

令和元年6月19日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09762

研究課題名(和文) 脳・神経系による膵細胞量増加機序の解析

研究課題名(英文) Mechanism of pancreatic beta-cell proliferation regulated by nervous system

研究代表者

伊藤 譲 (Ito, Yuzuru)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：00512980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000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。マウスにムスカリニックアゴニストを投与すると膵細胞量とBrdU取り込みの増加を認めた。単離膵島、MIN6細胞においてもアゴニストにて刺激するとBrdU取り込みの増加を認めた。アゴニストによる膵細胞増加機序はIRS-2/Akt/cyclin D2経路の関与が示唆された。マウスへのアゴニスト投与によりGLP-1の分泌増加を認め、GLP-1アンタゴニストを前処置するとアゴニストによる膵細胞量の増加は抑制された。GLP-1分泌増加が間接的に細胞増殖に関わっている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムスカリニックレセプターアゴニストの投与によりマウスでの膵細胞増殖作用や膵島での血糖依存的なインスリン分泌増強作用を認めることから、新規糖尿病治療薬のターゲットになりえると考えた。in vivoでは、マウスへのbethanechol投与による血糖改善、膵細胞量増加のモデルを確立し、in vitroでは、マウス単離膵島やMIN6細胞におけるbethanechol刺激によるBrdU取り込みモデルを確立した。こうしたモデルの確立により、アセチルコリンによる膵細胞への直接的、間接的な作用機序の研究推進が望める。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the role of muscarinic agonists or acetylcholine in regulating the pancreatic  $\beta$ -cell mass and glucose homeostasis. The  $\beta$ -cell mass and proliferation increased following oral administration of bethanechol in wild-type mice. The muscarinic agonists also increased the incorporation of BrdU into islets isolated from wild-type mice and MIN6 cells. In IRS-2 knockout mice, oral administration of the muscarinic agonist did not increase the  $\beta$ -cell mass or proliferation. The phosphorylation of Akt induced by oral administration of bethanechol was observed in wild-type mice, but not in IRS-2 knockout mice. The secretion of GLP-1 was also stimulated by bethanechol in wild-type mice, and the GLP-1 antagonist partially inhibited the bethanechol-induced increase in the  $\beta$ -cell mass. This proliferative effect was dependent on the IRS-2/Akt pathway. The bethanechol-stimulated release of GLP-1 may be indirectly associated with  $\beta$ -cell proliferation.

研究分野：内分泌糖尿病内科

キーワード：膵細胞 アセチルコリン GLP-1 副交感神経 インスリン

### 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1~3)の様に、膵細胞機能維持における中枢神経による役割が報告されている。

1) アセチルコリンのレセプターである M3 Muscarinic receptor の細胞特異的欠損マウスは、耐糖能異常、インスリン分泌の低下を示している (Cell Metabolism 3, 449, 2006)。2) 迷走神経遮断により膵細胞増加が抑制される (Am. J. Physiol. 274, E1034, 1998)。Gq 共役型の G protein-coupled receptor (GPCR) を介し膵細胞量が増加することが報告されている (J. Clin. Invest. 1750, 2013)、M3 Muscarinic receptor は Gq 共役型である。3) 脳・迷走神経を介した肝臓-膵細胞間連係により膵細胞増殖、インスリン分泌増加が起こることが報告され、細胞増殖に臓器間連関が存在する (Science 322, 1250, 2008)。

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が、詳細な制御機構に関しては明らかではなく、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解析を進めた。

### 2. 研究の目的

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。これまでの研究にて、副交感神経の主要伝達物質であるアセチルコリンやムスカリニックレセプター刺激が膵細胞量の増加・機能維持に関わっていることを見出している。本研究では、細胞量増加機序の詳細な解析を行い新たな糖尿病治療創薬ターゲットの可能性を探る。第1にムスカリニックアゴニストの膵細胞への直接作用の解析、第2に神経終末から分泌されるアセチルコリンは多臓器に作用し、臓器からの液性因子を介し間接的に膵細胞増殖、機能維持に働いている可能性があり、この間接作用に関して解析する。GLP-1 分泌変化や質量分析器を用い網羅的検索する。直接作用に対し間接作用(多臓器作用)が協調的、あるいは抑制的に働くかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ムスカリニックレセプターアゴニストの膵細胞量増加機序の直接作用の解析。

