

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08491

研究課題名(和文) 膵細胞におけるPKC依存性グルカゴン分泌機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of PKC delta-dependent glucagon secretion in pancreatic alpha cells

研究代表者

藤本 啓 (Fujimoto, Kei)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40372974

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)：細胞レベルの実験ではグルカゴン分泌細胞株を用いグルカゴン分泌を検討した。PKCの阻害薬やsiRNAを用い、PKCがアルギニン応答性グルカゴン分泌を正に制御することを明らかにした。生体レベルの実験では膵細胞特異的PKCノックアウトマウス(PKC KO)を作製した。PKC KOではアルギニン応答性グルカゴン分泌が低下していた。また、PKC KOから単離した膵島でのアルギニン応答性グルカゴン分泌も同様に低下していた。以上から、PKCがアルギニン応答性グルカゴン分泌において重要な分子である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

本研究により細胞および生体レベルで膵細胞からのグルカゴン分泌にPKCが関与することが示唆された。元来、グルカゴンは血糖を上昇させることが知られており、今後より詳細なPKC依存性グルカゴン分泌の分子機序を明らかにすることで、PKCを標的とした糖尿病診断や糖尿病治療に繋がる可能性がある。また、PKCは腎症と網膜症の発症・進展、骨格筋細胞のインスリン抵抗性にも関与している。よって本研究は、糖尿病におけるグルカゴン分泌異常や耐糖能異常だけでなく合併症予防をも見据えた可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：In cellular experiments, glucagon secretion was examined using glucagon-secreting cell lines. We showed that PKC positively regulated arginine-induced glucagon secretion using inhibitor and siRNA for PKC. In animal experiments, we have established pancreatic cell-specific PKC knockout (PKC KO) mice, which revealed decreased arginine-induced glucagon secretion. In addition, arginine-induced glucagon secretion was decreased in islets isolated from PKC KO mice as well. In summary, we showed that PKC is pivotal molecule in arginine-induced glucagon secretion.

研究分野：糖尿病

キーワード：膵細胞 グルカゴン PKC

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は相対的なインスリン分泌不全とインスリン抵抗性が原因とされてきた。しかし、近年グルカゴン受容体[1]または膵細胞欠損マウス[2]に **streptozotocin** で膵細胞を破壊し、インスリン分泌を枯渇させても耐糖能が悪化しないことが報告された。これより糖尿病における耐糖能障害にグルカゴンとグルカゴン受容体が極めて重要と考えられ、グルカゴンシグナルの解明が待たれている。一方、近年、糖尿病の細小血管障害、耐糖能、膵細胞死に対し **Protein kinase C (PKC)** の関与が注目されている[3-6]。PKC は PKC ファミリーのうち **novel PKC** に属し、ジアシルグリセロールにより活性化を受け細胞増殖・分化・アポトーシスに関与する。糖尿病では大小様々な血管に障害をきたすが、この全身 PKC のノックアウト (KO) マウスでは網膜症や腎症といった合併症の進行を抑制することが報告された[3,4]。さらに、マウスの単離膵島に PKC の特異的阻害薬を添加したところ、グルカゴン分泌が抑制されることが報告された[7]。すなわち膵島レベルでのグルカゴン分泌に PKC が関与する可能性が示唆された。しかし、膵細胞からのグルカゴン分泌における PKC の詳細な生理学的役割は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は膵細胞からのグルカゴン分泌に PKC が関与することを明らかにすることである。膵細胞グルカゴン分泌への PKC の関与を細胞・生体レベルで証明する。さらに、PKC が新規糖尿病治療の分子標的となり得るかも検討する。また近年、PKC が腎症と網膜症の発症・進展に関与することが報告されており、本研究はグルカゴン分泌だけでなく細小血管障害を含めた新規糖尿病治療薬の基礎的知見を得られると推察される。

