

令和元年6月27日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16152

研究課題名(和文)メトホルミンによる膵 細胞保護機構の解明

研究課題名(英文)Effect of metformin on pancreatic beta cells

研究代表者

田島 一樹(TAJIMA, Kazuki)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00725236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高血糖及び小胞体ストレス下におけるメトホルミンの膵 細胞保護作用を検討した。インスリン抵抗性が惹起されない短期間高脂肪食負荷マウスでみられる膵 細胞の代償性増殖は、メトホルミン投与により膵 細胞増殖が抑制された。また、マウス単離膵島において、グルコース誘導性の膵 細胞増殖を抑制、高脂肪食および高血糖下において、AMPKリン酸化を亢進し、mTORシグナルを抑制した。メトホルミンは、小胞体ストレス誘導性の膵 細胞アポトーシスを抑制し、その機序とし、4EBP1を介し、翻訳開始を抑制する可能性が考えられた。メトホルミンは、インスリン抵抗性とは独立して、膵 細胞に保護的に作用している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、メトホルミンによる、インスリン抵抗性とは独立した膵 細胞の保護機構を解明できれば、糖尿病発症前における早期治療の有効性など、糖尿病発症の抑制にもつながる。これは、経済面に多大な影響を及ぼしている糖尿病マネジメントにおいても、社会的な意義があると考えられる。さらには、メトホルミンによる保護機構を明らかにすることで、糖尿病の根本的治療となり得る膵 細胞量の制御機構の解明にも繋がることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：The effect of metformin on the pancreatic beta cells under hyperglycemic or endoplasmic reticulum stress conditions were analyzed using high-fat fed mice and pancreatic beta cell lines. Metformin suppressed the compensatory beta cell proliferation in short-term high-fat fed mice, which did not exhibit insulin resistance. Metformin repressed the beta cell proliferation induced by high glucose. Metformin induced the phosphorylation of AMPK and reduced the mTOR signal. Metformin suppressed the apoptosis in beta cells induced by taspigargin and metformin reduced the translation initiation via 4EBP-1. These results suggested that metformin had protective effect on the pancreatic beta cells independent of the improvement of insulin resistance.

研究分野：糖尿病学

キーワード：メトホルミン

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の発症、進展には、肝臓、筋肉や脂肪など末梢組織におけるインスリン抵抗性や膵β細胞の機能不全が関与している。膵β細胞は、外界からのインスリン需要量の変化に対し、複製、新生、アポトーシス等により細胞量を柔軟に調整している。しかし、この代償機構が破綻し、膵β細胞量が減少すると糖尿病に陥る。これにより膵β細胞量を制御することが糖尿病の根本的な治療法となり得るが、現在の薬物療法は対症療法に留まっている。

近年、日本を含め、世界的に肥満型2型糖尿病が増加しており、インスリン抵抗性改善薬であるピグアナイド薬であるメトホルミンが多用されている。メトホルミンは、悪性腫瘍などの高インスリン血症と関連が深い疾患に関する有効性、また心臓や腎臓において、小胞体ストレス抑制を介した臓器保護作用等も示唆され、代謝領域以外においても注目されている。これまでに、申請者は、高脂肪食負荷モデルマウスにおいて、メトホルミンが、白色脂肪組織の炎症性変化を抑制し、さらには非アルコール性脂肪性肝炎、肝腫瘍の発症を抑制したことを報告してきた(Tajima et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 2013)。メトホルミンが、主に肝臓、骨格筋や脂肪組織に作用することを鑑みると、インスリン抵抗性の改善により、過剰なインスリン分泌を抑制し、膵β細胞の過負荷を軽減する作用が示唆される。しかし、メトホルミンによる膵β細胞への直接的な作用については、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の特色は、インスリン抵抗性改善薬として多用されているメトホルミンによる、インスリン抵抗性とは独立した膵β細胞の保護機構を明らかにする点にある。予備的な検討で、メトホルミンが、インスリン抵抗性とは独立して、高脂肪食や高血糖、小胞体ストレスといった膵β細胞の過負荷を抑制することを見出した。本研究で、メトホルミンによる、インスリン抵抗性とは独立した膵β細胞の保護機構を解明できれば、糖尿病発症前における早期治療の有効性など、糖尿病発症の抑制にもつながる。これは、経済面に多大な影響を及ぼしている糖尿病マネジメントにおいても、社会的な意義があると考えられる。さらには、メトホルミンによる保護機構を明らかにすることで、糖尿病の根本的な治療となり得る膵β細胞量の制御機構の解明にも繋がるのが期待できる。

また、近年、熱産生能を有する褐色脂肪による代謝制御が注目されている。予備的な検討で、高脂肪食負荷マウスにおいて、メトホルミンを投与すると、摂餌量に変化はないものの、体重は有意に低下し、インスリン抵抗性は改善した。このことは、褐色脂肪により、熱産生が亢進し、エネルギー消費量が亢進している可能性も示唆される。これまでに、メトホルミン

ンが褐色脂肪にどのように作用するかは明らかではなく、本研究では、褐色脂肪を介した糖代謝制御機構を解明する。この研究を通じて、メトホルミンによる褐色脂肪を介した糖代謝制御を明らかとし、糖尿病の新たな治療法開発への足がかりとなることが期待される。

