

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15185

研究課題名(和文) インスリン分泌制御における細胞骨格の役割

研究課題名(英文) The role of the cell cytoskeleton in the insulin secretion control

研究代表者

野田 昌晴 (Noda, Masaharu)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・教授

研究者番号：60172798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Apc2遺伝子欠損マウスでは、グルコース刺激によるインスリン分泌が亢進していることが明らかになった。Apc2遺伝子欠損マウスから単離した膵島や膵島株化細胞のMIN6を用いた解析から、APC2は膵島細胞内のインスリン分泌の制御には機能していないと考えられた。一方、APC2は膵島に投射する神経線維に高発現することから、自律神経系を介したインスリン分泌の制御機構に関わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that Apc2-deficient mice exhibited a higher glucose-induced insulin secretion compared with wild-type mice. Experiments using isolated islets from Apc2-deficient mice and mouse islet cell line MIN6 revealed that APC2 was not implicated in the regulation of insulin secretion at the β -cell level. We found that APC2 was highly expressed in the nerve fibers projecting to pancreatic islets, which suggested that APC2 may play a role in the regulation of insulin secretion through the autonomic nervous system.

研究分野：分子神経生物学、内分泌学

キーワード：インスリン分泌 APC2 細胞骨格 膵 細胞

1. 研究開始当初の背景

膵β細胞におけるインスリンの分泌制御は、グルコースホメオスタシスの維持において中心的役割を果たしており、その破綻は糖尿病等の様々な病態を引き起こす。

血糖値の上昇によるインスリンの分泌には細胞内の細胞内 Ca^{2+} レベルの上昇が重要であることが分かっている。すなわち、血糖値の上昇により膵β細胞の糖代謝が高まると、ATP 感受性カリウムチャネルが閉鎖することで細胞膜の電位が上昇する。これに伴って電位依存性カルシウムチャネルが開くことで細胞内 Ca^{2+} レベルが上昇し、これが引き金となって分泌顆粒に貯蔵されていたインスリンが開口放出されると考えられている。

一方、インスリン分泌の制御機構については、不明な点が多い。膵β細胞内部で作られたインスリン分泌顆粒は、細胞骨格に沿って細胞膜まで輸送され、グルコース刺激にตอบสนองして放出される。このため、インスリン分泌の制御において、 Ca^{2+} レベルの上昇に伴う細胞骨格の動態変化が重要な役割を果たしていると推定されているが、細胞骨格による制御機構はよく分かっていない。

我々は、癌抑制因子である Adenomatous polyposis coli (APC) と相同性が高く、神経系に特異的に発現する APC2 について研究を進めてきた。APC2 は複数のドメイン構造を有する分子量約 230 キロダルトンの大きな細胞内タンパク分子である。我々は、APC2 がアクチン繊維並びに微小管と共局在し、それらの動態を制御していることを明らかにした (Shintani et al., J. Neurosci., 29, 11628-11640, 2009)。さらに、*Apc2* 遺伝子欠損マウスを作製し解析を行ったところ、*Apc2* 遺伝子欠損マウスの大脳皮質、海馬、小脳、嗅球等の脳内の様々な領域において、神経細胞の移動の異常に起因する層構造の異常が明らかになった (Shintani et al., J. Neurosci., 32, 6468-6484, 2012)。また、*Apc2* 遺伝子を欠損あるいはノックダウンされた神経細胞は無刺激下では異常を示さないが、細胞移動や軸索伸長をガイドする因子にさらされた場合に、それらにตอบสนองした細胞骨格の動態変化が正常に起こらず、細胞移動や軸索伸長に異常を示すことが明らかになった。これらの結果から、APC2 は細胞外の情報を細胞骨格に伝え、その制御を行う上で必須の役割を果たしていると考えられる。

一方、海外の研究者との共同研究により、知的障害や頭部構造の過成長を特徴とする Sotos syndrome と呼ばれる遺伝子疾患の症状を示す姉弟について解析を行った (Almuriekhi and Shintani et al., Cell Reports, 10, 1585-1598, 2015)。この姉弟は、Sotos syndrome の原因とされている *NSD1* (nuclear receptor binding SET domain protein) 遺伝子には異常が無く、*APC2* 遺伝子にホモの変異が存在した。*Apc2* 遺伝子欠損マウスを解析した結果、記憶・学習能力や

