

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月26日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590984

研究課題名（和文） GSK-3 $\beta$ の膵 $\beta$ 細胞量調節機構の解明とその制御による2型糖尿病治療の研究

研究課題名（英文） Investigation of roles of GSK-3 $\beta$  in the regulation of pancreatic  $\beta$  cell mass for the application to the treatment of type 2 diabetes mellitus.

研究代表者

田部 勝也 (TANABE KATSUYA)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00397994

研究成果の概要（和文）：膵 $\beta$ 細胞の減少が2型糖尿病進展の要因と考えられる。本研究では、セリン・スレオニンキナーゼ Gsk-3 を介した膵 $\beta$ 細胞量調節機構の解明を行った。膵 $\beta$ 細胞特異的 Gsk-3 $\beta$  欠損マウスでは、高脂肪食負荷による膵 $\beta$ 細胞量増加が亢進し、耐糖能が改善した。 $\beta$ 細胞量増加のメカニズムに IRS シグナルの増強などが関係した。一方、小胞体ストレス下の膵 $\beta$ 細胞では、活性化した Gsk-3 がストレス応答障害を介してアポトーシス誘導に関与することを明らかにした。Gsk-3 が糖尿病病態での膵 $\beta$ 細胞量減少に重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has been recognized that a paucity of  $\beta$ -cell mass is central in the pathogenesis of T2DM. Glycogen synthase kinase-3(Gsk-3) is negatively regulated by insulin receptor signaling. In this study, we aimed to understand role of Gsk-3 $\beta$  in the regulation of  $\beta$ -cell mass.  $\beta$ -cell specific ablation of Gsk-3 $\beta$  resulted in expanded  $\beta$ -cell mass and resistance to high fat feeding induced diabetes in mice. Furthermore, we have evidenced that Gsk-3 was implicated to an induction of apoptosis through a modulation of stress response in  $\beta$ -cells during ER stress. Taken together, these data evidenced direct implications of Gsk-3 for the maintenance of  $\beta$ -cell mass and secretory capacity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

## 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は日本においても急増中であり、その克服は急務である。2型糖尿病は、全身性のインスリン作用障害により発症する。さ

らに、糖尿病の進展には進行性の $\beta$ 細胞の機能低下、 $\beta$ 細胞量の減少が重要な役割を演じている。GSK-3 $\beta$ はインスリン・IGF-1シグナルにより抑制的に調節される。糖尿病患者お

よび糖尿病モデル動物において、糖代謝に重要な種々の臓器においてGSK-3 $\beta$ が活性化しており、耐糖能障害との関連が推察される。事実、インスリンシグナル伝達障害により糖尿病を発症する遺伝子改変マウスにおいて、GSK-3 $\beta$ ヘテロ欠損が肝臓や筋肉におけるインスリン作用を補完するとともに膵 $\beta$ 細胞量を著しく改善し、その結果、糖尿病を改善する。このことは、GSK-3 $\beta$ が2型糖尿病の有望な治療標的である可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病病態において、GSK-3活性化による膵 $\beta$ 細胞障害の分子機構の解明とそれに基づく新規創薬ターゲットの同定をめざし、特に以下の点についての解明を目的とした。

- (1)GSK-3 $\beta$ を介する膵 $\beta$ 細胞量調節機構
- (2)糖尿病病態におけるGSK-3活性化を介した膵 $\beta$ 細胞障害発現機構

