

令和 5 年 4 月 25 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19093

研究課題名(和文) 組織によって生理的濃度域が異なるインスリンの感知機構とその役割

研究課題名(英文) Insulin sensing mechanism and its role in pancreatic beta-cells

研究代表者

原田 直樹 (Harada, Naoki)

大阪公立大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：00529141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、主に膵臓細胞における小胞体ストレスに対するインスリンの影響について検討を行った。INS-1細胞において、小胞体ストレス誘導剤に対するアポトーシスがインスリンによって抑制された。膵臓細胞に対するアポトーシス抑制作用において、インスリンはIGF-1よりも生理的に重要であると考えられた。インスリンは小胞体ストレス自体を抑制せずにアポトーシスを抑制した。インスリンのアポトーシス抑制作用は、ミトコンドリア膜電位の上昇抑制を一部介しているが、活性酸素種の消去によるものではないと示唆された。インスリンによる作用はcaspase-12を介した調節であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓細胞量の減少に伴うインスリン分泌の減少は、糖尿病の発症や進行につながる。そのため、膵臓細胞量を調節するメカニズムを理解して応用することが、糖尿病の予防につながる。本研究では、重度の小胞体ストレスによるアポトーシスに対して、インスリンが抑制に重要であること、一般的なアポトーシスと異なって高次分化した膵臓細胞では小胞体ストレスによってミトコンドリア膜電位が上昇し、インスリンによって減少するという学術的に興味深い現象が観察された。これらの結果は、インスリンが筋肉や肝臓、脂肪組織に加えて、膵臓細胞自身の維持にも生理的に重要な役割をもつことを示すものである。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the effects of insulin on endoplasmic reticulum stress in pancreatic β -cells. Insulin inhibited apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress inducers such as tunicamycin and thapsigargin in INS-1 pancreatic β -cells. Insulin appeared to be more physiologically important than IGF-1 in suppressing apoptosis in pancreatic β -cells. Insulin suppressed tunicamycin-induced apoptosis without suppressing endoplasmic reticulum stress itself. The inhibitory effect of insulin on apoptosis was suggested to be mediated in part by suppression of mitochondrial membrane potential elevation, but not by reactive oxygen species scavenging. Caspase-12 was involved in the suppression of apoptosis by insulin.

研究分野：栄養生化学

キーワード：インスリン 膵臓細胞 小胞体ストレス tunicamycin caspase-12 膜電位

1. 研究開始当初の背景

ホルモンを産生・分泌する組織では、末端組織よりも濃度が高い。インスリンは膵臓細胞で産生分泌され、筋肉、肝臓や脂肪組織で作用するが、膵臓細胞自身にも作用する。膵細胞と筋肉におけるインスリンの作用濃度域は異なるが、ともに生理濃度域での変化を感知して作用する。つまり、膵細胞では高濃度域、抹消組織では低濃度域での濃度変化を感知する。本研究を開始するまでに、膵細胞選択的に発現する Inceptor がこの違いを説明する分子であることが報告された [Nature, 590, 326-31, 2021]。

2型糖尿病の発症は、インスリンを産生・分泌する膵臓β細胞の機能低下や細胞死によるインスリン分泌量の低下が一因となる。β細胞では、多量に産生するインスリンの折り畳みによる負荷のために、通常時から小胞体にストレスが生じている。慢性的な高血糖によりインスリン産生が亢進すると、小胞体にさらに負荷がかかりアポトーシスが誘導される。インスリンは、血糖値降下作用を持つだけでなく、一般に、細胞生存・増殖にも関与する。ノックアウトマウスを用いた先行研究から、膵細胞の増殖や細胞死の抑制にインスリン受容体とインスリン増殖因子1 (IGF-1) 受容体の重要性は明らかになっていたが、インスリンと IGF-1 のいずれが生理的に重要であるかについては不明であった。また、その作用機構の詳細については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、インスリンが膵細胞と抹消組織で作用濃度域が異なることを説明するために、Inceptor が関与しない他のメカニズムについて検討すること、および膵細胞におけるインスリンの生理作用に焦点を当てて研究を行うこととした。膵細胞は大量のインスリン合成のために、通常時から小胞体ストレスがかかっており、慢性的な高血糖は膵細胞にフォールディング能を超えるインスリン産生を要求する結果、重度の小胞体ストレスが生じて膵細胞死が誘導される。そこで、小胞体ストレス誘導に対するインスリンの作用に注目して検討を行った。

3. 研究の方法

ラット膵細胞株である INS-1 細胞を用いて、N型糖鎖修飾阻害剤である tunicamycin や Ca^{2+} ポンプ (Ca^{2+} -ATPase) 阻害剤である thapsigargin による小胞体ストレスによって誘導された細胞障害に対するインスリンおよび IGF-1 の作用について検討を行った。細胞生存能に関しては、AlamarBlue によるミトコンドリアの呼吸活性を測定した。アポトーシスの評価には Western blot 法による cleaved caspase-3 の発現レベルや DNA ladder の検出を用いた。遺伝子の発現変動は RNA 抽出後に逆転写により cDNA を作製後、リアルタイム PCR を行うことで評価した。ミトコンドリアの膜電位への影響については、膜電位依存的な蛍光検出試薬ある JC-1 と rhodamin 123 を用いて評価した。

