

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月12日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791044

研究課題名（和文）新規タンパク Nix 制御因子 PKC $\delta$ による膵 $\beta$ 細胞容積調節に関する研究研究課題名（英文） Novel protein Nix regulates pancreatic beta cell mass via PKC $\delta$ 

研究代表者

藤本 啓 (FUJIMOTO KEI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40372974

研究成果の概要（和文）：

糖尿病患者数は増加の一途である。2型糖尿病では、 $\beta$ 細胞容積の低下が認められ、これが糖尿病発症の一因である。また、 $\beta$ 細胞容積低下は $\beta$ 細胞死が主因であり、ヒトと糖尿病モデル動物で、 $\beta$ 細胞死が報告されている。一方、糖尿病では脂肪酸の増加を伴うことが多く、臨床的には高脂血症としてとらえられる。そこで、「高血糖と高脂肪酸が $\beta$ 細胞容積の低下に関与する」という、糖脂毒性の分子機序を検討した。高血糖と高脂肪酸下において、 $\beta$ 細胞死が増加した。大変興味深いことに、 $\beta$ 細胞容積を負に調節する新規タンパク Nix の上流に PKC $\delta$  が存在し、PKC $\delta$  の発現抑制により $\beta$ 細胞死が抑制された。今後は、Nix や PKC $\delta$  をターゲットとする分子標的薬の開発し、 $\beta$ 細胞容積の回復を目指した新規糖尿病治療の基礎的分子機序が明らかとなった。そして究極的には、糖尿病の治療と増加する医療費の軽減および患者の生活の質を改善することを目指す。

研究成果の概要（英文）：

Glucose and fatty acid contribute to beta cell death destruction in diabetes, but the mechanisms are incompletely understood. The aim of the current study was to address the role of the protein kinase C (PKC) isoform PKC $\delta$ , a diverse regulator of cell death, in glucose and fatty acid-induced cell death in beta cells. Mouse insulinoma cell line MIN6 cells were treated with glucose and free fatty acid (palmitate) and assayed for MIN6 cell death by propidium iodide (PI)-staining and TUNEL assays. Signaling pathways were determined by immunoblotting and promoter assays. PKC $\delta$  overexpression in MIN6 cells induced cell death as assessed by PI-staining and TUNEL assays accompanied with increased cleaved caspase-3 by immunoblotting. Interestingly, PKC $\delta$  induced Nix promoter activity and Nix protein expression. Deficiency of PKC $\delta$  inhibited MIN6 cell death with glucose and palmitate (Glucolipotoxicity model). PKC $\delta$  deficiency partially protects against glucose and fatty acid in beta cells. This might be partly dependent by cell death molecule Nix. These results highlight a mechanism for regulating beta cell death in glucolipotoxicity condition such as in obese type 2 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、膵β細胞容積

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 厚生労働省によると、平成 14 年度の糖尿病関連医療費は 1.8 兆円、糖尿病患者数は約 820 万人であり、これらは増加の一途である。2 型糖尿病では、約 70%の・細胞容積の低下が認められ、これが糖尿病発症の一因である。また、・細胞容積低下は・細胞死が主因であり、ヒトと糖尿病モデル動物で、・細胞死が報告されている。そこで、・細胞死の分子機構を明らかにする必要がある。

### (2) アポトーシス、壊死とオートファジーは・細胞死を引き起こす

・細胞容積の減少はアポトーシスが原因とする報告が多いが、壊死やオートファジーによる・細胞死の報告はなかった。申請者は、オートファジーが・細胞死に係わることを報告した(Fujimoto et al., *J Biol Chem*, 2009)。さらに世界で初めて、ミトコンドリア依存性壊死が・細胞死に関与することを明らかにした(Fujimoto et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010)。よって、アポトーシスのみならず壊死とオートファジーを含めた・細胞死の分子機構の解明が望まれる。

### (3) *Pdx1* 発現量低下はアポトーシス、壊死そしてオートファジーを誘導する

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) は若年で糖尿病が発症し、常染色体優性遺伝を示す単一遺伝子疾患である。2 型糖尿病の 4-6%は MODY である。MODY の原因遺伝子 *PDX1* は、・細胞の発生、維持そして再生に不可欠な遺伝子である(Fujimoto et

al., *Diabetes Obes Metab*, 2009)。 *Pdx1*<sup>+/-</sup> マウスはヒトと同様の表現型を有し、多くの糖尿病モデル動物で *Pdx1* の発現量が低下する。よって、ヒトの糖尿病を研究する上で有用なモデルである。 *Pdx1*<sup>+/-</sup> マウスの・細胞ではアポトーシス、壊死そしてオートファジーの 3 様式全てが認められ、・細胞容積の減少をきたす。*Pdx1* 発現低下による・細胞死の分子機構を明らかにすることを目的に、マイクロアレイによる遺伝子発現量を網羅的に探索した。その中で申請者の興味を惹いた新規タンパクが *Nix* である。

