

令和元年9月9日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19067

研究課題名(和文) 膵細胞におけるMek/Erkシグナルの解析と新たな糖尿病治療戦略の構築

研究課題名(英文) Role of MEK/ERK signaling in pancreatic beta cells - to develop a novel treatment strategy for type 2 diabetes

研究代表者

生島 芳子 (Ikushima, Yoshiko M)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：00571366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膵細胞におけるMEK/ERKシグナルについて検討するため、膵細胞特異的Mek1/2欠損マウスを作成し解析を進めた。本マウスは通常食条件下では耐糖能異常を示さず、高脂肪食負荷時にのみ耐糖能異常を示した。また、長期高脂肪食負荷時には顕著な膵島容量の低下を認め、これによるインスリン分泌不全が耐糖能異常の一因と考えられた。膵細胞におけるMEK/ERKシグナルは、インスリン分泌需要の高まる高脂肪食時に特に重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は以前の研究で、膵細胞の維持にインスリンシグナル及びその下流であるPI3K/Akt経路が必須であることを示したが、本研究ではPI3K/Akt経路と並んでインスリンシグナル下流で活性化されるMEK/ERK経路の膵細胞における機能が明らかとなり、特にインスリン分泌需要の高まる肥満時に膵細胞の量を増加させるために重要であることを明らかにした。2型糖尿病の治療と予防のためには膵細胞の機能と量の維持・回復が重要であり、本研究では膵細胞の維持・増幅を目指す新規治療法の開発につながる基盤となる成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the significance of MEK/ERK signaling in β cells, we generated β cell-specific Mek1/2 KO mice (DKO mice). These mice showed normoglycemia on normal chow diet. In contrast, when fed on high fat diet (HFD), DKO mice developed hyperglycemia. Islet areas in DKO mice were significantly smaller compared to those in controls when fed on HFD for long time. The inadequate insulin secretion based on the smaller islet area could be one cause of the hyperglycemia observed in HFD-fed DKO mice. We conclude that MEK/ERK signaling in β cells is especially important when the insulin demand increases, such as obesity.

研究分野：代謝生物学

キーワード：膵細胞 MEK/ERKシグナル 2型糖尿病 インスリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病では、膵β細胞数の減少や機能の低下によるインスリンの分泌不全が生じているため、膵細胞数の維持・増殖と機能回復は糖尿病治療の鍵となる。我々は、膵細胞特異的インスリン受容体 (IR) / Insulin-like growth factor-1 受容体 (IGF-1R) 欠損マウスにおいて、膵細胞が重度に障害され、生後早期に重篤な糖尿病を発症することを見出し、糖尿病における膵細胞でのインスリン作用の低下が、インスリン分泌の低下に寄与していることを示してきた (Ueki et al. Nat Genet 2006)。さらに、インスリン受容体下流の主なシグナル伝達経路である PI3K/Akt 経路を膵細胞で特異的に欠損したマウスの解析では、前出のマウスに比べて糖尿病発症の表現型は穏やかで、膵島における ERK1/2 のリン酸化レベルが亢進していたことから、膵細胞では、PI3K/Akt 経路が欠損した状態でも、代償的に MEK/ERK 経路が活性化してある程度膵細胞が維持される可能性を見出した (Kaneko et al. Cell Metab 2010)。以上から、次なる研究課題として、膵細胞における MEK/ERK シグナルの役割についての検討が求められていた。

また、膵β細胞における MEK/ERK 経路の活性化について、我々は申請時以前、インスリン受容体を欠損した膵β細胞株 (βIRKO 株) を高グルコースで刺激すると、MEK/ERK 経路が活性化する現象を捉えていた (Assmann et al. MCB 2009)。さらに、申請時までに行なった実験により、βIRKO 株におけるグルコース刺激によるインスリン非依存的な MEK/ERK 経路の活性化のためにはグルコースが代謝される必要があること、ATP 依存性 K⁺チャネルの閉口が必要であること、さらにこの機序が細胞内の Ca²⁺依存性であることを確認していた。

2. 研究の目的

上述の研究背景を踏まえ、本研究は、

- (1) マウスモデルを用いて膵β細胞における MEK/ERK シグナルの役割を解明すること
 - (2) 膵β細胞において、高血糖に対してインスリン非依存的に MEK/ERK 経路が活性化する分子機序を明らかにすること
 - (3) 2 型糖尿病患者において、膵β細胞での MEK/ERK 経路活性化を標的とする新たな治療戦略を構築すること
- を目的としてスタートした。