## 3. 研究の方法

- (1)膵 $\beta$ 細胞特異的 GSK-3 $\beta$  欠損マウス ( $\beta$ GSK-3 $\beta^{-/-}$ ) の解析

GSK-3 $\beta$  flox/flox ノックインマウスを rat insulin promoter2 Cre 発現マウスと交配させることにより膵 $\beta$ 細胞特異的 GSK-3 $\beta$  欠損マウス ( $\beta$ GSK-3 $\beta^{-/-}$ ) を作成した。 $\beta$ GSK-3 $\beta^{-/-}$ を4週より高脂肪食(60%lard fat diet)により飼育を行った。高脂肪食負荷 12週後の耐糖能、膵 $\beta$ 細胞増殖能および細胞量の変化を同様に飼育したコントロールマウス群と対比させた。単離ラ氏島におけるグルコース応答性インスリン分泌を batch incubation 法により解析した。12週齢および24週齢のマウスから採取した膵臓切片をインスリン抗体による免疫染色を行い、インスリン陽性面積と膵 $\beta$ 細胞量を定量化した。Ki67抗体とインスリン抗体二重陽性細胞数の計測により増殖能を解析した。単離ラ氏島におけるグルコース応答性インスリン分泌を batch incubation 法により解析した。単離ラ氏島におけるインスリンシグナル、転写因子 Pdx1、Wnt シグナルおよび細胞周期調節分子発現量およびリン酸化量をウェスタンブロットにより解析した。

- (2)ブドウ糖脂肪毒性発現機構の解析

野生型マウス単離ラ氏島および膵 $\beta$ 細胞株を5-25mMグルコース存在下で500mMパルミチン酸で24-72時間処理した。インスリンシグナル分子および小胞体ストレス応答分子の発現やリン酸化量変化をウェスタンブロットにより解析した。アデノウィルスベクターを用いて GSK-3 kinase dead (GSK-3 $\beta$ <sup>K85M/M86A</sup>)変異体、野生型 ATF3 強制発現を行った。アデノウィルスを用いて shRNA ノックダウンにより ATF3 転写活性の抑制を

行った。

- (3)小胞体ストレス応答調節における GSK-3 $\beta$  の役割の解明

野生型マウス単離ラ氏島および MIN6 において薬理的に小胞体ストレスを惹起した。Akitaマウスより Ins2 96C/Y 変異を1コピー有する膵 $\beta$ 細胞株を樹立した。LiCl 処理又は GSK-3 特異的阻害剤である SB216763 処理、およびレトロウィルスベクターを用いて GSK-3 $\beta$  kinase dead 変異体強制発現により GSK-3 活性の抑制を行った。

- ①アポトーシス誘導についてウェスタンブロットによる切断型カスパーゼ3の検出および DNA フラグメントの検出により解析した。小胞体ストレス応答分子の発現変化をウェスタンブロットにより、転写レベルでの発現変化をリアルタイム PCR 法により解析した。
- ②GSK-3 抑制の下にシクロヘキサミド処理を行い ATF4 蛋白安定性について解析を行った。
- ③野生型 ATF4 および安定変異体 ATF4 を 293 細胞に強制発現し免疫沈降法により回収した。これらを基質として用いて GSK-3 による In vitro kinase assay を行った。
- ④野生型 ATF4 と安定変異体 ATF4 におけるユビキチン化量を比較するとともにユビキチン化酵素 (E3 ligase 複合体) との蛋白結合を免疫沈降法により解析した。
- ⑤レトロウィルスベクターを用いて ATF4 恒常転写抑制型変異体の強制発現または shRNA ノックダウン法により ATF4 転写活性抑制を行った。

