

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09811

研究課題名(和文) 膵細胞外ストレスによるインスリン分泌能低下の新規分子機構の解明

研究課題名(英文) Newly identified molecular mechanisms of insulin secretion from pancreatic beta-cells in response to extracellular stress

研究代表者

近藤 琢磨 (Kondo, Takuma)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：60431368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖質コルチコイドは核内のグルココルチコイド受容体(GR)を介して、炎症性サイトカインやインスリンの遺伝子発現を変化させ抗炎症作用、インスリン発現低下作用を発揮する。その一方で、高濃度糖質コルチコイド投与下ではGR以外の細胞内情報伝達経路を介した構成性分泌経路の抑制効果を認めたことから、より短時間で効果を発揮するnon-genomicな分泌調節経路の存在が示唆された。さらに、このインスリン分泌抑制効果にはPC1/3の発現抑制を伴うインスリンプロセッシングの障害が関与することが明らかとなった。ステロイドパルスなど高用量の糖質コルチコイド投与下でみられる急激な高血糖の病態の一部が新たに証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステロイド糖尿病はステロイドの投与量や期間依存性に重症化しやすいことが以前より知られていたが、今回ステロイドの投与量の違いによりインスリン分泌低下作用の機序が異なることが示唆された。ステロイドパルスなど高用量の糖質コルチコイド投与下でみられる急激な高血糖の病態の一部が証明されたことで、新たな治療ターゲットとなり得る可能性が示唆された。また、中～高用量のステロイド投与における抗炎症作用に関して、GRを介さず短時間で効果を発揮するnon-genomicな経路が示唆されたことはその臨床的效果と一致しており、ステロイドの効果の正しく理解するために投与量による効果の違いを認識する必要

研究成果の概要(英文)：Chronic administration of glucocorticoid at a high dose often leads to the progression of steroid-induced diabetes. The aim of this study is to elucidate the effects of glucocorticoid on insulin synthesis and secretion in pancreatic β -cells. The study was performed using MIN6 cells (a β -cell line), different concentrations of dexamethasone, RU486(a GR antagonist) and knockdown of GR expression. In conclusion, glucocorticoid regulates insulin gene expression via genomic pathway regardless of glucocorticoid concentration. On the other hand, it regulates insulin secretion via non-genomic pathway in high concentration of glucocorticoid, furthermore it suppresses insulin secretion via the downregulation of PC1/3 expression during chronic administration. Thus, the abnormalities of insulin processing via non-genomic pathway is potentially recognized as a therapeutic target of steroid-induced diabetes.

研究分野：内分泌代謝内科学

キーワード：インスリン分泌 膵細胞 グルココルチコイド グルココルチコイド受容体 GR Proprotein Converter PC non-genomic 慢性炎症 炎症性サイトカイン

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) インスリンプロモーターのシスエレメントのうち C1 領域に結合する転写因子 MafA は膵細胞におけるグルコース応答性のインスリン発現及び分泌調節にとって重要な役割を担うことが知られている。MafA が属する Maf ファミリーは N 末端側に転写活性部位を持つ large Maf (MafA, MafB, cMaf など) と持たない small Maf (MafF, MafG, MafK) とに大別されるが、これまでの我々の検討で small Maf もインスリンプロモーターの C1 領域に結合すること、さらに small Maf は膵細胞に発現し、MafA に競合することでインスリン転写活性を負に調節することを見出していた (Endocrinology, 156, 3570-3580, 2015)。酸化ストレス存在下ではインスリンの発現が低下するが、その機序として MafA の発現低下が関与していること (J Biol Chem, 280, 11107-11113, 2005)、酸化ストレスによる MafA の発現低下にはストレスシグナルである p38 MAPK 経路による MafA 蛋白の stability 低下が関与すること (Mol Endocrinol, 23, 1281-1290, 2009)、さらに高シヨ糖高脂肪食負荷マウスの膵島で small Maf の発現が増加することなどから、ストレスなどの細胞外環境に応じて Maf ファミリー全体のバランスが巧みに調節されることで膵細胞の機能が制御されているという仮説を立てた。