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) ムスカリニックアゴニストによる膵細胞への間接作用(多臓器作用)の解析

ムスカリニックアゴニストにより変化する液性因子の網羅的探索のために、アゴニスト投与を行ったマウス血清を用い質量分析器(LC-MS)にて解析する。

アゴニストによる GLP-1 分泌の評価を ELISA 法にて行う。GLP-1 分泌が細胞増殖に関連しているかをマウスに GLP-1 antagonist (exendin 9-39) を前投与し組織学的に膵細胞量を評価する。

### 4. 研究成果

アセチルコリンの膵細胞増殖能やインスリン分泌能につき、マウスを用い検討した。ムスカリニックレセプターアゴニスト bethanechol (Bch) の投与によりマウスでの膵細胞増殖作用(図1)や膵島での血糖依存的なインスリン分泌増強作用(図2)を認めることから、新規糖尿病治療薬のターゲットになりえると考えた。糖尿病モデルマウスである IRS-2 欠損マウスや、高脂肪食負荷マウスにおいて bethanechol 皮下投与を行うと、著明に耐糖能障害は改善しイン

図1 ムスカリニックアゴニストによる膵β細胞増加  
(アゴニスト6週経口投与)

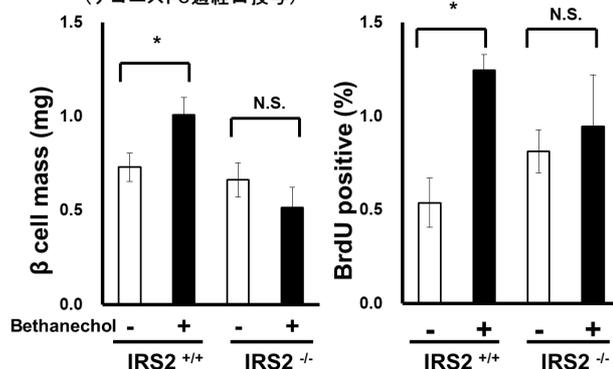
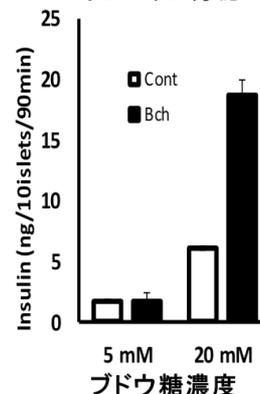


図2 マウス膵島  
インスリン分泌

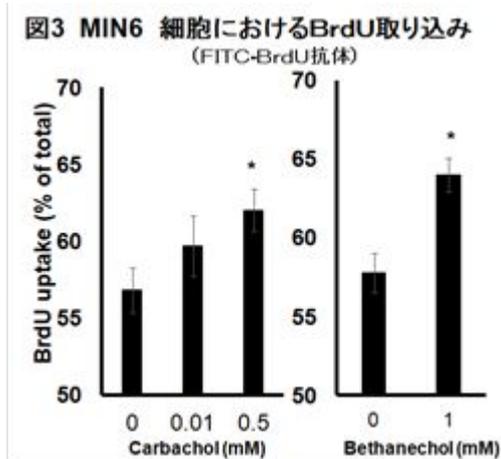


スリン分泌は増加した。

### 1) ムスカリニックアゴニストの膵 細胞増殖への直接作用の解析

マウス単離膵島や MIN6 細胞をムスカリニックアゴニストで刺激すると BrdU 取り込みを認め (図 3)、アゴニストは膵 細胞に対し直接作用を有している。

IRS-2 欠損マウスでは、bethanechol による膵 細胞増殖がみられないことから、増殖経路に IRS-2 が関与している (図 1)。bethanechol 投与を行ったマウスの膵島において、Akt リン酸化、cyclin D2 発現上昇を認めており IRS-2-Akt-cyclin D2 経路の関与が示唆された。下流分子 PDX1、FoxO1、FoxM1 は bethanechol 刺激を行ってもマウス膵島にて発現変化を認めず、FoxM1 の核外、核内移行についても解析したが変化を認めなかった。bethanechol は、これらの分子の活性を調節している可能性があり解析を進めている。



