

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591315

研究課題名(和文) 副交感神経による膵 細胞機能維持の解析

研究課題名(英文) Pancreatic beta-cell maintenance by parasympathetic nerve

研究代表者

伊藤 譲 (ITO, Yuzuru)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00512980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：副交感神経の主要な伝達物質であるアセチルコリンが、膵 細胞機能維持にかかわる分子機構を明らかにすることを目的とした。培養膵 細胞とマウスを用い検討したところ、培養膵 細胞、マウスともにアセチルコリン投与により膵 細胞増殖が起きることが明らかとなった。アセチルコリンによる膵 細胞増殖機構として、阻害剤、欠損マウスの解析から今まで重要と考えられている分子(IRS-2, Akt, MAPkinase)とは異なった別の分子の関与が考えられた。マウスにコリン作動薬投与を行うと膵 細胞増加を起こすとされているGLP-1分泌の増加を認め、増殖に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular mechanism of acetylcholine which was the major neurotransmitter of the parasympathetic nerve, in pancreatic beta-cell maintenance. Pancreatic beta-cell proliferation was caused by the acetylcholine administration in pancreatic beta-cell line (MIN6) and mouse. It is known that the molecules such as IRS-2, Akt and MAPkinase, make the important role in mechanism of pancreatic beta-cell proliferation. However, acetylcholine was able to stimulate the pancreatic beta-cell proliferation independently of these molecules. GLP-1 secretion was increased by the acetylcholine administration in mouse. It was suggested that acetylcholine caused beta-cell proliferation through GLP-1.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：膵 細胞 アセチルコリン GLP-1

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者では発症初期からインスリン分泌障害を含めた膵細胞機能障害が認められることや、膵細胞量が早期から減少していることが明らかとなり、あらためて膵細胞の重要性が認識されている。近年下記のように、膵細胞機能維持には中枢神経による調節が重要視されており、本研究では副交感神経の主要な神経伝達物質であるアセチルコリンに注目した。

(1) 食物摂取前より視覚や嗅覚の刺激で脳から迷走神経を介して膵細胞近傍の神経終末からアセチルコリンが分泌され細胞からインスリンが分泌される。更に摂食中もアセチルコリンはグルコース応答性インスリン分泌を増強する(Gromada and Hughes, Cell Metabolism 3, 390, 2006)。

(2) アセチルコリンのレセプターである M3 receptor の細胞特異的欠損マウスが報告され、耐糖能異常、インスリン分泌の低下を示している (Gautam et al. Cell Metabolism 3, 449, 2006)。

(3) 膵臓迷走神経遮断により膵細胞増加が抑制される (Imai et al. Science 322, 1250, 2008, Edvell et al. Am. J. Physiol. 274, E1034, 1998)

以上から、迷走神経、副交感神経が膵細胞の量や機能の維持に重要な役割をなしていると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、血糖コントロールに関わる器官として脳・神経を組み入れ、その中でも特に副交感神経に注目し膵細胞機能への影響を解析することを目的とした。第1に副交感神経の主要な神経伝達物質であるアセチルコリンが膵細胞機能維持(インスリン分泌、インスリンシグナルを介しての細胞の生死、複製)にどのように関わっているかを明らかにし、神経伝達物質の作用を調節する分子を探索する。第2に新規糖尿病治療薬として注目されている消化管ホルモン GLP-1 の膵細胞機能維持において、神経調節の関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 神経伝達物質(アセチルコリン)の膵細胞増殖能、インスリンシグナルの検討

膵細胞 cell line である MIN6 細胞、マウス、マウスから単離した膵島の各々をアセチルコリンアナログにて刺激し、細胞増殖能、インスリン分泌、インスリンシグナルの検討を行う。細胞増殖能の評価は、MIN6 細胞では BrdU の取り込みを FACS を用いて行い、マウスでは膵細胞への BrdU の取り込みを

組織学的に検討した。インスリン分泌の評価は ELISA 法を用い、インスリンシグナルの解析は Western blot 法を用い検討した。

(2) GLP-1 の細胞増殖機構への神経調節の役割

マウスにコリン作動薬投与を行い GLP-1 分泌の変化を検討する。MIN6 に GLP-1、カルバコール刺激を行い細胞増殖、インスリンシグナルの相加相乗効果の検討する。

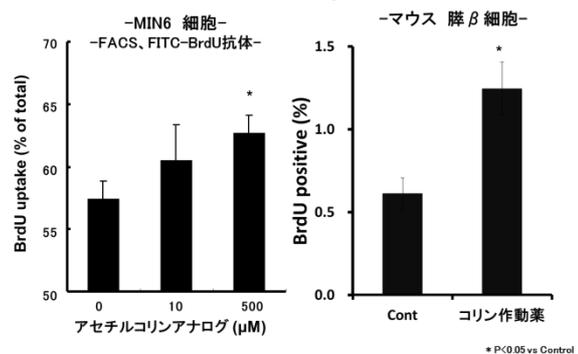
(3) 細胞においてアセチルコリンやそのレセプター M3 receptor の作用を調節する分子の探究

