β S1P1KO)を用いた解析

1) in vivoの解析

Cre-LoxP systemを用いたβ S1P1KOマウスを用いる。市販されているRat insulinプロモーターで制御されているCreマウスはインスリン分泌不全が報告されているため、今回はPdx-1 プロモーターで制御されているCreマウスを用いる。Pdx-1 Creは共同研究者である米国NIHのRichard Proia博士から供与を受けている。

① 経時的体重、膵臓重量、血糖(随

時、空腹時)、血清インスリン量の測定

- ② 腹腔内および経口耐糖能試験の実施
- ③ インスリン耐性試験の実施
- ④ 膵島の経時的形態観測 (H&Eおよびインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、PPなどの免疫染色) (自動染色装置による)
- ⑤ 切片上の β 細胞面積の計測
- ⑥ TUNEL法、抗活性化caspase3抗体を用いた免疫染色によるアポトーシスの検索 (In situ apoptosis detection kit, Millipore)
- ⑦ BrdU取り込みからのin vivo細胞増殖の検討

2) Ex vivoの解析

β S1P1K0からコラゲナーゼ法にて膵島を単離する。単離膵島を用いて、実験を行う。(Liberase RI, Roche diagnostic)

- ① 単離膵島におけるDNA組み換え及びS1P1mRNAの発現の検討。
- ② ブドウ糖に対するインスリン分泌能の検討。(Rat insulin ELISA kit, Morinaga)
- ③ $G\alpha$ シグナル活性化によるインスリン分泌能の検討
単離膵島を5 μ M Forskolin、100 μ M IBMX、100nM S1Pで刺激し膵島インスリン分泌をELISAにて検討す。
- ④ Whole-islet patch clamp法によるForskolin、S1Pに対する Ca^{2+} 振幅の変化の検討

3) 膵島移植実験

β S1P1K0及びコントロールから単離した膵島を用いる。STZで糖尿病を誘導した1型モデルマウスに経門脈的に膵島100個を移植する。400個の移植で血糖の完全回復が報告されているので、通常100個ならば血糖の回復は乏しい。経過中に血糖を測定し、2か月後に肝臓を摘出し、組織的に検討する。

4. 研究成果

1) in vivoの結果

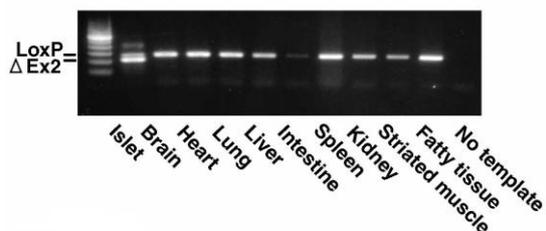
- ① PDX-1-Cre との交配をした S1P1 LoxP マウスはメンデルの法則により出生してきた。
- ② 体重、空腹時血糖、随時血糖、空腹時インスリン、随時インスリンはコントロールと明らかな差は認められなかった。
- ③ 腹腔内、経口糖負荷試験 (2g/Kg) も明らかな差は認められなかった。
- ④ インスリン負荷試験においても明らかな差は見いだせなかった。
- ⑤、⑥ 膵島の細胞構成、容積を画像解析ソフト (Image J, free software, NIH) にて検討を加えたが、明らかな差を見出すことはできなかった。
- ⑦ TUNEL 法にて β 細胞のアポトーシスを検討したが、明らかな差を見出すことはできなかった。
- ⑧ BrdU を用いた膵 β 細胞増殖能の検討においても明らかな差を見出すことはできなかった。

2) Ex vivoの解析

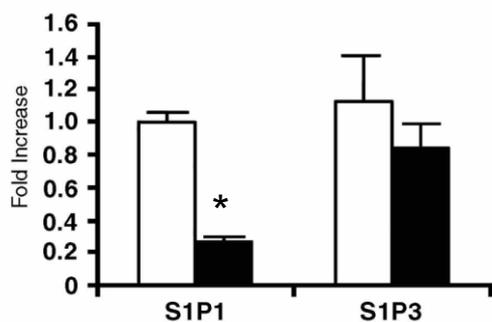
1. 単離膵島におけるDNA組み換え及びS

1P1mRNAの発現の検討。

単離膵島を用いてPCRにてCreによるDNAの組み換えが起きているか検討した。膵島にのみ組み換えバンドである Δ エクソン2が認められた。



また、Realtime PCRで膵島におけるS1P1の発現を検討したところ、コントロール膵島に比べ80%の発現低下が認められた。



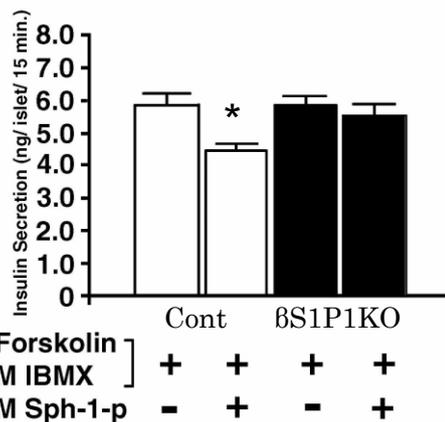
Open bar: Control, Closed bar: β S1P1KO, * $p < 0.01$ vs Control