4. 研究成果

INS-1 細胞において、小胞ストレス誘導剤濃度依存的に細胞生存能が低下した。この細胞生存能の低下に対して、インスリンや IGF-1 は濃度依存的に、この細胞生存能低下を抑制した。同一の濃度で比較した場合には、インスリンよりも IGF-1 の方が、強力な細胞生存能の低下抑制作用を示した。一方で、近年膵細胞が存在する膵島内のインスリン濃度が約 $1\mu\text{M}$ であることが推測されており、血中・膵臓中の IGF-1 濃度が約 30 nM であると考えられている。これらの膵臓細胞周辺における生理的濃度条件を勘案すると、インスリンの方が、IGF-1 よりも細胞生存能の低下抑制作用が強く、生理的に重要であると考えられた。

アポトーシスマーカーである cleaved caspase-9、cleaved caspase-3 レベルや DNA ladder 検出法を用いて評価したアポトーシス実行時の DNA の断片化はともに、tunicamycin によって増加してインスリンによって抑制された。これらの結果から、膵β細胞においてインスリンが小胞体ストレス誘導性アポトーシス抑制作用をもつことが明らかとなった。

小胞体ストレスマーカーである *Atf4*、*spliced Xbp1*、*Grp78*、*Chop* の発現量を評価した結果、インスリンは tunicamycin による小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現増加を抑制せず、むしろ一部強めたことから、インスリンは小胞体ストレスを抑制せずにアポトーシス抑制作用を示すことが示唆された。アポトーシス促進因子である *Bax* と *Txnip* の発現が tunicamycin によって増加し、インスリンによって抑制された。さらに、細胞分画法を用いた検討により、TXNIP がサイトゾルだけでなくミトコンドリアにも存在し、tunicamycin によってそれぞれの画分における TXNIP の発現量が増加することが判明した。これらの結果から、インスリンが小胞体ストレスからミトコンドリアアポトーシス経路の間に作用していること、さらに TXNIP の発現増加抑制が標的のひとつとして示唆された。

細胞生存能において、ミトコンドリア膜電位の調節は重要な役割を担うことから、tunicamycin、thapsigargin およびインスリンによるミトコンドリア膜電位への影響を JC-1 と rhodamin 123 を用いて評価した。その結果、tunicamycin および thapsigargin によってミトコンドリア膜電位が経時

的に上昇し、インスリンによって抑制された。ミトコンドリア膜電位の変動は一般的なアポトーシス時とは逆であった。このとき、ミトコンドリア量に変化はみられなかった。さらに、脱分極剤 FCCP によって、tunicamycin による小胞体ストレス誘導性細胞生存率の低下が抑制された。一方、抗酸化剤 (*N*-acetylcystein および vitamin E) では、tunicamycin による細胞生存率の低下を抑制しなかった。さらに、細胞分画により cytochrome *c* の局在を評価した。その結果、tunicamycin による cytochrome *c* のミトコンドリアからサイトゾルへの放出は生じなかった。これらの結果から、インスリンのアポトーシス抑制作用はミトコンドリア膜電位の上昇抑制を一部介しているが、活性酸素種の消去によるものではないことが示唆された。

インスリンの作用機序を解明するために、PI3K 阻害剤 wortmannin と MEK1/2 阻害剤 U0126 を用いて検討を行った。細胞生存率を評価したところ、wortmannin および U0126 によってインスリンの作用が減弱した。次に、各シグナル伝達因子のリン酸化レベルを western blot 法を用いて評価した。その結果、tunicamycin による PI3K/Akt シグナリングの抑制と MEK/ERK シグナリングの活性化をインスリンが緩和した。これらの結果から、インスリンのアポトーシス抑制作用が PI3K/Akt シグナリングの活性化と MEK/ERK シグナリングの抑制を介していることが示唆された。

Tunicamycin による小胞体ストレスが caspase-9 を活性化する caspase-12 の発現量に与える影響を検討するため、INS-1 細胞にインスリンと tunicamycin を共添加し、ウエスタンブロットにより caspase-12 の発現レベルを評価した。その結果、procaspase-12 と cleaved caspase-12 の発現レベルは tunicamycin により有意に増加し、インスリンにより抑制された。Caspase-12 の発現の調節は、mRNA レベルでも観察された。さらに、caspase-12 を INS-1 細胞に高発現させると細胞生存率が低下すること、tunicamycin による細胞生存能の低下は caspase-12 阻害剤によって一部阻害されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 原田直樹	4. 巻 4
2. 論文標題 膵 細胞の発達へ及ぼすアンドロゲンの作用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 73-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田菜々子、西村佳那、原田直樹、北風智也、乾博、山地亮一.
2. 発表標題 膵臓 細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシスに対するインスリンの抑制作用とその機構の解明
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本修哉、浦川夏帆、田宮央登、原田直樹、山地亮一、北風智也、乾博、松村成暢、真下知士.
2. 発表標題 膵 細胞における酸化ストレスによるRedd2 の発現調節と個体レベルでの役割
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

食品代謝栄養学-大阪公立大学
<https://cms-admin.omu.ac.jp/agri/nc/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------