各種糖尿病モデルマウス(グルコキナーゼ欠損マウス、IRS(insulin receptor substrate)-1 欠損マウス、IRS-2 欠損マウス等)や、関連分子を遺伝子導入した MIN6 細胞、siRNA でのノックダウンした細胞を用いアセチルコリン刺激によるインスリン分泌、細胞増殖能を比較検討する。

## 4. 研究成果

アセチルコリンの膵細胞増殖能につき、膵細胞 cell line である MIN6 細胞とマウスを用い検討した。MIN6 細胞の検討ではアセチルコリン添加により細胞数が増加し、BrdU 取り込みも有意に増加していた。マウスにコリン作動薬を経口投与し組織学的に膵細胞への BrdU 取り込みを検討したところ、アゴニスト投与にてマウスの膵細胞増殖が起きることを確認した(図1)。

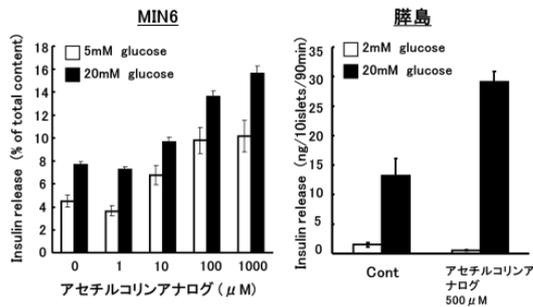
図1. アセチルコリンによるβ細胞増殖能の検討



インスリンシグナルの活性化は膵細胞の複製に関わっているとされており、アセチルコリン刺激によるインスリン分泌やインスリンシグナル活性化、その下流分子の活性化を検討した。

アセチルコリン刺激インスリン分泌を、MIN6 細胞とマウスを用い検討したところ、MIN6 細胞では、アセチルコリン刺激により低濃度、高濃度ブドウ糖下ともにインスリン分泌の増加を認め、マウスの検討でも、アセチルコリン皮下投与によりインスリン分泌増加作用を認めた。またマウス単離膵島においても同様にインスリン分泌増加を認めた(図2)。

図2. アセチルコリン刺激によるインスリン分泌



マウスでは、インスリン分泌増加とともに糖負荷後の血糖改善作用を確認した。この血糖改善効果は糖尿病モデルマウスである IRS-1 欠損マウス、IRS-2 欠損マウスでも、同様に認められた。

MIN6 細胞で、アセチルコリン刺激により IRS-2 と MAPkinase リン酸化が亢進していたが、Akt のリン酸化は認められなかった。MAPkinase 阻害剤による検討では、アセチルコリン刺激による BrdU 取り込みは抑制されなかった。また、IRS-2 欠損マウスを用いた組織学的解析では、コリン作動薬投与による膵細胞での BrdU 取り込みは抑制されなかった。以上から、アセチルコリンによる膵細胞増殖機構として、IRS-2、Akt、MAPkinase 非依存性の経路が関与していると考えられた。

マウスにコリン作動薬投与を行うと GLP-1 分泌の増加を認め、細胞増殖に関与している可能性が考えられた。

## 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 15 件)

1. 伊藤 譲, 寺内 康夫 最新肥満症候学 V. 症候性肥満の成因と病態 インスリノーマ. 日本臨床 72 : 342-346, 2014 査読無
2. Masuda K, Aoki K, Kamiko K, Takihata M, Ito Y, Nagakura M, Kawasaki S, Akema N, Hasegawa M, Nakajima S, Toumura S, Tsunoda S, Enomoto H, Shimotomai H, Terauchi, Y.: Glycemic control after addition of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin in patients with type 2 diabetes showing inadequate response to thrice-a day treatment with  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14 ( 9 ) :1111-8, 2013. doi: 10.1517/14656566.2013.790365. 査読有
3. Tajima K, Shirakawa J, Togashi Y, Inoue H, Sato K, Orime K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Nakamura A, Aoki K, Goshima Y, Atsumi T, Terauchi, Y.: AMPK is involved in the regulation of

incretin receptors expression in pancreatic islets under a low glucose concentration. *PLoS One*, 8(5):e64633. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0064633. 査読有

4. Tajima K, Nakamura A, Shirakawa J, Togashi Y, Orime K, Sato K, Inoue H, Kaji M, Sakamoto E, Ito Y, Aoki K, Nagashima Y, Atsumi T, Terauchi, Y.: Metformin prevents liver tumorigenesis induced by high-fat diet in C57Bl/6 Mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 305: E987-98, 2013. doi: 10.1152/ajpendo.00133. 査読有