3. 研究の方法

1. 高脂肪食負荷マウス、マウス単離膵島および膵β細胞株やインスリン受容体・IGF-1受容体阻害薬である OSI-906 投与マウスを用いて、膵β細胞の増殖制御機構を解析した。
2. マウス単離膵島および膵β細胞株を用いて、メトホルミンによる小胞体ストレス誘導性のアポトーシス制御機構を解析した。
3. 老齢マウスにおける褐色脂肪機能を解析した。

4. 研究成果

高脂肪食を短期間(1週間)負荷したマウスでは、インスリン抵抗性が惹起されないものの、膵細胞の代償性増殖がみられることが知られている。同様の条件下では、高脂肪食負荷により膵細胞量およびBrdU陽性膵細胞の割合が有意に増加したが、メトホルミン投与により抑制されていた。一方で、高脂肪食を長期間(60週間)負荷したマウスでは、インスリン抵抗性が惹起されたが、メトホルミン投与によりインスリン抵抗性は改善し、膵細胞増殖は抑制されず、耐糖能維持に必要な膵細胞量は維持されていた。高脂肪食短期負荷マウスでは、膵島におけるCyclinA2, CyclinB1, FoxM1の遺伝子発現の上昇がみられたが、メトホルミン投与により抑制されていた。一方、高脂肪食長期負荷マウスでは、CyclinD2の発現上昇がみられたが、メトホルミン投与による抑制はみられなかった。これにより、メトホルミンがインスリン抵抗性改善とは独立して、膵細胞の代償性増殖を抑制し、過負荷を軽減している可能性が考えられた。一方、以前、インスリン受容体およびIGF-1受容体阻害薬であるOSI-906(Linsitinib)をマウスに1週間投与することにより、高血糖、全身のインスリン抵抗性が惹起され、膵β細胞増殖および細胞量の増大するモデルを樹立した。高脂肪食誘導性の代償性膵細胞増殖が障害されていることが知られているIRS-2欠損マウスを用いた検討では、OSI-906投与によりIRS-2欠損マウスにおいても膵細胞量および増殖能は有意に増加がみられ、IRS-2非依存性の経路を介していることが示唆された。

メトホルミンによる膵細胞への直接的な保護作用を検討するために、マウス単離膵島および膵細胞株のINS-1細胞を用いて、高血糖下における増殖能およびタンパク発現を解析した。マウス単離膵島およびINS-1細胞において、高血糖下で、それぞれBrdU陽性

細胞および Edu 陽性細胞の割合が増加したが、メトホルミン添加により抑制がみられた。また、高血糖下において、mTOR シグナルの亢進がみられたが、メトホルミンにより、AMPK リン酸化の亢進および、mTOR および S6 リボソームタンパクのリン酸化の低下がみられた。また、AMPK 活性化薬(AICAR)では、同様に高血糖下の増殖能を抑制し、AMPK 阻害薬で前処置した INS-1 細胞を用いた検討では、メトホルミンによる高血糖下の増殖能抑制がみられなかった。以上より、メトホルミンの直接的な機序として、AMPK リン酸化による mTOR/rS6P シグナル抑制が寄与している可能性が示唆された

さらにメトホルミンによる小胞体ストレス保護作用を解析した。マウス単離膵島において、タブシガルギンにより TUNEL 陽性細胞の割合は増加するが、メトホルミン投与により抑制がみられた。また、タブシガルギンにより誘導された CHOP、CEBP β 、ATF6 などの小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現上昇、および Cleaved-caspase3 発現上昇は、メトホルミンにより抑制された。次に、Polysome profiling および Puromycin incorporation による評価では、メトホルミン投与による翻訳抑制がみられ、タンパク発現では、4EBP-1 の誘導が確認された。これらの結果から、メトホルミンが、4EBP-1 を介して、翻訳開始を抑制している可能性が示唆された。shRNA により 4EBP-1 を knockdown した MIN6 細胞を用いた検討において、タブシガルギン添加時のメトホルミンによるアポトーシス抑制効果が見られなかった。

高齢者においては、褐色脂肪機能の低下が示唆されているが、詳細な機序については明らかではない。実際、老齢マウスにおいては、褐色脂肪における熱産生機能の低下がみられた。メトホルミンによる糖代謝改善作用として、褐色脂肪における影響について検討をすすめている。

5. 主な発表論文等

雑誌論文(計1件)

Inoue H, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Okuyama T, Kyohara M, Tanaka Y, Orime K, Saisho Y, Yamada T, Shibue K, Kulkarni RN, Terauchi Y. Signaling between pancreatic β -cells and macrophages via S100 calcium-binding protein A8 exacerbates β -cells apoptosis and islet inflammation. J Biol Chem. 293(16):5934-5946. 2018(査読あり)

学会発表(計1件)

後藤希美、白川純、奥山朋子、田島一樹、寺内康夫. インスリンおよび IGF-1 両受容体阻害薬 OSI-906 による膵 細胞増殖における IRS-2 の役割. 日本糖尿病・肥満動物学会. 2018 年