3. 研究の方法

本研究はグルカゴン分泌細胞株 **InR1G9** 細胞[8]を用いた細胞レベルの実験系と膵細胞特異的 PKC KO マウスを用いた生体レベルの実験系からなる。

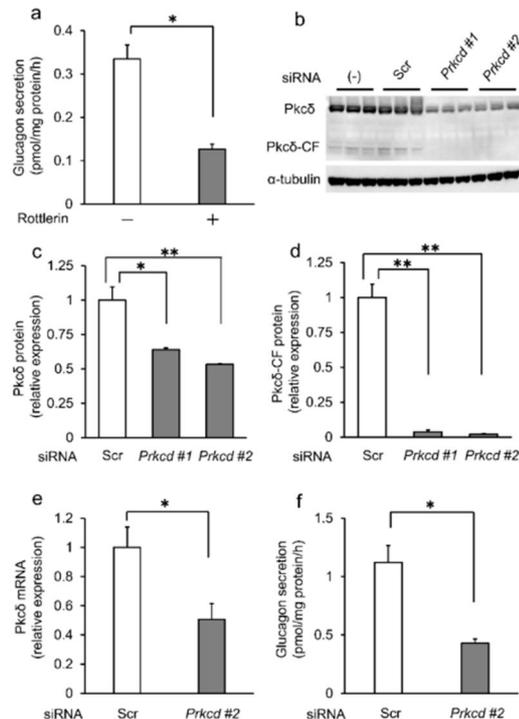
(1) 細胞レベルの実験ではグルカゴン分泌細胞株 **InR1G9** 細胞を用い PKC の特異的阻害薬 **Rottlerin** や、PKC siRNA を用い PKC をノックダウンしグルカゴン分泌の検討を行う。加えて、グルカゴン分泌刺激 (**Insulin**, **Arginine**) 時に PKC をノックダウンしグルカゴン分泌を検討する。この時、PKC の活性化 (リン酸化、**Catalytic fragment**, **translocation**) に変化を伴うか検討する。またグルカゴン分泌は未だ不明な点が多いものの、Ca チャネル、cAMP、ATP 等が分泌に寄与するとされ、グルカゴン分泌の変化に伴うこれら分子の検討も行う。

(2) 生体レベルでの実験では、**Glucagon-CreERT2** マウス[9]に PKC floxed マウス[10]を交配し膵細胞特異的 PKC ノックアウトマウス (PKC KO) を作製し表現型を検討する。樹立確認は) 遺伝子レベルでは PKC KO マウスの膵島より DNA 抽出を行い PCR にて **deletion band** の確認を行う。) 赤色蛍光蛋白 **tdTomato** を有する **CAG-tdTomato** マウス[11] を交配に追加し Cre 発現効率を検討する。また樹立後は 24 週齢で空腹時/随時血糖値、空腹時/随時グルカゴン値の測定、耐糖能・インスリン感受性の評価、膵切片より膵 / 細胞増殖・容積比の検討を行う。

4. 研究成果

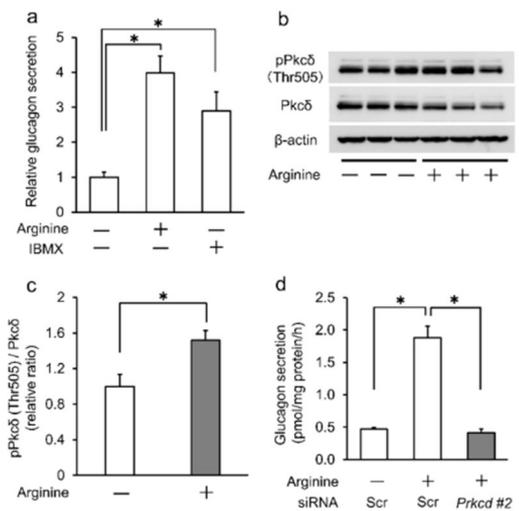
InR1G9 細胞において PKC をノックダウンするとグルカゴン分泌が低下する (Fig.1)

