

平成22年5月14日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20790635  
 研究課題名 (和文)  
 肝臓—膵島連関による膵β細胞制御機構の解明  
 研究課題名 (英文)  
 Mechanism of pancreatic beta-cell regulation by signals from the liver  
 研究代表者  
 今井 淳太 (IMAI JUNTA)  
 東北大学・病院・助教  
 研究者番号：80431500

## 研究成果の概要 (和文)：

これまで肥満・インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償性反応がどのようにして起こるのかは不明な点が多かった。本研究によってこの膵β細胞の代償性反応が神経を介した肝臓と膵β細胞間の連関機構によって起こることが明らかになった。さらにこの連関機構を制御することにより膵β細胞の再生治療につながる可能性も併せて示した。この成果は世界で最も知られている学術誌の一つであるサイエンス誌に掲載された。また新聞・テレビ・インターネットを含めた数多くのメディアで報道され、世界に発信された。

## 研究成果の概要 (英文)：

The mechanism underlying compensatory beta-cell responses against insulin resistance is not well understood. We have identified that a neuronal relay, originating in the liver, is involved in compensatory beta-cell responses during obesity development. In addition, we have shown that modulation of this neuronal relay may serve as a potential strategy for beta-cell regenerative medicine. These results were published in Science, one of the most famous scientific journals in the world, and were transmitted all over the world via various media.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

## 研究分野：生物系

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病、臓器間連関、インスリン分泌、膵β細胞増殖、再生治療、自律神経、肝臓

## 1. 研究開始当初の背景

現在わが国では、エネルギーの過剰摂取による肥満患者が増加している。それに伴う

インスリン抵抗性を基盤とした糖尿病患者の増加は、動脈硬化性疾患などの合併症の増加をもたらし、医療経済を圧迫する要

因の一つとなっている。しかし、その病態基盤となるインスリン抵抗性の本態については明らかでない点が多く、糖尿病の根本治療の障害となっている。

現在のところ、インスリン抵抗性状態では全身のインスリン需要に対応して膵β細胞からのインスリン分泌が亢進し、高インスリン血症を呈すると理解されているが、膵β細胞が何を感知してインスリンの過分泌を起こすのかについては不明な点が多い。実際、肥満患者などでは血糖値が上昇する以前から高インスリン血症と膵ランゲルハンス島の過形成を呈する例が多く存在することから (Diabetes Care 29, 356, 2006)、血糖値以外にも膵β細胞の代償性反応を起こす要因があると考えられている。これらの背景から、本研究ではこれまでに明らかになっていない膵β細胞の機能制御、増殖制御機構の解明を目指した。

## 2. 研究の目的

近年、全身の糖代謝における臓器間相互作用の重要性が明らかになりつつある。これらの臓器間相互作用は液性因子、あるいは神経経路を介して起こることが報告されている。研究代表者の所属する研究室においても、神経シグナルが、臓器・組織間の代謝情報のやりとりに重要な役割を果たしていることを見出し、注目を集めている。

膵β細胞については、消化管から分泌されるインクレチンによる増殖亢進やインスリン分泌制御、脂肪細胞から分泌される遊離脂肪酸によるインスリン分泌制御など、液性因子を介した臓器間連関についての報告が多い。一方、神経経路を介した臓器間連関についてはムスカリン受容体3を介して、迷走神経によりインスリン分泌が制御されること (Cell Metab. 3, 449, 2006)、

迷走神経刺激により膵β細胞の増殖が亢進すること (Gastroenterology 110, 885, 1996)などが報告されている。しかし、これらの迷走神経による膵β細胞の機能・増殖の制御が生理的にどのような状態で起こるのか、さらにこれらの現象を起こすために必要な信号を発する臓器が何であるのかについては、ほとんど解明されていなかった。

これまでの臓器特異的インスリンレセプターノックアウトマウスの解析の結果、筋肉 (Mol Cell 2, 559, 1998)あるいは脂肪組織 (Dev Cell 3, 25, 2002)特異的なノックアウトマウスにおいては膵ランゲルハンス島の増大が起こらないのに対し、肝臓特異的ノックアウトマウスにおいては著明な高インスリン血症と膵ランゲルハンス島の増大が起こることが報告されている (Mol Cell 6, 87, 2000)。この結果から研究代表者は、肝臓からの神経あるいは液性因子を介した臓器間連関経路が、膵β細胞の機能、増殖制御に重要な役割を果たしている可能性を想起した。

そこで本研究ではアデノウィルスを用いた肝臓での後天的でかつ急性の遺伝子導入による代謝状態変化の解析手法という技術的背景に基づき、肝臓での代謝状態の急性の変化が膵β細胞の機能、増殖に与える影響を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 肝臓への遺伝子導入による、膵β細胞に対する影響の解析

肥満、インスリン抵抗性状態において肝臓において発現や活性が変化することが報告されている遺伝子、具体的には IR shRNA, PDK1 shRNA, ERK1/2 shRNA, dominant negative PI3-K, constitutive active MEK1, dominant negative Ras, TNF- $\alpha$ , IL-6 など遺伝子を組み込んだアデノウィルスを作

製した。これらのアデノウィルスを用いて遺伝子導入を行ったマウスにおいて血糖値や血清脂質値、血清インスリン値、体重、摂食などの測定、糖負荷試験によるインスリン分泌の検討、膵臓の組織学的、生化学的検討、単離膵島でのインスリン分泌の検討などを行い、肝臓への遺伝子導入が、膵β細胞にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

#### (2) 肝臓—膵島連関の解析

その結果、肝臓の ERK 経路の活性化によって膵β細胞機能の亢進、膵β細胞量の増加がおこることが明らかになった。そこで次にこの肝臓—膵β細胞間連関がどのような経路を介して起こるのかを検討した。

##### ① 神経を介した連関

肝臓や膵臓に分布している自律神経を切断し、肝への遺伝子導入による膵β細胞への作用に与える影響を検討した。また、神経切断実験においては求心路、遠心路のいずれも切断してしまうため、結果の評価が難しかったため、求心性神経線維のみを破壊するカプサイシンを用いて薬理的に求心性線維を阻害し、同様の実験を行った。また、アトロピンなどの副交感神経遮断薬やプロプラノロールなどの交感神経遮断薬を用いた薬剤による神経遮断も行った。これらの結果、肝臓からのシグナルは求心性内臓神経を介して中枢神経へ、さらに膵迷走神経を介して膵β細胞へ伝達されていることが明らかになった。

##### ② 液性因子を介した連関

RT-PCR を用いて ERK 経路が活性化した肝臓において遺伝子発現が変化している遺伝子を検討した。その結果、発現が増加する遺伝子をいくつか同定し、その遺伝子を組み込んだアデノウィルスを作製した。これらを肝臓に過剰発現することにより、膵β細胞

の変化が起こるのかを検討した。

#### (3) インスリン抵抗性状態における肝臓—膵島連関の関与の検討

著明なインスリン抵抗性を呈するレプチン欠損マウス (ob/ob マウス) や高脂肪食負荷マウスに対して、アデノウィルスを用いて、肝臓の ERK 経路を抑制する優性阻害型変異体の遺伝子導入を行った。さらにこれらのマウスを用いて、この臓器間連関経路において信号を伝達する内臓神経、膵迷走神経の阻害を行いインスリン分泌やβ細胞の増殖がどのように変化するのかを検討した。

#### (4) 臓器間連関経路の制御による膵β細胞増加作用の検討

STZ 投与により膵β細胞を破壊してインスリン欠乏性糖尿病を発症したマウス、膵β細胞における小胞体ストレスによって膵β細胞が減少して糖尿病を発症する Akita マウスにおいてこの臓器間連関を制御することにより膵β細胞の量を増やすことができるか、糖尿病状態を改善することができるかを検討した。