## 4. 研究成果

膵 $\beta$ 細胞特異的 Gsk-3 $\beta$  欠損マウス ( $\beta$ Gsk-3 $\beta^{-/-}$ ) は、通常食下でコントロールマウスに比し耐糖能が亢進し、高脂肪食負荷による耐糖能障害に抵抗性を示した。インスリン感受性はコントロールマウスと同等であったが、グルコース応答性インスリン分泌の亢進、膵 $\beta$ 細胞量増加および細胞増殖能亢進を認めた。加えて、単離ラ氏島におけるグルコース応答性インスリン分泌は  $\beta$ Gsk-3 $\beta$  欠損により亢進した。 $\beta$ Gsk-3 $\beta^{-/-}$ 膵ラ氏島では活性型  $\beta$ -catenin 発現増加に加えて、IRS1/2 発現増加を認め、これには Akt および Foxo1 リン酸化量の増加および転写因子 Pdx1 発現亢進が関連した。翻訳阻害剤であるシクロヘキサミド処理による IRS1/2 減少速度が GSK-3 阻害剤存在下では有意に減弱したことから、GSK-3 活性が IRS1/2 蛋白安定性を抑制的に調節することが示唆された。これらの結果から GSK-3 活性が膵 $\beta$ 細胞においてインスリンシグナルを抑制的に調節することが示唆され、 $\beta$ Gsk-3 $\beta^{-/-}$ においてインスリンシグナルの増強が  $\beta$ 細胞機能・増殖能亢進を来す分子機構の少なくとも一部を説明し得ると考えられた。

2型糖尿病進展における膵β細胞機能障害の一因として、脂肪毒性という概念がある。上昇した血中遊離脂肪酸による膵β細胞障害がその本態の一部であると想定されている。マウス単離ラ氏島、MIN6 および INS1 において、パルミチン酸処理による細胞死誘導がグルコース濃度依存性に増強した。このことには小胞体ストレス亢進に加えて IRS2 発現量低下および Akt リン酸化量の低下、GSK-3 活性化が関連した。ケミカルシャペロンである TUDCA 処理による folding capacity 増強および、ストレス応答分子であり、IRS2 転写を抑制的に調節する転写因子 ATF3 のノックダウンにより IRS2 発現レベルが部分的に回復し、切断型カスパーゼ3誘導が減弱した。さらに、恒常抑制型 GSK-3β の強制発現が高濃度グルコース/パルミチン酸によるアポトーシスを軽減することを確認した。これらの結果から、脂肪毒性や代謝性ストレスへの暴露による GSK-3 制御障害がβ細胞死誘導に重要な役割を担うことが示唆された。一方、ストレス条件下でのアポトーシス誘導における GSK-3 を介するシグナリング機構は解明されていない。マウス単離膵ラ氏島において薬剤性小胞体ストレス誘導により、また Ins2 96C/Y 変異を有するマウス膵β細胞株において GSK-3 の活性化を来した。さらに、これらの細胞におけるアポトーシス誘導が GSK-3 活性抑制により顕著に減弱し、この時、小胞体ストレス応答コンポーネントである転写因子 ATF4 の発現が増大した。Gsk-3 抑制による抗アポトーシス効果は、ATF4 dominant negative 変異体強制発現あるいは knockdown により有意に減弱した。一方、ATF4 は構成的にユビキチン化を介した蛋白分解を受けることが明らかにされている。GSK-3 活性抑制により ATF4 と SCF E3 ligase アクセプターである β TrCP との結合が減弱する結果、ATF4 蛋白の安定性が増強した。さらに、ATF4-degron 内に存在する Ser214 が GSK-3 のリン酸化標的であることを見出した。ATF4 S214A 変異体において β TrCP との結合はほぼ完全に失われており、ユビキチン化量が顕著に減少した。以上の結果から、小胞体ストレス下の膵β細胞において、SCF E3 ligase と GSK-3 活性化による ATF4 蛋白分解促進がアポトーシスを誘導する分子機構の少なくとも一部であることが示唆された。以上、本研究から得られた知見から、GSK-3 制御障害が膵β細胞増殖抑制および細胞死亢進と深く関わっており、膵β細胞不全進展に重要な役割を演じることが示唆された。

#### 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4件)

① Clock-controlled output gene Dbp is a regulator of Arnt/Hif-1β gene expression in pancreatic islet β-cells.

Nakabayashi H, Ohta Y, Yamamoto M, Susuki Y, Taguchi A, Tanabe K, Kondo M, Hatanaka M, Nagao Y, Tanizawa Y.

Biochem Biophys Res Commun.

2013 May 3;434(2):370-5.

Doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.084.

