

令和元年6月14日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16157

研究課題名(和文) 血管内皮PDK1の糖代謝及び膵細胞に及ぼす病態生理学的役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiological roles of endothelial PDK1 on glucose metabolism and pancreatic beta cells

研究代表者

小畑 淳史(OBATA, ATSUSHI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：10771298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Phosphoinositide dependent protein kinase1(PDK1)はPI3Kの下流にあり、インスリンシグナルにおいて重要な役割を果たすことが知られている。我々は、血管内皮特異的にPDK1を欠損させたマウスを用いることで、血管内皮PDK1が、膵島における血流維持にとっても重要で、膵島を虚血から保護し、ER stressや炎症の軽減、さらには膵島内の血管内皮構造を保持することで膵細胞の機能・量の維持に極めて重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮インスリンシグナルについては様々な報告があり、血管内皮特異的にインスリン受容体を欠損させても膵細胞には影響はなく、インスリン受容体の下流にあるIRS2は膵血流量を調整することで膵細胞からのインスリン分泌調整に重要な役割があることが知られている。我々は血管内皮において、インスリンシグナルの更に下流にあるPDK1が膵細胞の機能及び量に極めて重要であることを解明し、今後新たな糖尿病治療法へとつながる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It was reported that endothelial cell specific-Irs2 knockout mice presented impaired glucose-stimulated insulin secretion in vivo due to decreased islet blood flow. However, endothelial cell-specific insulin receptor knockout mice showed no influence on beta-cell function. Thus, from the point of the roles of insulin-PI3K signaling in endothelial cells on pancreatic beta-cells, there are many things remained to be unraveled. Therefore, we focused on endothelial Pdk1, which is the downstream molecule of PI3K. Vascular endothelial-specific Pdk1 knockout mice presented reduced beta-cell mass and impaired beta-cell function both in vivo and ex vivo. These mice also presented reduced blood flow of pancreas and/or islets and hypoxia of pancreatic beta-cells, which lead to ER stress related apoptosis and inflammation in pancreatic beta-cells. We identified endothelial Pdk1 plays important roles for maintenance of beta-cell mass and function.

研究分野：代謝・内分泌学

キーワード：PDK1 血管内皮 膵細胞

1. 研究開始当初の背景

これまで、血管内皮において、insulin receptor, IGF-1 receptor の欠損により網膜内血管新生が抑制されたり、IRS2 の欠損により骨格筋を中心としたインスリン抵抗性が増悪するなどの報告がされており、血管内皮における PI3K signal の重要性が判明してきている。PDK1 は insulinreceptor-PI3 kinase の下流にあり、血管内皮細胞の増殖や血管拡張作用に関与している。我々のグループは、(Cre-loxP システムを用いて) 血管内皮細胞特異的 PDK1 欠損マウス (Tie2-Cre/PDK1-flox マウス) (以下 VEPDK1KO マウスと記載) を世界に先駆けて作成し、またそのマウスが内臓脂肪内血管新生および脂肪細胞肥大を抑制することにより、通常食 6 か月及び、高脂肪食 3 か月負荷時に体重減少やインスリン抵抗性が改善することを報告してきた (Mol Endocrinol. 2012Jan;26(1):95-109.)。また、2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスと正常耐糖能である db/m マウスの大動脈血管内皮初代培養細胞において、PDK1 は、蛋白量及びその機能を活性化する p-PDK1 Ser241 がともに db/db マウスにおいて低下している結果を予備検討の段階で得ている。この事は血管内皮における PDK1 は全身の糖代謝に深く関わり、尚且つ、全身の糖代謝状態も血管内皮 PDK1 に多大な影響を与えることを示唆する。一方で血管内皮における PDK1 の病態生理学的役割については不明な点が多い。

2. 研究の目的

血管内皮細胞自身の増殖や機能維持には、様々なシグナル伝達機構が関与しており、特に phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) は、insulin receptor-PI3 kinase の下流にあり、血管内皮細胞の増殖や生体での血管拡張作用を調節している。本研究では (Cre-loxP システムを用いて作成した) 血管内皮特異的 PDK1 欠損マウスを用いて、内皮 PDK1 が全身の糖代謝、及び膵β細胞へ及ぼす影響を包括的に解析することで血管内皮における PDK1 の病態生理学的役割の解明を目指す。得られた成果により、血管内皮 PDK1 の病態生理学的役割を解明でき、更には、血管内皮 PDK1 を病態別にターゲットにした創薬シーズの探索が可能になると期待される。