## 4. 研究成果

(1) MEK1 は ERK をリン酸化することで ERK 経路を活性化することが知られていることから、Xenopus の MEK1 を用いて作製した恒常活性化型変異体の MEK1 遺伝子を組み込んだアデノウィルスを用いて肝臓選択的に ERK 経路を活性化したマウスを作製した。遺伝子導入を行ったマウスの肝臓における ERK のリン酸化を検討したところ、遺伝子導入 3 日目をピークとして ERK のリン酸化が亢進していた。このマウスに遺伝子導入 3 日目に糖負荷試験を行ったところ、糖応答性のインスリン分泌が著明に亢進し耐糖能が改善していた。さらに驚くべきことに肝臓 ERK 経路活性化マウスの膵島において BrdU 陽性β細胞が著明に増加しており、膵インスリン含量、膵島量も著明

に増加していることが明らかになった。これらの結果から、肝臓における ERK 経路の活性化によって起こったシグナルは、なんらかの経路を介して、膵β細胞においてインスリン分泌と細胞増殖を促すことが明らかになった。

(2) 肝臓 ERK 経路を活性化したマウスで認められた肝臓—膵β細胞間連関における、膵臓に分布する迷走神経の関与を検討した。膵臓に分布する迷走神経を特異的に切断したマウスにおいて肝臓 ERK 経路を活性化したところ、糖応答性インスリン分泌と膵β細胞増殖の亢進が有意に阻害された。この結果は肝臓—膵β細胞間連関に膵臓に分布する迷走神経が関与していることを示すとともに、肝臓で起こったシグナルが一旦、中枢神経まで伝達されていることを示唆するものと考えられた。次にカプサイシンを用いて内臓神経の求心性線維を特異的に阻害したマウスの肝臓 ERK 経路を活性化したところ、糖応答性インスリン分泌と膵β細胞増殖の亢進が有意に阻害され、肝での ERK 活性化によるシグナルが内臓神経求心路を介して脳に伝えられていることが示唆された。さらに中脳切断を行ったマウスでも同様に、肝臓 ERK 活性化による糖応答性インスリン分泌と膵β細胞増殖の亢進は有意に阻害された。このことは、中枢神経系が、自律神経系を介した臓器間連関に関与していることを直接証明するものであると考えている。

以上の結果から、肝臓の ERK 経路の活性化が内臓神経求心性線維→中枢神経→迷走神経遠心性線維という経路を介してインスリン分泌や膵β細胞増殖を促進するという、これまで知られていなかった、神経シグナルを介する肝臓—膵β細胞間連関経路が存在することが明らかになった。

(3) 次にこの連関経路の肥満における関与を

検討した。そこで肥満・インスリン抵抗性モデルマウスである ob/ob マウスや高脂肪食を負荷した肥満マウスにおいて、アデノウィルスを用いて優性阻害型 MEK1 の遺伝子導入を行い、肝臓の ERK 経路の活性を抑制したところ、肥満の進行に伴う膵インスリン含量の増加が有意に阻害された。また、ob/ob マウスにおいて膵に分布する迷走神経の切断、カプサイシンによる内臓神経求心性線維の薬理的遮断を行い、この連関経路を各部位で遮断したところ、同様に膵インスリン含量の増加を抑制した。これらの結果から、肥満に伴う生理的な代償性膵島肥大において、この連関経路が関与していることが明らかとなった。ERK 経路種々の炎症性サイトカインによって活性化されることが知られている。肥満の際には内臓脂肪におけるこれらのサイトカインの発現が上昇し血中の濃度が上昇することから、肝臓は ERK 経路の活性化を介してこのことを感知して膵β細胞にインスリン分泌と膵β細胞増殖を促す信号を送っているのかもしれない。さらにこの機構が障害されている場合、血糖値の上昇を防ぐべく起こる膵β細胞の増殖が起こらずに糖尿病の発症、増悪につながる可能性も考えられる。