3. 研究の方法

膵β細胞特異的 Mek1/Mek2 欠損マウス (MIPCre-ERT⁺/Mek1^{fl/fl}/Mek2^{ko/ko} マウス (6 週齢においてタモキシフェン投与)、以下 MekDKO マウス) を作成し、コントロールである Mek2KO マウスに比して、膵島における Mek1 欠損が誘導されていること、MEK1/2・ERK1/2 のリン酸化が抑制されていることを確認した (図 1)。

MekDKO マウスを用い、通常食・高脂肪食負荷条件下で代謝解析を進めた。また MekDKO マウスの膵臓切片で膵島面積の評価・増殖能評価を進めた。また、MekDKO マウスより膵島を採取し、網羅的な遺伝子発現解析 (RNA シークエンス)・Q-PCR により下流遺伝子の同定を試みた。

また、高グルコースに応答してインスリン非依存的に膵β細胞で MEK/ERK 経路が活性化する機構へ寄与する Ca²⁺依存性分子の同定のため、βIRKO 株と各種 inhibitor を用いたグルコース刺激試験を行なった。

4. 研究成果

(1) MekDKO マウスを通常食飼育し、グルコース負荷試験を施行したが、対照群に比べ耐糖能に異常をきたさなかった (図 2)。また、随時血糖値や随時インスリン値にも明らかな差を認めなかった。

(2) MekDKO マウスを高脂肪食負荷条件下で飼育すると随時血糖値の上昇と随時インスリン値の低下を認めた。また、長期に高脂肪食を負荷した場合にはグルコース負荷試験 (ipGTT) において耐糖能異常を示し、*in vivo* GSIS 試験でもインスリン分泌不全を呈した。そこでこの耐糖能異常とインスリン分泌不全の原因を検索するために長期高脂肪食負荷した MekDKO マウスの膵臓切片における膵島面積を評価したところ、対照群マウスに比べて膵島面積が有意に低下していた。また、高脂肪食 6 週負荷マウス膵臓切片で施行した Ki67 染色では Ki67⁺の膵細胞の割合が MekDKO マウスで有意に低下

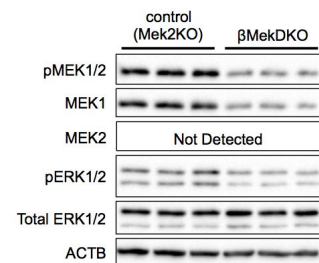


図1. βMekDKOマウスの単離膵島における Mek1欠損誘導とMEK・ERKのリン酸化阻害

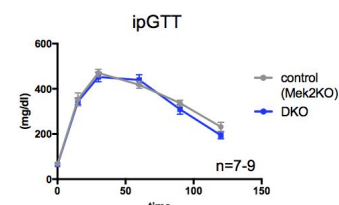


図2. 通常食12週齢における耐糖能試験 (ipGTT) グルコース2.0g/Kg-BW負荷

しており、膵細胞の増殖不全が示唆された (図 3)。

続いて、高脂肪食負荷初期および中期の MekDKO マウス・対照群マウスの単離膵島を用いて RNA シークエンス解析を行い、Q-PCR と合わせて遺伝子発現を評価したところ、MekDKO マウス膵島において複数の細胞周期関連遺伝子の発現が有意に変化していることを見出した (図 4)。以上から、高脂肪食下の MekDKO マウスではこうした遺伝子発現の変化等を原因とした膵細胞の増殖不全が生じており、これが長期高脂肪食負荷時に認められる膵島容量の低下とインスリン分泌不全の一因となっていることが考えられた。

Ki67⁺Insulin⁺細胞

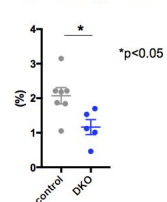


図3. HFD6週負荷マウス膵臓切片のInsulin陽性細胞におけるKi67+細胞の割合

(3) 2型糖尿病モデルマウスである db/db マウスの膵島における MEK/ERK シグナルの検討を行なったところ、db/db マウスの単離膵島では対照群マウスの膵島に比べ ERK のリン酸化が低下していることを見出した。ERK のリン酸化の低下が、db/db マウスの膵島が血糖値維持のための十分なインスリンを産生できない一因となっている可能性が考えられ、膵細胞における MEK/ERK シグナルの重要性を示唆する傍証の一つと考えられた。