5. Orime K, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Inoue H, Ito Y, Sato K, Nakamura A, Aoki K, Goshima Y, Terauchi, Y.: Trefoil Factor 2 Promotes Cell Proliferation in Pancreatic  $\beta$ -Cells through CXCR-4-Mediated ERK1/2 Phosphorylation. *Endocrinology*, 154(1): 54-64, 2013. doi: 10.1210/en.2012-1814. 査読有

6. 伊藤 譲, 寺内 康夫 KEYWORD SREBP 脂肪肝や糖インスリン代謝など生活習慣病に深くかかわる. *Cardio-Lipidology* 6 : 80-83, 2012 査読無

7. Sato K, Nakamura A, Shirakawa J, Muraoka T, Togashi Y, Shinoda K, Orime K, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi, Y.: Impact of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin on glucose tolerance, beta cell function and mass in insulin receptor substrate-2-knockout mice fed a high-fat diet. *Endocrinology*, 153: 1093-1102, 2012. doi: 10.1210/en.2011-1712. 査読有

8. Nakamura A, Togashi Y, Orime K, Sato K, Shirakawa J, Ohsugi M, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi, Y.: Control of beta cell function and proliferation in mice stimulated by small molecule glucokinase activator under various conditions. *Diabetologia*, 55(6): 1745-54, 2012. doi: 10.1007/s00125-012-2521-5. 査読有

9. Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Orime K, Kikuchi K, Miyazaki T, Sato K, Kimura M, Goshima Y, Terauchi, Y.: Plasminogen activator inhibitor-1 is associated with renal dysfunction independent of BMI and serum lipid levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 97(1): e7-e10, 2012. doi: 10.1016/j.diabres.2012.03.017. 査読有

10. Shirakawa J, Tanami R, Togashi Y, Tajima K, Orime K, Kubota N, Kadowaki T, Goshima Y, Terauchi, Y.: Effects of liraglutide on  $\beta$  cell-specific glucokinase-deficient neonatal mice. *Endocrinology*, 153(7): 3066-75, 2012. doi: 10.1210/en.2012-1165. 査読有

11. Nakamura A, Tajima K, Zolzaya K,

Sato K, Inoue R, Yoneda M, Fujita K, Nozaki Y, Kubota KC, Haga H, Kubota N, Nagashima Y, Nakajima A, Maeda S, Kadowaki T, Terauchi Y: Protection from nonalcoholic steatohepatitis and liver tumorigenesis in high fat-fed insulin receptor substrate-1-knockout mice despite insulin resistance.

*Diabetologia*, 55:3382-91, 2012. doi: 10.1007/s00125-012-2703-1. 査読有

12. Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T: Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle.

*Cell Metab.*, 13: 294-307, 2011. doi: 10.1016/j.cmet.2011.01.018. 査読有

13. Shirakawa J, Fujii H, Ohnuma K, Sato K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Koganei M, Sasaki H, Nagashima Y, Amo K, Aoki K, Morimoto C, Takeda E and Terauchi Y: Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice.

*Diabetes*, 60(4):1246-57. 2011. doi: 10.2337/db10-1338. 査読有

14. Shirakawa J, Amo K, Ohminami H, Orime K, Togashi Y, Ito Y, Tajima K, Koganei M, Sasaki H, Takeda E, Terauchi Y: Protective effect of a dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor against increased  $\beta$  cell apoptosis induced by dietary sucrose and linoleic acid in mice with diabetes. *J Biol Chem*. 286: 25467-76. 2011. doi: 10.1074/jbc.M110.217216 査読有

15. Muraoka T, Aoki K, Iwasaki T, Shinoda K, Nakamura A, Aburatani H, Mori S, Tokuyama K, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y. Ezetimibe decreases SREBP-1c expression in liver and reverses hepatic insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Metabolism*. 60: 617-28, 2011. doi: 10.1016/j.metabol.2010.06.008. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 伊藤 譲, 澁谷 誠, 吉村 公一郎, 細川 紗帆, 山本 葉子, 永田 亮, 杉浦 賢, 寺内 康夫

妊娠糖尿病にてインスリン治療が必要となった症例の臨床背景に関する検討 第 56 回

日本糖尿病学会学術集会, 熊本, 2013 年 5 月 18 日

2. 伊藤 譲, 白川 純, 田波 律子, 折目 和基, 瀧端 正博, 田島 一樹, 宮崎 岳之, 佐藤 光一郎, 菊地 香織, 増田 清美, 村岡 知則, 富樫 優, 中村 昭伸, 土屋 博久, 澁谷 誠, 木村 真理, 寺内 康夫 副交感神経伝達物質による膵細胞機能制御の解析 第 54 回日本糖尿病学会学術集会, 札幌, 2011 年 5 月 20 日

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 譲 (ITO, Yuzuru)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 00512980

(2)研究分担者

寺内康夫 (TERAUCHI, Yasuo)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号: 40359609