### (4) *Nix* はアポトーシスと壊死により細胞死を誘導する

*Nix* は細胞死を誘導するが、・細胞における役割は不明だった。・細胞において、*Nix* はアポトーシスとミトコンドリア依存性壊死を負に調節することが判明した。また、 *Pdx1*<sup>+/-</sup> マウスにおいて *Nix* をノックアウトすると、アポトーシスと壊死による細胞死を防ぎ、・細胞容積減少を抑制した。それに伴いインスリン分泌が回復し、最終的に糖尿病が改善した。 *Pdx1*<sup>+/-</sup> マウスでは膵島の・・・細胞局在異常が認められるが、 *Nix* をノックアウトすることで・・・細胞構築も改善した(Fujimoto et al., *J Clin Invest*, 2010)。そこで本研究では、・細胞の *Nix* のシグナル伝達と細胞死の様式を明らかにすることを目的とする着想に至った。

## 2. 研究の目的

糖尿病は、・細胞死による・細胞容積

( $\beta$ -cell mass) の減少が発症の一因だと考えられている。申請者は、 $\beta$ -細胞死にはアポトーシスのみならず壊死とオートファジーも関与することを報告した。さらに、網羅的探索により $\beta$ -細胞で apoptosis と necrosis を負に調節する新規タンパク Nix を同定した。

予備実験において、Protein Kinase C (PKC) が Nix を誘導し $\beta$ -細胞死を引き起こすことが明らかとなった。そこで本研究では、 $\beta$ -細胞の PKC $\cdot$ ・Nix のシグナル伝達と細胞死の様式を明らかにすることで、 $\beta$ -細胞容積の回復と糖尿病の改善を目的とした。「PKC $\cdot$ が $\beta$ -細胞死を誘導する」仮説を証明するものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) PI/DAPI 細胞死アッセイ

MIN6 細胞の培養の最後の 1 時間に、直接 10  $\mu$ g/ml PI と 20  $\mu$ g/ml DAPI を添加した。インキュベーション後、MIN6 細胞を 3 回 PBS で洗浄し 3.7% formaldehyde で 15 分間 4 $^{\circ}$  C で固定。それぞれの条件下において、顕微鏡ランダムフィールドで 600 細胞以上をカウントした。細胞死の比率は、DAPI 陽性細胞当たりの PI 陽性の核数とした。

#### (2) イムノブロット

イムノブロットは抗 cleaved caspase-3 抗体 (catalog no. 9661; Cell Signaling Technologies), 抗 actin 抗体 (catalog no. A-2066; Sigma-Aldrich), Nix (catalog no. ab8399; Abcam Inc.) および抗 PKC $\cdot$  抗体を使用した。

### 4. 研究成果

心筋細胞において Protein Kinase C (PKC) の活性化剤 (ホルボールエステル) の 1 つである Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) が Nix の発現量の増加を介して心筋細胞死を誘導することが報告されている。PKC はその