3. 研究の方法

(1) 1 型糖尿病モデルストレプトゾトシン (STZ) 誘導性高血糖マウスを用いた解析

6 週齢の VEPDK1KO マウス及びコントロールマウス (flox/flox マウス) に STZ150 μ g/g を腹腔内投与し、高血糖を誘発する。随時血糖 300mg/dl を超えた個体を対象として 11 週齢でインスリン負荷試験を行い、12 週齢で骨格筋血流測定及び、下大静脈からのインスリン投与 (0.75U/kg) を行い、30 分後に sampling を行う。現段階の検討で、興味深いことに STZ で高血糖を誘発した VEPDK1KO マウスは、インスリン抵抗性がむしろ増悪しており、骨格筋における p-Akt (Ser473) のリン酸化は有意に低下していた。骨格筋における eNOS の発現低下に伴い、骨格筋の毛細血管血流量が減少し、さらには PGC1 α の発現低下が惹起され、PGC1 α の下流にある mitochondrial biogenesis に関する遺伝子群の発現が低下していた。骨格筋における β 酸化に関わる遺伝子発現は VEPDK1KO マウスで有意に低下しており、骨格筋における β 酸化低下に伴い、骨格筋中性脂肪含量は増加していた。骨格筋の免疫染色では VEPDK1KO マウスで有意に TUNEL 陽性血管内皮細胞が多く、血管内皮面積も有意に低下していた。また、in vitro でも HUAEC (ヒト臍帯動脈血管内皮細胞) において siPDK1 を用いて PDK1 をノックダウンすると cleaved-caspase3 が増加することが示され、免疫染色の結果をサポートする結果となった。骨格筋ミトコンドリア含有量は VEPDK1KO マウスで有意に低下しており、ミトコンドリア機能を示す遺伝子群発現は有意に減少していた。電顕像でもミトコンドリア構造に構築の乱れを認め、クリステ形成・fission・fusion に関わる遺伝子発現は有意に KO マウスで低下していた。また、骨格筋における酸化的リン酸化に関わる遺伝子発現、及び ATP 含量も KO マウスで有意に低下していた。これらにより、VEPDK1KO マウスは高血糖状態では、骨格筋における毛細血管血流減少、及び mitochondrial biogenesis の低下に伴って、骨格筋においてインスリン抵抗性が惹起されることが考えられる。

(2) 2 型糖尿病モデル VEPDK1KO-db/db マウスのインスリン抵抗性増悪のメカニズムの解析

本モデルでもコントロール flox/flox-db/db マウスと比較して VEPDK1KO-db/db マウスでインスリン抵抗性が増悪することが予備検討で明らかになっている。(1) との違いはインスリンが十分分泌されている点と脂肪組織が多く肥満・インスリン抵抗性を有するモデルであるという点である。

① インスリン抵抗性に寄与する各種血中パラメータの解析

VEPDK1KO-db/db マウスを離乳 4 週後から観察し、14 週齢までの体重変化、血糖値、血中インスリン値、血中中性脂肪値、血中遊離脂肪酸値、血中コレステロール値、アディポカイン、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインを計測する。それにより、インスリン抵抗性に寄与する血中パラメータに変化がないかを同定する。

② 基礎代謝および血圧・脈拍数の解析

基礎代謝、血圧、脈拍数を解析する。これらの解析により、基礎代謝及び交感神経がインスリン抵抗性に影響を及ぼしていないかを明確にする。

③インスリン抵抗性を引き起こす臓器の同定
セボフルラン麻酔下で、下大静脈よりインスリン 3 単位/kg を静脈注射した後に肝臓、骨格筋・脂肪での p-Akt S473 のリン酸化に違いが出るかを Western blot で評価する。また、正常血糖・高インスリンクランプを行うことで、より明確にインスリン抵抗性の差や肝臓での糖新生、骨格筋での糖取り込みの違いなどが明らかになる。

④インスリン抵抗性を引き起こす主たる臓器の Lectin 染色及び TUNEL 染色評価、インスリン抵抗性を主に惹起する臓器において血管内皮の形態的变化、内皮細胞数、アポトーシスの評価を行うことで、インスリン抵抗性が増悪するメカニズムを明らかにする。

(3)血管内皮 PDK1 が膵β細胞に及ぼす影響の解析

VEPDK1KO マウスが 12 週齢では耐糖能、インスリン抵抗性には差がないが、インスリン値が低下していることから、血管内皮 PDK1 は膵β細胞の機能に影響を及ぼしていることが示唆される。本研究では(1)(2)とは異なり、血管内皮 PDK1 が膵β細胞に及ぼす影響を明らかにする。

①血管内皮 PDK1 が膵β細胞の形態に及ぼす影響の解析

膵β細胞形態を評価するために 12 週齢の VEPDK1KO マウスの膵臓を採取し、インスリン・グルカゴン染色、Ki67 染色、TUNEL 染色、CD31 染色を行う。これらの染色により、血管内皮 PDK1 が膵β細胞 mass に影響するのか、もし影響するのであれば、β細胞増殖が影響するのか、またはアポトーシスが影響するのかを明確にする。また血管内皮がβ細胞にどれだけ存在するのかを解析する。