頭部構造の異常等において、患者によく似た異常を示すことが判明した。また、*Apc2* 遺伝子が、*Nsd1* 遺伝子によって発現の制御を受けていることを発見した。これらの結果から、*APC2* 遺伝子は *NSD1* 遺伝子の主要な下流遺伝子として機能しており、*APC2* の機能欠損が Sotos syndrome の神経系の症状の主な要因となっていると考えられた。

2. 研究の目的

我々は、最近の予備的解析から、*Apc2* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて糖負荷後の血中インスリンレベルが亢進しており、速やかに血糖値が減少することを見出した。*APC2* は膵β細胞にも高度に発現していることから、この分子が細胞骨格の制御を通してインスリン分泌を負に制御していると推定された。

一方、Sotos syndrome の患者では新生児期に高インスリン血症が発症し、低血糖状態になる例が報告されている (Am. J. Med. Genet., 161, 34, 2013)。この症例報告からも、*APC2* がインスリン分泌の制御に関わっていることが予想される。

そこで本研究においては、*APC2* によるインスリン分泌制御の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

[平成 28 年度]

(1) *Apc2* 遺伝子欠損マウスの解析

Apc2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスについて下記の解析を行い、両者を比較することで、インスリン分泌における *APC2* の役割の解明を試みた。

耐糖能の解析

マウスの腹腔内にグルコースを投与し、血糖値の変化を経時的に測定することで、耐糖能を解析する。

インスリン負荷試験による解析

マウスの腹腔内にインスリンを投与し、血糖値の変化を経時的に測定することで、インスリンに対する応答性を解析する。

インスリン分泌の解析

マウスにグルコースを投与後の血中インスリン濃度の経時変化を ELISA 法によって解析する。

(2) *APC2* の発現解析

マウスの膵臓における *APC2* の発現を免疫染色により解析する。

(3) マウス膵島由来株化細胞を用いた解析

生理的グルコース濃度の範囲で濃度依存的にインスリンを分泌するマウス膵島由来の MIN6 細胞を用いて解析を行う。本細胞株を用いて下記の解析を行う。

APC2 の発現解析

定量 RT-PCR 及びウエスタンブロッティ

ングにより、MIN6 における APC2 の発現を確認する。

APC2 の発現を抑制するアデノウイルスの作製

APC2 の発現コンストラクトと *Apc2* 遺伝子に対する各種 RNAi の共発現系を用いて、APC2 の発現を効率的に抑制できる RNAi 配列を選別する。選別した RNAi 配列からなる shRNA の発現能を有するアデノウイルスコンストラクトを作製する。

APC2 の発現を抑制した場合のインスリン分泌に及ぼす影響の解析

で作製した *Apc2* 遺伝子に対する shRNA を発現するアデノウイルスを用いて、MIN6 細胞において APC2 の発現を抑制した場合の、グルコース刺激や高カリウム刺激に反応したインスリン分泌について解析する。インスリンの分泌量の測定は ELISA 法により行う。

[平成 29 年度]

(1) *Apc2* 遺伝子欠損マウスの解析

単離膵島を用いた解析

コラゲナーゼ処理により *Apc2* 遺伝子欠損マウス及び野生型マウスの膵臓から単離した膵島に対して、グルコースを作用させた場合のインスリン分泌量を ELISA 法により測定する。

4. 研究成果

(1) *Apc2* 遺伝子欠損マウスの解析

耐糖能の解析

耐糖能試験の結果、野生型マウスに比べて *Apc2* 遺伝子欠損マウスでは、グルコース投与後に速やかに血糖値が低下することが観察された。このように、*Apc2* 遺伝子欠損マウスでは耐糖能が亢進していることが明らかになった。

インスリン負荷試験による解析

インスリン負荷試験の結果、野生型マウスに比べて *Apc2* 遺伝子欠損マウスでは、インスリン刺激に反応した血糖値の低下が減弱していることが観察された。このように、*Apc2* 遺伝子欠損マウスではインスリンの応答能が低下していることが明らかになった。

インスリン分泌の解析

グルコース負荷後の血中へのインスリンの分泌量について解析した結果、野生型マウスに比べて *Apc2* 遺伝子欠損マウスではインスリン分泌量が有意に高いことが明らかになった。