構造、活性化機構、生理機能によって在来型 (conventional あるいは classical:  $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\gamma$ )、新型 (novel:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ )、非典型 (atypical:  $\zeta$ ,  $\lambda/\iota$ ) の 3 つのサブファミリーに分類される。近年、高血糖状態において PKC $\cdot$  が網膜症と腎症の発症・進展に関与することが明らかになった。そこで申請者の興味を惹いた分子が PKC $\cdot$  である。まず、PKC $\cdot$  をコードするアデノウイルスベクター $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  PKC $\cdot$  $\cdot$  を作製し、PKC $\cdot$  の mRNA とタンパク発現を確認した。インスリン分泌 $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  細胞株において PKC $\cdot$  を過剰発現させるとコントロール ( $\beta$ -gal) と比べて細胞死のマーカーである Propidium Iodide (PI) の取り込みが増加した。よって、PKC $\cdot$  が $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  細胞死を誘導することが示唆された。次に、 $\beta$ -細胞における PKC $\cdot$  と Nix の関係を明らかにする目的で、PKC $\cdot$  を過剰発現した $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  細胞で PKC $\cdot$  のプロモーター活性を検討した。心筋細胞と同様に、 $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  細胞でも PKC $\cdot$  依存性に Nix のプロモーター活性が増加した。以上より、Nix は PKC $\cdot$  依存性に $\beta$ -細胞死を誘導することが強く示唆された。また PKC $\cdot$  を $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  $\cdot$  細胞で過剰発現すると、Nix のタンパク発現量は mRNA と同様に増加し、アポトーシスのマーカーである cleaved caspase-3 が増加した。ただ最近になり、cleaved caspase-3 は壊死でも増加することが判明しているため、cleaved caspase-3 の増加は壊死とアポトーシスの双方を見ているだろう。本結果より、 $\beta$  細胞では PKC $\cdot$  依存性に Nix を介して $\beta$  細胞の壊死とアポトーシスを亢進させることで $\beta$  細胞死を誘導することが示唆された。

糖尿病では脂肪酸の増加を伴うことが多く、臨床的には高脂血症としてとらえられる。そこで、「高血糖と高脂肪酸が $\beta$ -細胞容積の低下に関与する」という、糖脂毒性の分子

機序を検討した。高血糖と高脂肪酸下において、 $\beta$ -細胞死が増加した。大変興味深いことに、 $\beta$ -細胞容積を負に調節する新規タンパク Nix の上流に PKCdelta が存在し、PKCdelta の発現抑制により  $\beta$ -細胞死が抑制された。今後は、Nix や PKCdelta をターゲットとする分子標的薬の開発し、 $\beta$ -細胞容積の回復を目指した新規糖尿病治療の基礎的分子機序が明らかとなった。そして究極的には、糖尿病の治癒と増加する医療費の軽減および患者の生活の質を改善することを目指す。

#### 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 3 件)

1. Hiki Y, Sasaki T, Shimada K, Fujimoto K, Nemoto M, Utsunomiya K. Establishment of a novel transplantation method for murine islets embedded in reconstituted basement membrane matrix. *Jikeikai Med J.* (2012) 127, 49-61. URL: <http://hdl.handle.net/10328/7413> 査読あり
2. Shimada K, Tachibana T, Fujimoto K, Sasaki T, Okabe M. Temporal and spatial cellular distribution of neural crest derivatives and alpha cells during islet development. *Acta Histochem Cytochem.* (2012) 45, 65-75. doi: 10.1267/ahc.11052. 査読あり
3. 山城 健二, 南雲 左江, 池田 梨奈, 藤本 啓, 比企 能人, 五條 淳, 斉藤 隆俊, 宇都宮 一典, 佐々木 敬。レジオネラ肺炎とDKAを契機にMELASの症状が顕在化したミトコンドリア糖尿病の1例。 *糖尿病* (2011) 54, 754. J-GLOBAL ID : 201102276099502717 査読なし

[学会発表] (計 4 件)

1. 川浪 大治, 好川 有希子, 井出 華子, 田中 厚子, 坂本 昌也, 藤本 啓, 宇都宮 一典。2型糖尿病経過中に劇症1型糖尿病様の発症様式を呈し重度の代謝失調を来した1例。593回日本内科学会関東地方会(2012)12月8日、東京
2. Fujimoto K, Nakamura A, Mori Y, Sasaki T, Haruyama Y, Shimada K, Suzuki H, Okabe M, Yokoyama J, Utsunomiya K. Investigation of Hypoglycemia, Hormone Response and Mutation in a Compound Heterozygote for FBP1 Fructose-1,6-bisphatase. 9<sup>th</sup>IDF-WPR / 4<sup>th</sup>AASD (2012) 11月26日、京都
3. 嶋田 耕育, 比企 能人, 藤本 啓, 根本 昌実, 佐々木 敬, 岡部 正隆。神経堤由来細胞と膵内分泌細胞の膵島形成過程における分布  $\alpha$ 細胞と神経堤由来細胞の関係性。第128回成医会総会 (2011) 11月15日、東京
4. 藤本 啓, 佐々木 敬, Polonsky Kenneth, 宇都宮 一典。PKC  $\delta$  は新規タンパク Nix 依存性に膵  $\beta$  細胞死を誘導する。第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (2011) 5月20日、札幌

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ

<http://diabendo.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 啓 (FUJIMOTO KEI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40372974

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし