

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 5 月 21 日現在

機関番号：32620
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791064
 研究課題名（和文）
 妊娠期の膵β細胞増殖におけるセロトニンシグナルの役割の解明
 研究課題名（英文）
 Elucidation of role of the serotonin signal in the pancreatic beta-cell proliferation during pregnancy.
 研究代表者
 豊福 優希子 (TOYOFUKU YUKIKO)
 順天堂大学・医学研究科・研究員
 研究者番号：70598078

研究成果の概要(和文)：本研究は、妊娠期の膵β細胞増殖に、5-HT1b 受容体と SERT を介したセロトニンシグナルの関与について検討することを目的とした。実際、妊娠期における 5-HT1b 受容体と SERT の発現を検討すると、5-HT1b 受容体の発現増加、SERT は安定的発現を認めた。そこで、妊娠マウス母体への antagonist 投与を行ったところ、細胞増殖の割合が減少していることが明らかとなり、5-HT1b と SERT を介したシグナルが妊娠期の膵β細胞増殖に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed for the examination that a serotonin signal through 5-HT1b receptor and SERT participated in for pancreatic beta-cell proliferation during pregnancy. Actually, increased expression of the 5-HT1b receptor and stable expression of SERT were identified when examined expression of 5-HT1b receptor and SERT during pregnancy. Therefore administration the antagonist to a pregnant mouse, it was revealed that a ratio of cell proliferation decreased, and it was suggested that a signal through 5-HT1b and SERT participated in pancreatic beta-cell proliferation during pregnancy.

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・内分泌学

キーワード：妊娠、膵β細胞、細胞増殖、セロトニン

1. 研究開始当初の背景

(1) 妊娠と膵β細胞量調節

膵β細胞は、インスリン抵抗性に対し、細胞機能および細胞容積量を増加させることにより、インスリン分泌量を増加させ、結果として血糖値を正常に保つ機構が備わっている。

インスリン抵抗性は肥満に伴い出現することがよく知られているが、妊娠は最も生理的にインスリン抵抗性が起こる時期と考えられている。この理由として妊娠期には、栄養を母体から胎児へ積極的に供給する必要があるため、同化ホルモンであるインスリン作用を低下させる必要があるためである。

ると考えられている。ただ、妊娠期の母体の血糖恒常性を維持するには、インスリン抵抗性に対抗するために、膵β細胞機能更新が不可欠となる。事実、妊娠期には膵β細胞容積の増加と各膵ラ氏島からのインスリン分泌能が増加していることが知られている。この機構を司っているのが、プロラクチン受容体に結合して作用を発揮するプロラクチン(PRL)や胎盤性ラクトゲン(PL)であると考えられている。特に妊娠期の膵β細胞容積量の劇的な変化を遂げるメカニズムについては、PRLやPLがPRL受容体に結合することにより、Jak2-Stat5経路が活性化し、cyclinなどの細胞増殖因子の転写を増加させる事が報告されている(Sorenson, R. L. et al. Horm Metab Res 29, 301-7, 1997)。さらに、その下流の因子として、がん抑制遺伝子であるMenin(Karnik SK. et al. Science 318(5851):806-9, 2007)やアポトーシスに関与する遺伝子Bcl-XL(Fujiyama Y. et al. J Biol Chem 282(42):30707-17, 2007)の関与が示唆されてきたが、再現性に乏しく、網羅的解析が必要と考えられた。