まず我々は、グルカゴン分泌細胞株 **InR1G9** 細胞を用い **PKC** 誘導性グルカゴン分泌を検討した。**InR1G9** 細胞に **PKC** の特異的阻害薬とされる **Rottlerin** を投与したところ、有意にグルカゴン分泌は低下した (**Fig.1a**)。しかし **Rottlerin** は **PKC** の特異的阻害薬としては疑問視されている[12]。よって、次に我々は **InR1G9** 細胞において **PKC** の siRNA を用い **PKC** のノックダウン (**KD**) を試みた。蛋白レベルにおいて 2 種類の **PKC δ** siRNA (**#1 and #2**) を用い **KD** を行ったところ、各々で蛋白発現は有意に低下した (**Fig.1b,1c**)。また **PKC** の活性化を示す **Catalytic Fragment (CF)** の発現もそれら 2 種類の **PKC δ** siRNA で有意に低下していた (**Fig.1d**)。以降は **KD** 効率の良い **PKC δ** siRNA (**#2**) を用い検討を行った。**mRNA** レベルにおける **KD** 効率は **49.9%**であった (**Fig.1e**)。そして、この **PKC** を **KD** した **InR1G9** 細胞を用いグルカゴン分泌を検討したところ、グルカゴン分泌は有意に低下していた (**Fig.1f**)。



InR1G9 細胞においてアルギニン応答性グルカゴン分泌は **PKC** をノックダウンすることで低下する (**Fig.2**)

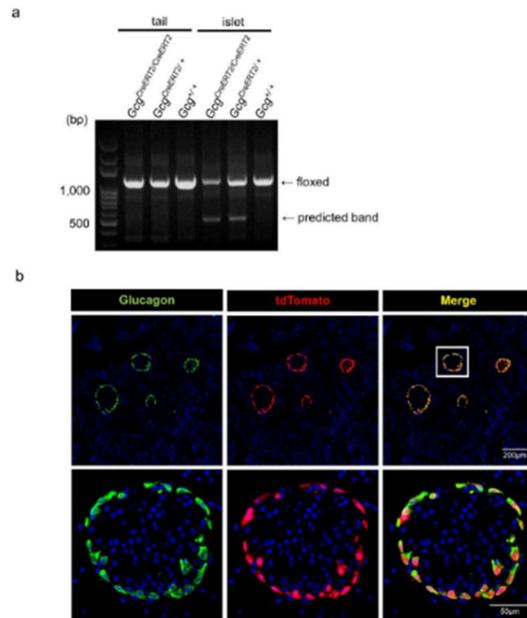
次に我々はグルカゴン分泌を亢進するとされるアルギニンや **IBMX** を用いグルカゴン分泌を検討した。**InR1G9** 細胞にアルギニンや **IBMX** を添加したところ有意にグルカゴン分泌は上昇した (**Fig. 2a**)。我々はよりグルカゴン分泌が亢進した **a** アルギニンに注目し、膵細胞におけるアルギニンと **PKC** の関係について検討した。ウエスタンブロットにてアルギニン投与時の蛋白発現を検討したところ、**PKC** の活性化を示す **PKC** のリン酸化 (**Thr505**) が亢進していた (**Fig.2b, 2c**)。そして、**InR1G9** 細胞におけるアルギニン応答性グルカゴン分泌は **PKC** の **KD** でその分泌亢進がキャンセルされた (**Fig.3d**)。



膵細胞特異的 **PKC** ノックアウトマウスの樹立 (**Fig.3**)

次に我々は細胞レベルで得られたアルギニン応答性グルカゴン分泌への **PKC δ** の関与を、膵細胞特異的 **PKC δ** ノックアウト (**αPKC δ KO**) マウスを作製し検討した。**αPKC δ KO** マウスは **Glucagon-CreERT2** マウスと **PKC δ** floxed マウスの交配によって作製した。今回、**Glucagon**