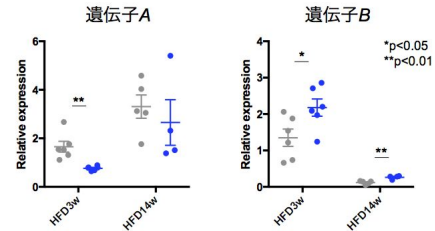


図4. HFD3週負荷、HFD14週負荷マウス膵島における細胞周期関連遺伝子A、Bの遺伝子発現解析

(4) 申請時において、高グルコース刺激がインスリン非依存的に膵細胞の MEK/ERK をリン酸化するメカニズムが Ca^{2+} 依存性であることを確認していたため、 β IRKO 株と各種 inhibitor を用い、高グルコース刺激と MEK/ERK 経路の活性化を繋ぐ Ca^{2+} 依存性分子の検索を進めた。この中で CaMK 阻害剤である Kn93 が高グルコース刺激による IRKO 株での ERK リン酸化を抑制したことから CaMK が候補因子として考えられた。しかし、Kn93 の inactive analog である Kn92 でも同様に IRKO 株での ERK リン酸化抑制が認められたこと、Kn93 より強力な CaMK 選択的阻害剤である Autocamtide - 2 - Related Inhibitory Peptide (AIP) ではこの阻害効果が認められなかったことから、CaMK の関与は否定的と考えられた。

以上の研究成果により、膵細胞における MEK/ERK シグナルの役割が明らかとなり、特にインスリン分泌需要の高まる高脂肪食時に重要であることが示された。本研究では MEK/ERK シグナルの下流で細胞周期関連遺伝子が発現調節されることにより膵島の大きさが制御されている可能性が見出されたが、今後引き続き遺伝子発現 profile を解析し、インスリン分泌不全に関わる他の下流分子の同定も目指したい。また、今回同定に至らなかった、膵 β 細胞において高グルコース刺激と MEK/ERK 経路活性化を繋ぐ Ca^{2+} 依存性分子についても引き続き検討していきたい。こうした分子は、インスリン分泌不全が生じている 2 型糖尿病患者において、膵 β 細胞の量の回復や増殖を目指す新たな治療の標的となりうると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) The telomere binding protein Pot1 maintains haematopoietic stem cell activity with age. Hosokawa K, MacArthur BD, Ikushima YM, Toyama H, Masuhiro Y, Hanazawa S, Suda T, Arai F. *Nat Commun.* 2017;8(1):804. doi: 10.1038/s41467-017-00935-4.

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 「心筋におけるAktの役割の解明」 添田 光太郎, 小林 直樹, 生島 芳子, 戸田 郷太郎, 笹子 敬洋, 竹宮 聖一, 野田 哲生, 門脇 孝, 植木 浩二郎, 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2018年
- (2) 「MEK/ERKシグナルは膵 β 細胞の量と分泌能を制御する」 生島 芳子, 小林 直樹, 粟澤 元晴, 竹宮 聖一, 諏訪内 浩紹, 添田 光太郎, 守本祐一, 村谷 匡史, 高橋 倫子, 植木 浩二郎, 第33日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 2019年
- (3) 「糖尿病合併 NASH における血糖とインスリンによる腸内細菌叢の変化」 添田 光太郎, 小林 直樹, 生島 芳子, 笹子 敬洋, 戸田 郷太郎, 粟澤 元晴, 門脇 孝, 植木 浩二郎, 第 33日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 2019年
- (4) 「膵 β 細胞制御におけるMEK/ERKシグナルの役割の解明」 生島 芳子, 小林 直樹, 粟澤 元晴, 諏訪内 浩紹, 添田 光太郎, 村谷 匡史, 高橋 倫子, 植木 浩二郎, 第62回日本糖尿病学会年次学術集会, 2019年

〔その他〕
ホームページ等
<http://drc.ncgm.go.jp/dc001/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

小林直樹 Kobayashi Naoki
国立国際医療研究センター・上級研究員
研究者番号: 80750728

粟澤元晴 Awazawa Motoharu
国立国際医療研究センター・室長
研究者番号: 90466764

諏訪内浩紹 Suwanai Hirotsugu
東京医科大学医学部・講師
研究者番号: 60624939

村谷匡史 Muratani Masafumi
筑波大学医学医療系・准教授
研究者番号: 50730199

植木浩二郎 Ueki Kohjiro
国立国際医療研究センター・糖尿病研究センター長
研究者番号:00396714

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。