このことから、膵島S1P1の遺伝子組み換え、発現低下が β S1P1KOで起きていることが確認された。

2. ブドウ糖に対するインスリン分泌能の検討。

5.6mM、16.7mMのグルコースで30分間刺激してインスリン分泌を検討した。明らかなインスリン分泌には差を認めなかった。

3. $G\alpha$ シグナル活性化によるインスリン分泌能の検討。

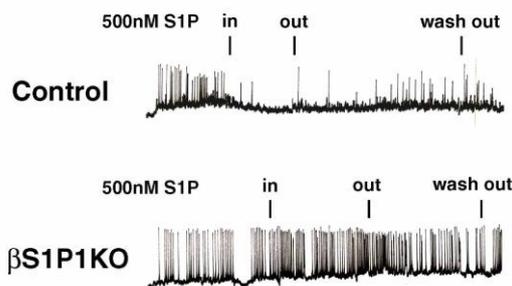


Open bar: Control, Closed bar: β S1P1KO, * $p < 0.01$ vs Control (Forskolin+IBMX)

100 nM S1P存在下に 5uM Forskolin、100uM IBMXで刺激を加えるとコントロールではインスリン分泌が有意に抑制されたが、 β S1P1KOではS1Pによる抑制効果が認められなかった。

3. パッチクランプ法によるForskolin、S1P刺激に対する Ca^{2+} の振幅の変化についての検討。

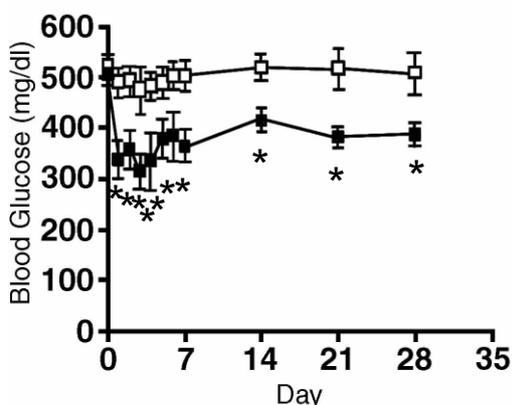
D



500 nM S1P存在下に 5uM Forskolin、100uM IBMXで刺激を加えるとコントロールでは細胞膜 Ca^{2+} の振幅が抑制されたが、 β S1P1KOではS1Pによる抑制効果が認められなかった。

3) 膵島移植実験

マージナルナンバーである100個の膵島を門脈的に移植した。移植後の血糖の推移を以下に示す。

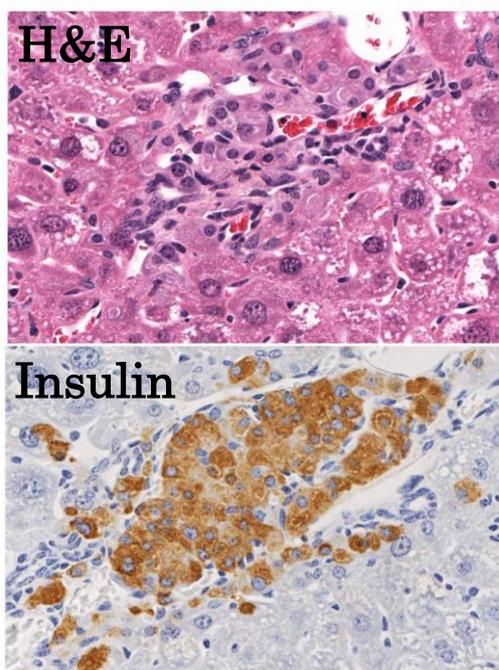


Open square: Control, Closed square: β S1P1KO, * $p < 0.01$ vs Control, $n = 10$

β S1P1KO 膵島移植群は移植後速やかに

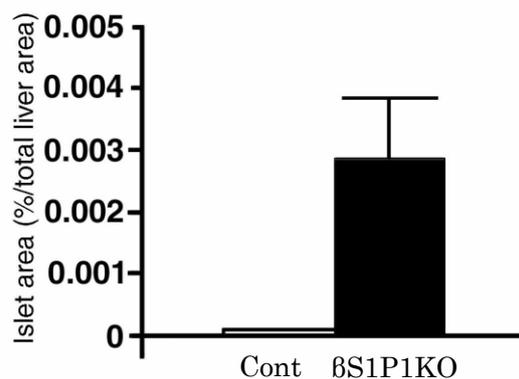
血糖が改善し、その効果は移植後 28 日においても持続した。

また組織的に門脈内に生着した膵島を観察した。



β S1P1KO 膵島移植群では H&E、インスリン免疫染色で明らかに膵島の生着が確

認できた。次に生着した膵島の面積を計測した。



コントロールでは膵島の生着は皆無に等しかったが、 β S1P1KO 膵島移植により有意な膵島の生着が認められた。

以上の結果から、膵 β 細胞において機能的な S1P1 の存在が確認された。 β 細胞 S1P1 はグルコース依存性インスリン分泌への関与は乏しい。しかしながら膵島移植実験から S1P1 経路阻害は β 細胞のストレス抵抗性を高める可能性が示された。特に膵島移植直後には tissue factor の産生亢進によりマクロファージの浸潤、膵島破壊につながる事が知られている。S1P1 が tissue factor 分泌に関与していることも報告されている。このことから、S1P1 経路阻害により移植膵島からのサイトカイン分泌を抑制している可能性がある。2 型糖尿病でも膵島からの TGF β などのサイトカイン分泌亢進が知られている。よって 2 型糖尿病 β 細胞においても S1P1 経路の阻害は新たな治療に結びつく可能性があり、さらなる研究が必要と考えられた。

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0件)

[学会発表] (計1件)

① 水上浩哉、春日加奈子、八木橋操六
膵島移植における膵β細胞 S1P1 の役割に
ついて。第97回日本病理学会総会
5.15-17、於金沢

[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:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水上 浩哉 (Mizukami Hiroki)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 00374819