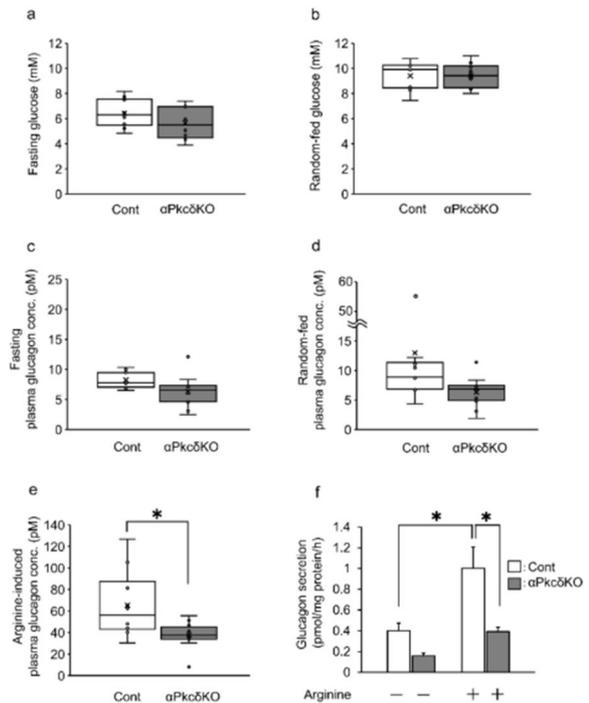
CreERT2^{+/+};Prkcd^{floxed/floxed} を α PKC δ KO マウス、*Glucagon*^{Cre+/+};Prkcd^{floxed/floxed} を Control とし実験を行った。作製したマウスは生後 5 週で tamoxifen を皮下注射し生後 24 週で同マウスの樹立確認を行った。PKC δ floxed マウスでは Cre recombinase が働いた組織では約 500 bp のバンドが出るようにプライマーが設計されている。同マウスの PCR では tail にて 500 bp のバンドは認めなかったが、islet では Cre の発現に伴い約 500 bp のバンドの出現を認め、DNA レベルでの樹立が確認できた (Fig.3a)。次に蛋白レベルでの樹立証明を行った。 α PKC δ KO マウスに CAG-tdTomato mouse を交配させ Cre recombinase の発現を間接的に検討することにした。24 週齢の *Glucagon*^{CreERT2};Prkcd^{floxed};R26^{tdTomato} の膵島免疫染色では、膵 α 細胞特異的に tdTomato の発現を認め蛋白レベルでの樹立確認ができた (Fig.3b)。



24 週齢の *Glucagon*^{CreERT2};Prkcd^{floxed};R26^{tdTomato} の膵島免疫染色では、膵 α 細胞特異的に tdTomato の発現を認め蛋白レベルでの樹立確認ができた (Fig.3b)。

膵 細胞特異的 PKC ノックアウトマウスではアルギニン応答性グルカゴン分泌が低下した (Fig.4)

α PKC δ KO マウスは 5 週齢で Tamoxifen 投与後、24 週齢時にマウスの表現型の検討を行った。24 週齢の α PKC δ KO マウスでは Control マウスに比べ、空腹時血糖値 (Fig.4a)、随時血糖値 (Fig.4b) に有意差はなかった。同様に、空腹時グルカゴン値 (Fig.4c)、随時グルカゴン値 (Fig.4d) ではグルカゴン値は有意な差は認めなかったものの、低下傾向を示していた。さらにアルギニン (3g/kg wt, pH 7.4) 投与時のグルカゴン分泌を検討したところコントロールに比較し α PKC δ KO マウスでは有意にグルカゴン分泌が低下していた (Fig.4e)。次に、24 週齢の α PKC δ KO マウスから膵島を単離しアルギニン応答性グルカゴン分泌の検討を行った。コントロールマウスでは単離膵島にアルギニンを添加したところグルカゴン分泌は亢進したが、 α PKC δ KO マウスではその亢進が有意に阻害された (Fig.4f)。また KO マウスでは 5mM Glucose でもコントロールマウスに比しグルカゴン分泌は低下傾向を示していた (Fig.4f)。



以上から、アルギニン応答性グルカゴン分泌に PKC の関与が示唆された。

< 参考文献 >

1. Lee, Y.; Wang, M.Y.; Du, X.Q.; Charron, M.J.; Unger, R.H. Glucagon receptor knockout prevents insulin-deficient type 1 diabetes in mice. *Diabetes* **2011**, *60*, 391-397, doi:10.2337/db10-0426.
2. Hancock, A.S.; Du, A.; Liu, J.; Miller, M.; May, C.L. Glucagon deficiency reduces hepatic glucose production and improves glucose tolerance in adult mice. *Mol Endocrinol* **2010**, *24*, 1605-1614, doi:10.1210/me.2010-0120.
3. Mima, A.; Kitada, M.; Geraldles, P.; Li, Q.; Matsumoto, M.; Mizutani, K.; Qi, W.; Li, C.; Leitges, M.; Rask-Madsen, C., et al. Glomerular VEGF resistance induced by PKCdelta/SHP-1 activation and contribution to diabetic nephropathy. *FASEB J* **2012**, *26*, 2963-2974, doi:10.1096/fj.11-202994.
4. Geraldles, P.; Hiraoka-Yamamoto, J.; Matsumoto, M.; Clermont, A.; Leitges, M.; Marette, A.; Aiello, L.P.; Kern, T.S.; King, G.L. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med* **2009**, *15*, 1298-1306, doi:10.1038/nm.2052.
5. Mengyao Li; G., S.; Vienberg; Olivier Bezy; T., B.; O'Neill; Kahn, C.R. Role of PKCd in Insulin Sensitivity and Skeletal Muscle Metabolism. *Diabetes* **2015**, *10.2337/db14-1891/-/DC1*, doi:10.2337/db14-1891/-/DC1.
6. Anita M. Hennige, H.B.L., Hans-Ulrich Haering, Felicia Ranta, Isabel Heinzelmann, Martina Dufer, Stefan Z. Lutz, Reiner Lammers, Gisela Drews, Ullrich, a.S. Overexpression of Kinase-Negative Protein Kinase C in Pancreatic α -Cells Protects Mice From Diet-Induced Glucose Intolerance and α -Cell Dysfunction. *Diabetes* **2010**, *59*, 119-127.
7. Kiyotake Yamamoto; Hiroyuki Mizuguchi; Natsumi Tokashiki; Makoto Kobayashi; Motoyuki Tamaki; Youichi Sato; Hiroyuki Fukui; Yamauchi, A. Protein kinaseC- signaling regulates glucagon secretion from pancreatic islets. *The Journal of Medical Investigation* **2017**, *64*, 122-128.
8. Takaki, R.; Ono, J.; Nakamura, M.; Yokogawa, Y.; Kumae, S.; Hiraoka, T.; Yamaguchi, K.; Hamaguchi, K.; Uchida, S. Isolation of glucagon-secreting cell lines by cloning insulinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol* **1986**, *22*, 120-126.
9. Shiota, C.; Prasad, K.; Guo, P.; Fusco, J.; Xiao, X.; Gittes, G.K. Gcg (CreERT2) knockin mice as a tool for genetic manipulation in pancreatic alpha cells. *Diabetologia* **2017**, *60*, 2399-2408, doi:10.1007/s00125-017-4425-x.
10. Song, M.; Matkovich, S.J.; Zhang, Y.; Hammer, D.J.; Dorn, G.W., 2nd. Combined cardiomyocyte PKCdelta and PKCepsilon gene deletion uncovers their central role in restraining developmental and reactive heart growth. *Sci Signal* **2015**, *8*, ra39, doi:10.1126/scisignal.aaa1855.
11. Madisen, L.; Zwingman, T.A.; Sunkin, S.M.; Oh, S.W.; Zariwala, H.A.; Gu, H.; Ng, L.L.; Palmiter, R.D.; Hawrylycz, M.J.; Jones, A.R., et al. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* **2010**, *13*, 133-140, doi:10.1038/nn.2467.
12. Soltoff, S.P. Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta. *Trends Pharmacol Sci* **2007**, *28*, 453-458, doi:10.1016/j.tips.2007.07.003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Honzawa Norikiyo, Fujimoto Kei, Kobayashi Masaki, Kohno Daisuke, Kikuchi Osamu, Yokota-Hashimoto Hiromi, Wada Eri, Ikeuchi Yuichi, Tabei Yoko, Dorn Gerald W., Utsunomiya Kazunori, Nishimura Rimei, Kitamura Tadahiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Protein Kinase C (Pkc)- Mediates Arginine-Induced Glucagon Secretion in Pancreatic -Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4003 ~ 4003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23074003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本澤訓聖、藤本啓、小林雅樹、西村理明、北村忠弘
2. 発表標題 膵 細胞からのグルカゴン分泌にPKC が関与する
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本澤訓聖、藤本啓、小林雅樹、西村理明、北村忠弘
2. 発表標題 膵 細胞のアルギニン応答性グルカゴン分泌にPkc が関与する
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022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
研究協力者	本澤 訓聖 (Honzawa Norikiyo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Washington University School of Medicine			