(2) 糖尿病患者に感染症や心的要因など過度のストレスが加わると耐糖能は悪化する。その原因として、副腎皮質由来のコルチゾール分泌増加がインスリン分泌不全をもたらすことが知られている。グルココルチコイド受容体 (GR) 作用が高まると MafA の発現低下を介して細胞機能障害を起こすことから (Sci Rep, 5, 13215, 2015)、過度のストレス存在下やグルココルチコイド投与が GR を介して、例えば Maf ファミリー分子全体のバランスを変化させ細胞機能の低下をもたらすという仮説を立てた。

2. 研究の目的

(1) 細胞外ストレス存在下における Maf ファミリーを介した機能制御、特にインスリン発現や分泌に及ぼす影響とその機序を明らかにする。

(2) グルココルチコイド作用が直接細胞機能に及ぼす影響とその詳細な機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 膵細胞株である MIN6 細胞を用いて、Maf ファミリーがインスリン発現に与える影響をレポーターアッセイで確認の後、インスリン非産生細胞に Large Maf を発現する系を用いてインスリン発現を negative にコントロールする機序についてレポーターアッセイ、ウェスタンブロット法にて検討した。

(2) グルココルチコイドとしてデキサメタゾンを MIN6 細胞に異なる濃度で投与し、GR 阻害薬や GR ノックダウンの系を用いてインスリンの発現や分泌に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) インスリン非産生細胞 (NIH-3T3 細胞) にインスリンプロモーター領域を含んだルシフェラーゼベクター (野生型) か MARE に変異を導入したルシフェラーゼベクター (変異型) とともに cMaf (Large Maf) DN-MafK の発現ベクターを導入し、パルミチン酸 350 μ M で刺激しインスリン転写活性に与える影響を検討した。その結果、パルミチン酸投与により内因性の small Maf 及び Nrf2 の発現亢進がみられたこと、small Maf のホモダイマー及びヘテロダイマーによるインスリン転写活性の抑制効果は MARE を介して発揮されることが示唆された (図 1)。

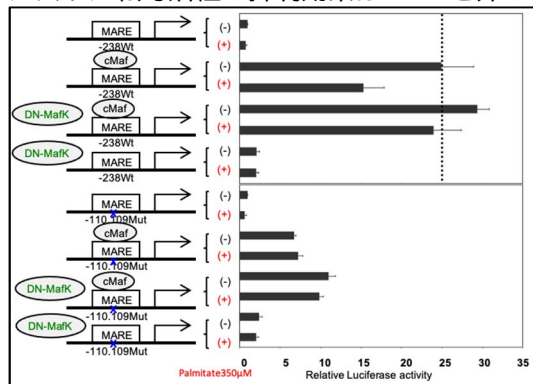


図 1

さらに、インスリン産生細胞 (MIN6 細胞) と非インスリン産生細胞に MafA を導入した系でルシフェラーゼアッセイを行いインスリンプロモーター活性について検討したところ、small Maf と Nrf2 の共発現により著しく抑制されることが明らかとなった。さらに細胞において small Maf 及び Nrf2 は直接インスリンプロモーターの MARE に結合することが ChIP アッセイで証明されたことから、飽和脂肪酸などの細胞外ストレス下でインスリンの発現が抑制される新たな経路が

明らかとなり、糖尿病の病態解明と新たな治療ターゲットの探索にとって重要な知見が得られた。

(2) 低濃度 (30nM) 中濃度 (300nM) ステロイドパルス療法にあたる高濃度 (3000nM) のグルココルチコイド (デキサメタゾン) で 細胞株 (MIN6 細胞) を刺激し GR 阻害薬 (RU486) の有無でインスリンの発現及び分泌に与える影響を検討したところ、デキサメタゾンにより、Ins1、Ins2 の発現は高濃度になるに従い減少し、GR 阻害薬投与で回復した (図 2A,B)。また、デキサメタゾンが高濃度になるに従い著明なインスリンの分泌抑制を認めたと、特に高濃度において GR 阻害薬投与では回復しなかった (図 2C)。同様の結果は GR ノックダウンの系でも証明された。したがって、高濃度グルココルチコイド投与では予想に反して、GR を介さない non-genomic な経路でインスリン分泌が抑制されることが新たに明らかとなった。