(4) この連関経路の膵β細胞増殖機構に着目し、インスリン欠乏性糖尿病モデルマウスの肝臓において肝臓 ERK 経路を活性化して、膵β細胞の再生が起こるかどうかを検討した。ストレプトゾトシンを投与して膵β細胞を破壊し高血糖をきたしたマウスにおいて肝臓 ERK 経路を活性化したところ、これらのマウスにおいて血糖値の著明な改善を認め、膵島内の BrdU 陽性細胞が増加し、膵インスリン含量も著明に増加した。さらに膵β細胞における小胞体ストレスにより膵β細胞脱落がおり、著明な高血糖をきたす Akita マウスにおいても同様の結果が得られたことか

ら、肝臓—膵β細胞間連関経路の活性化はインスリン欠乏性糖尿病モデルマウスの膵β細胞の再生を促進し、糖尿病を改善することが示された。最近の研究によって1型糖尿病はもとより、2型糖尿病においても、進行期には膵β細胞量が減少していることが明らかになってきており、その機序の一つとして、膵β細胞における小胞体ストレスの亢進が考えられている。これらの実験結果は、これら1型・2型のインスリン欠乏性糖尿病に対し、臓器間ネットワーク機構を利用することにより、体内で膵β細胞を再生させうことを示したものであり、治療への応用性が期待される。

これらの結果は世界で最も知られている学術誌の一つであるサイエンス誌に掲載された。また新聞・テレビ・インターネットを含めた数多くのメディアで報道され、世界に大きなインパクトを与えた。

#### 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6件)

1. Imai J, Oka Y, Katagiri H: Identification of a Novel Mechanism Regulating β Cell Mass: Neuronal relay from the Liver to Pancreatic β Cells. *Islets* 1: 73-75 2009 査読無
2. Katagiri H, Imai J, Oka Y: Neural Relay from the Liver Induces Proliferation of Pancreatic β Cells: A Path to Regenerative Medicine using the Self-Renewal Capabilities. *Communicative & Integrative Biology* 2: 425-427 2009 査読無
3. Ogihara T, Katagiri H, Yamada T, Kudo H, Imai J, Ishigaki Y, Hinokio Y, Yamagiwa Y, Ueno Y, Shimosegawa T, Oka

Y: Peginterferon (PEG-IFN) plus ribavirin combination therapy, but neither interferon nor PGE-IFN alone, induced type 1 diabetes in a patient with chronic hepatitis C. *Intern Med* 48:1387-1390, 2009 査読有

4. Imai J, Yamada T, Saito T, Ishigaki Y, Hinokio Y, Kotake H, Oka Y, Katagiri H: Eradication of insulin resistance. *Lancet* 374:264, 2009 査読有
5. Ishigaki Y, Katagiri H, Gao J, Yamada T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Ogihara T, Ishihara H, Sato Y, Takikawa K, Nishimichi N, Matsuda H, Sawamura T, Oka Y: Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation* 118:75-83, 2008 査読有
6. Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Nijima A, Nakazato M, Asano T, Minokoshi Y, Oka Y: Regulation of Pancreatic {beta} Cell Mass by Neuronal Signals from the Liver. *Science* 322:1250-1254, 2008 査読有

[学会発表] (計3件)

1. 2009年5月23日、日本糖尿病学会総会、今井 淳太、自律神経を介した肝臓—膵β細胞連関による膵β細胞増殖機構、大阪
2. 2009年4月24日、日本糖尿病学会総会、今井 淳太、肝臓におけるERK経路活性化は膵島再生を促進する、前橋
3. 2009年2月14日、日本糖尿病・肥満動物学会、今井 淳太、神経を介した臓器間連関による膵β細胞増殖機構、岡山

○取得状況（計1件）

名称：膵β細胞増殖促進剤、血中インスリン濃度上昇剤、血糖値低下剤、及び糖尿病治療・予防薬

発明者：片桐 秀樹、岡 芳知、今井 淳太

権利者：同上

種類：特願

番号：2007-114804

取得年月日：2008年11月6日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 淳太 (IMAI JUNTA)

東北大学・病院・助教

研究者番号：80431500

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

岡 芳知 (OKA YOSHITOMO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70175256

片桐 秀樹 (KATAGIRI HIDEKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00344664