以上の結果から、*Apc2* 遺伝子欠損マウスにおけるグルコースに反応したインスリン分泌の増加が耐糖能亢進の原因と考えられた。また、*Apc2* 遺伝子欠損マウスにおけるインスリン応答能の低下は、高インスリン状態への適応反応である可能性が考えられる。

単離膵島を用いた解析

野生型マウスと *Apc2* 遺伝子欠損マウスの

膵臓より単離した膵島をグルコースで刺激した場合のインスリンの分泌量について、ELISA 法により解析した。その結果、両者のインスリン分泌量には差がないことが明らかになった。

(2) APC2 の発現解析

膵臓における APC2 の発現を、APC2 に対する抗体や膵島細胞のマーカー抗体(抗インスリン抗体)、神経繊維のマーカー抗体(抗βIII チューブリン抗体)等を用いた免疫染色により解析した。その結果、APC2 は膵島に加えて、膵島に投射している神経線維で高発現していることが明らかになった(図 1)。

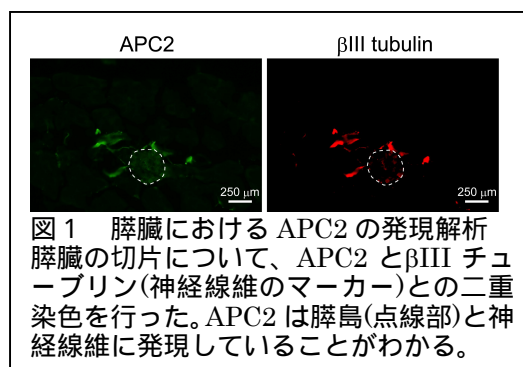


図 1 膵臓における APC2 の発現解析
膵臓の切片について、APC2 とβIII チューブリン(神経線維のマーカー)との二重染色を行った。APC2 は膵島(点線部)と神経線維に発現していることがわかる。

(3) マウス膵島由来株化細胞を用いた解析 APC2 の発現解析

定量 RT-PCR 及びウエスタンブロッティングにより、MIN6 細胞における APC2 の発現を確認した。

APC2 の発現を抑制するアデノウイルスの作製

APC2 の発現を効率よく抑制できる RNAi を見出した。さらに、本 RNAi 配列を有する shRNA を発現するアデノウイルスの作製を行った。

APC2 の発現を抑制した場合のインスリン分泌に及ぼす影響の解析

APC2 に対する shRNA を発現するアデノウイルスを用いて、MIN6 細胞における APC2 の発現を抑制した場合のインスリン分泌に対する影響を解析した結果、APC2 の発現を抑制しても、グルコース及び高カリウム刺激によるインスリンの分泌量は変化しないことが明らかになった。

(結論)

以上の結果から、*Apc2* 遺伝子欠損マウスではグルコースに反応したインスリン分泌が増加しており、これが耐糖能の亢進の原因と考えられた。また、*Apc2* 遺伝子欠損マウスにおいてインスリン応答が減弱していることが観察されたが、これは恒常的高インスリン状態への適応反応の可能性はある。今後の検討が必要である。

一方、APC2 は膵島細胞内のインスリン分泌の制御には機能していないと推察された。APC2 は膵島に投射する神経線維に高発現す

ることから、自律神経系を介したインスリン分泌の制御機構に関わる可能性が新たに示唆された。今後のさらなる検討が必要と考えられる。

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 2件)

新谷隆史、竹内靖、藤川顕寛、久保山和哉、野田昌晴

「APC2の欠損は知的障害の原因となる」
第39回日本分子生物学会年会
(2016.12.2, 横浜)

Takafumi Shintani, Satoru Higashi,
Yasushi Takeuchi, Masaharu Noda

“The R3 receptor-like protein tyrosine phosphatase subfamily negatively regulates insulin signaling by dephosphorylating the insulin receptor at specific sites.” The 12th International Conference on Protein Phosphatase (ICPP12) (2016.10.30, Higashi-Osaka)

〔図書〕(計 0件)

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 昌晴 (NODA, Masaharu)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究
部門・教授

研究者番号：60172798

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

新谷 隆史 (SHINTANI, Takafumi)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究
部門・准教授

研究者番号：10312208