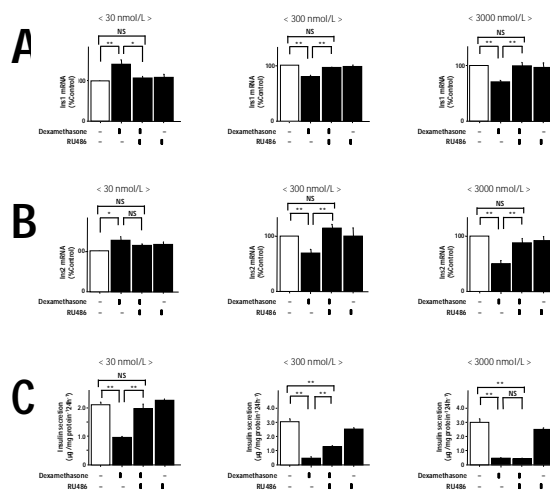


図 2

(3) 同様の系で培養上清中の proinsulin/insulin 比 (P/I 比) を測定したところ、低濃度デキサメタゾンで P/I 比は抑制されその効果は GR 阻害薬により解除された。一方、中～高濃度で P/I 比は増加するが、その効果は特に高濃度において GR 阻害薬により解除されなかった (図 3A)。同様の結果は GR ノックダウンの系でも証明された。すなわち、インスリン分泌に与える影響はグルココルチコイド投与量によって異なり、高濃度においては GR を介さない non-genomic な経路でインスリン分泌が抑制され、プロインスリン分泌が亢進していることが示された。

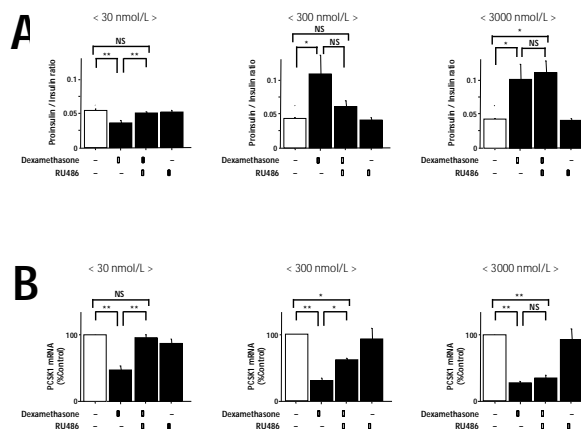


図 3

(4) グルココルチコイド投与でプロインスリンからインスリンへのプロセッシング障害が存在していることが示唆されたため、PC1/3 の遺伝子発現を同様の系で確認したところ、濃度依存的に発現が抑制されていること、低濃度デキサメタゾン投与では GR 阻害薬により抑制が回復するのに対し、高濃度では GR 阻害薬により PC1/3 発現抑制効果は解除されなかった (図 3B)。この効果は PC1/3 の蛋白発現でも確認した。一方、グルココルチコイド投与は PC2 遺伝子及びタンパクの発現には影響を与えなかった。同様の結果は GR ノックダウンの系でも証明されたことから、高濃度グルココルチコイド投与により、GR を介さない non-genomic な経路を介して膵細胞内の PC1/3 の発現が抑制され、インスリンのプロセッシング障害がおこることで耐糖異常をきたすことが新たに示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 村嶋俊隆、近藤琢磨、石田均
2. 発表標題 膵 細胞への糖質コルチコイドの慢性大量投与が及ぼす核外でのnon-genomic effectとその病態生理学的意義について
3. 学会等名 第61回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村嶋俊隆、近藤琢磨、石田均
2. 発表標題 糖質コルチコイドが及ぼす膵 細胞機能への慢性効果とその分子メカニズムに関する検討
3. 学会等名 第60回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshitaka Murashima, Takuma Kondo, Hitoshi Ishida
2. 発表標題 Nrf2 Is Involved in the Cooperative Inhibition of Insulin Gene Expression with Small-Maf Factors in Pancreatic Beta-Cells.
3. 学会等名 American Diabetes Association 76th scientific sessions (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Toshitaka Murashima, Takuma Kondo, Hitoshi Ishida
2. 発表標題 High-dose Glucocorticoid Reduces Insulin Secretion by Suppressing Prohormone Convertase 1/3 through Non-genomic Pathway.
3. 学会等名 American Diabetes Association 79th scientific sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	石田 均 (Ishida Hitoshi) (80212893)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	
研究 協力者	村嶋 俊隆 (Murashima Toshitaka)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	