### 2) ムスカリニックアゴニストによる膵 細胞への間接作用の解析

マウスに bethanechol を投与すると GLP-1 分泌が増加する (図 4)。GLP-1 分泌増加が膵 細胞量増加に関与しているかを解析する目的で、マウスに GLP-1 antagonist (exendin 9-39) を前投与し解析したところ膵 細胞増加は抑制された (図 5)。bethanechol による膵 細胞増殖に GLP-1 が間接的に関与していることが考えられた。

図4 マウスでのGLP-1分泌

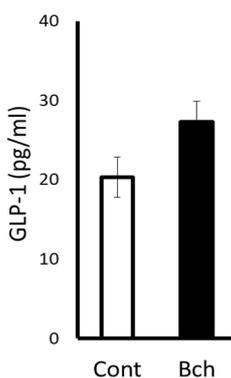
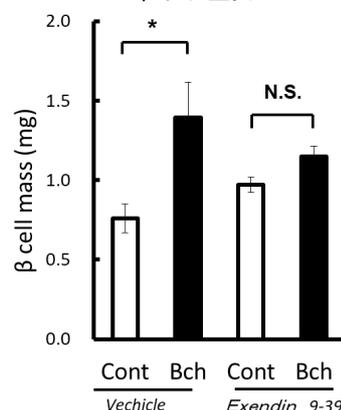


図5 GLP-1 antagonist による膵 β細胞量変化



間接的に作用する他の液性因子を同定する目的で bethanechol 投与を行ったマウス血清を用い質量分析器 (LC-MS) にて網羅的に増加する分子の解析を行った。23 個の蛋白増加を確認し、増加を認めた蛋白の 1 つである可溶性 EGF receptor は他細胞にてムスカリニックレセプターを介した細胞増殖に関与しているとの報告があり、膵 細胞でも解析を検討している。

1)、2)の解析から、ムスカリニックアゴニストによる膵 細胞増殖は直接作用と間接作用により引き起こされることが明らかとなった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1 . Ito Y, Shibuya M, Hosokawa S, Motoki Y, Nagata R, Konishi H, Miyazaki T, Matsunaga T, Nomura Y, Mihara T, Ito S, Sugiura K, Terauchi Y. Indicators of the need for insulin treatment and the effect of treatment for gestational diabetes on pregnancy outcomes in Japan. Endocr J. 2016;63(3):231-7. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1 . 伊藤譲、澁谷誠、寺内康夫ほか

妊娠糖尿病患者における日内血糖変動高値、インスリン治療、分娩後耐糖能異常の各リスク因子の比較検討

第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会 仙台市 2019 年 5 月 24 日

2 . 伊藤譲、寺内康夫ほか

2 年以上糖尿病透析予防指導を受けた糖尿病患者の長期的効果

第 22 回日本病態栄養学会年次学術集会 横浜市 2019 年 1 月 13 日

3 . 伊藤譲、澁谷誠、寺内康夫ほか

妊娠糖尿病患者の入院血糖日内変動とインスリン治療導入予測因子の検討

第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 東京都 2018 年 5 月 26 日

4. 伊藤譲、田島一樹、富樫優、寺内康夫  
副交感神経伝達物質による膵 細胞量調節の解析  
第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 名古屋市 2017 年 5 月 18 日

5. 伊藤譲、田島一樹、富樫優、寺内康夫  
ムスカリニックアゴニストによる膵 細胞増殖機構の解析  
第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会 横浜市 2017 年 2 月 11 日

6. 伊藤譲、折目和基、田島一樹、富樫優、寺内康夫  
副交感神経伝達物質による膵 細胞量調節の解析  
第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、京都市、2016 年 5 月 19 日

7. 伊藤譲、折目和基、田島一樹、富樫優、寺内康夫  
ムスカリニックアゴニストによる膵 細胞増殖機構の解析  
第 30 回日本糖尿病・肥満動物学会 大宮市 2017 年 3 月 12 日

〔図書〕(計 1 件)

1. 伊藤譲、寺内康夫  
病態栄養専門管理栄養士のための病態栄養ガイドブック 第 6 版  
5. 病態栄養と栄養療法、2. 代謝疾患、 糖尿病  
2019 年、pp178-191, 南江堂

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：寺内康夫

ローマ字氏名：(TERAUCHI, Yasuo)

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 40359609

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。