②膵島単離による膵β細胞機能の解析

12 週齢の VEPDK1KO マウスの膵臓から膵島を単離し、グルコース応答性インスリン分泌を検討する。また単離した膵島を用いて mRNA、蛋白を抽出してβ細胞機能に関わる遺伝子及び蛋白発現の評価を行う。そして、単離膵島を用いて還流実験を行い、インスリン分泌障害がないかを解析する。これらの実験により、VEPDK1KO マウスにおいて、膵β細胞は血管内皮の形態変化そのものによってインスリン分泌が低下するのか、そうではなく、実際に膵β細胞の機能を低下させてしまうのかを明確にすることができる。単離膵島の mRNA レベルでインスリン遺伝子やその転写因子(Ins1, Ins2, MafA, PDX-1), インクレチン受容体など膵β細胞機能において重要な遺伝子発現が VEPDK1KO マウスで有意に低下しており、血管内皮 PDK1 が膵β細胞に及ぼす影響を示唆する非常に興味深い予備データが出ている。

4. 研究成果

我々は研究期間内に下記のことを明らかにした。

①VEPDK1KO マウスは IpGTT では耐糖能に差がなく、有意に KO マウスでインスリン値が低値であった。一方 OGTT を施行すると KO マウスの耐糖能は有意に増悪しており、インクレチンホルモンの感受性が低下している可能性が示唆された。

②単離した膵島で実際にグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) を評価したところ、KO マウスで有意にインスリン分泌が低下していた。さらに Ex-4 を添加した際のインスリン分泌増加量は KO マウスで低下していた。さらに、還流実験においても KO マウス由来の膵島でインスリン分泌能が低下していた。

③単離した膵島の mRNA 評価を行ったところインスリン生合成に関わる遺伝子発現が有意に KO マウスで低下しており、膵島機能に重要な役割を果たす遺伝子発現も低下していた。さらに GLP-1 受容体の発現も有意に低下していた。

④免疫染色で、β細胞量、α細胞量は有意に KO マウスで低下していた。さらに Ki67 陽性細胞は減少し、TUNEL 陽性細胞は KO マウスで有意に増加していた。アポトーシス関連遺伝子の発現は有意に KO マウスで増加していた。

⑤Laser Doppler 法で、膵臓の血流は KO マウスで有意に低下しており、Microsphere 法で膵臓及び膵島における血流が有意に KO マウスで低下していた。さらに、CD31 染色では膵島内の CD31 陽性面積及び単位面積当たりの血管構造数も有意に低下していた。

⑥mRNA レベルで虚血に関する Hif1α の発現及びその下流遺伝子の発現は KO マウスで有意に増加していた。さらに、ER stress 関連遺伝子も KO マウスで増加しており、炎症性サイトカインの発現も増加していた。

⑦電子顕微鏡で膵島内の血管構造を評価したところ、KO マウスでは血管内皮細胞が乏しく、また基底膜が肥厚していた。

⑧上記結果から、血管内皮 PDK1 は膵島を虚血から保護することで、ER stress、炎症性サイトカインを抑制し、膵島内の血管構造を保持することで、膵β細胞の量及び機能に重要な役割を果たすことが明らかになった。

本研究により、すでに報告されている血管内皮インスリンシグナルに重要であるインスリン受容体、IGF-1 受容体、IRS2 とは異なる血管内皮 PDK1 の膵β細胞に対する重要な役割を解明することができ、血管内皮 PDK1 が今後新たな糖尿病治療法解明へのシーズになる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. **Obata A**, Kimura T, Obata Y, Shimoda M, Kinoshita T, Kohara K, Okauchi S, Hirukawa H, Kamei S, Nakanishi S, Mune T, Kaku K, Kaneto H. Vascular endothelial

PDPK1 plays a pivotal role in the maintenance of pancreatic beta cell mass and function in adult male mice. Diabetologia. 2019 Jul;62(7):1225-1236. doi: 10.1007/s00125-019-4878-1.

[学会発表] (計 3 件)

1. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 東京 2018 年 5 月, 小畑 淳史, 血管内皮 PDK1 は膵 β 細胞の機能および量の維持に極めて重要な役割を果たす
2. American Diabetes Association, 77th Scientific Session, San Diego, June 2017
Atsushi Obata, Vascular Endothelial PDK1 Plays Pivotal Roles for Maintenance of Pancreatic β Cell Function
3. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 名古屋 2017 年 5 月, 小畑 淳史, 血管内皮 PDK1 は膵 β 細胞機能維持に重要な役割を果たす

※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。

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。