査読有

② Glucose and fatty acids synergize to promote B-cell apoptosis through activation of glycogen synthase kinase 3β independent of JNK activation.

Tanabe K, Liu Y, Hasan SD, Martinez SC, Cras-Méneur C, Welling CM, Bernal-Mizrachi E, Tanizawa Y, Rhodes CJ, Zmuda E, Hai T, Abumrad NA, Permutt MA.

PLoS One. 2011 Apr 26;6(4):e18146.

Doi: 10.1371/journal.pone.0018146.

査読有

③ Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic beta-cells.

Hatanaka M, Tanabe K, Yanai A, Ohta Y, Kondo M, Akiyama M, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y.

Hum Mol Genet. 2011 Apr 1;20(7):1274-84.

Doi: 10.1093/hmg/ddq568.

査読有

④ Conditional ablation of Gsk-3β in islet beta cells results in expanded mass and resistance to fat feeding-induced diabetes in mice.

Liu Y, Tanabe K, Baronnier D, Patel S, Woodgett J, Cras-Méneur C, Permutt MA.

Diabetologia. 2010 Dec;53(12):2600-10.

Doi: 10.1007/s00125-010-1882-x.

査読有

[学会発表] (計6件)

#### ① 田部 勝也

SCFβTrCP and GSK3-mediated degradation of ATF4 is a pro-apoptotic mechanism in pancreatic β-cell under endoplasmic reticulum stress.

第56回日本糖尿病学会年次学術総会

(20130518) .熊本(メルパルク熊本)

シンポジウム「細胞内ストレスと糖尿病」

#### ② 田部 勝也

Role of GSK-3β in the development of β cell failure.

第9回国際糖尿病連合西太平洋地区会議  
(IDF-WPR) / 第4回アジア糖尿病学会 (AASD)  
(20121126) . 京都(京都国際会議場)  
シンポジウム「 $\beta$ 細胞死の発生機序」

③田部 勝也

GSK-3 enhances ER stress-induced apoptosis by regulation of ATF4 protein stability.

第 55 回日本糖尿病学会年次学術総会  
(20120517) . 横浜(パシフィコ横浜)  
シンポジウム「2型糖尿病 インスリン分泌」

④田部 勝也

Glycogen synthase kinase-3 (Gsk-3)を介した小胞体ストレス応答制御と膵  $\beta$  細胞障害  
第 85 回日本内分泌学会学術総会  
(20120420) . 名古屋 (名古屋国際会議場)  
シンポジウム「小胞体ストレスと内分泌代謝疾患」

⑤田部 勝也

Cutting-edge Research in Insulin Secretion: Roles of Wolfram Syndrome 1 Gene Product (WFS1) on Beta Cell Function and its Adaptation to increased Insulin Demand.

第 54 回日本糖尿病学会年次学術総会  
(20110519) . 札幌 (ロイトン札幌)  
シンポジウム「インスリン分泌の最前線」

⑥田部 勝也

The roles of glycogen synthase kinase-3  $\beta$  in the regulation of  $\beta$ -cell mass in insulin resistant diabetes models.

第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会  
(20100529) .  
岡山 (岡山コンベンションセンター)  
膵  $\beta$  細胞研究の最前線「 $\beta$  cell failure;  $\beta$  細胞不全の原因とそのメカニズム」

[図書] (計 4 件)

①田部 勝也

日本臨床社  
最新臨床糖尿病学(上)  
2012 年  
5 頁(118-122)

②田部 勝也

中山書店  
スマートな糖尿病診断と治療の進め方  
2011 年  
3 頁(83-85)

③田部 勝也

診断と治療社  
分子糖尿病学の進歩 2010

2010 年  
4 頁(147-150)

④田部 勝也

科学評論社  
内分泌・糖尿病・代謝内科  
2010 年  
6 頁(25-30)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田部 勝也 (TANABE KATSUYA)  
山口大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00397994