そこで我々は妊娠期に膵β細胞増殖を引き起こす因子を詳細に解明するための検討を行った。まず、マウス妊娠期における母体の膵β細胞容積量が最大になる時期の特定を行い、その時期は妊娠16.5日目であることを確認した。その上で、膵島の細胞増殖が最も活発になる時期の特定を行い、その時期は妊娠12.5日目であることを明らかにした。そこで妊娠12.5日目のマウスと非妊娠マウスの膵島を単離し、マイクロアレイを用いて発現量の異なる遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、注目したのが、セロトニン合成の律速酵素であるTryptophan Hydroxylase(Tph)であった。その理由は同一の反応を司る2種類の酵素が同様に、妊娠期で爆発的にその発現量が増加していたからである。その発現増加から、膵島内でのセロトニン合成が示唆されたため、妊娠期の母体マウス膵組織をセロトニン抗体を用いて染色したところ、膵β細胞内でセロトニンが合成されていることが明らかとなり、また、ヒトの剖検例でも、妊娠期に膵島内でセロトニンが合成されていることが確認された。さらに、単離培養膵島への刺激実験において、セロトニンが直接、細胞増殖作用を有し、細胞周期に関連する遺伝子の発現増加や細胞増殖抑制因子P21^{cip1}の減少を誘導することが明らかとなった(Kim H, Toyofuku Y. et al. Nat Med. 16(7)804-8. 2010)(Toyofuku Y. et al. unpublished observation)。

(2) 細胞増殖とセロトニンシグナル

セロトニンの受容体は14種類あり(表1)、SERTと呼ばれるセロトニントランスポーターも含めて、細胞により様々なパターンのシグナルが入ることが考えられている。その中で、我々は、すでに5-HT2b受容体が膵ラ氏島で発現増加し、この受容体を介したシグナルが膵β細胞増殖に関わることを報告している。一方で、5-HT2b受容体ノックアウトマウスでも、膵β細胞容積増加機構が完全に消失するわけではないため、他のセロトニンシグナルも膵β細胞容積増加に関わることを想定される。

5-HT1b受容体はSERTと関係してERK1/2を活性化させ、肺動脈血管平滑筋細胞の増殖に関与することが報告されている。また、我々は、非妊娠時と妊娠12.5日目のマイクロアレイのデータの比較で、5-HT1b受容体発現が妊娠期に増加することも確認している。さらに妊娠期間中の変化は認めないものの、膵島にSERTが発現していることも確認している。

表1 セロトニン受容体

受容体の種類	セロトニン受容体
Gi 共役型	5-HT1a, 5-HT1b, 5-HT1d, 5-HT1e, 5-HT1f
Gs 共役型	5-HT4, 5-HT5a, 5-HT5b, 5-HT6, 5-HT7
Gq 共役型	5-HT2a, 5-HT2b, 5-HT2c
イオンチャンネル型	5-HT3

2. 研究の目的

本研究においては妊娠期における膵β細胞増殖のメカニズムを解明することを目的とする。具体的には、下図に示した5-HT1b受容体とSERTを介した膵β細胞増殖メカニズムを解明する。

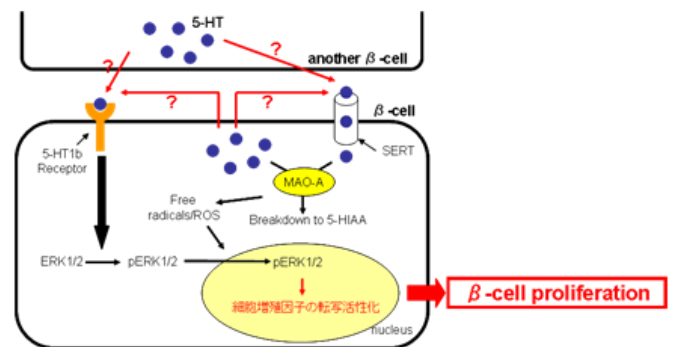


図1: 妊娠期に認められるセロトニンによる膵β細胞容積増加のメカニズム(仮説)

3. 研究の方法

①5-HT受容体およびSERTの遺伝子発現の検討

上述した5-HT受容体、およびSERTが妊娠期間中にどのような発現変化をしているのかを妊娠マウスから単離した膵島を用いて検討を行う。

②5-HT1b 受容体と SERT による膵β細胞容積増加の検討

研究目的で上述したように、妊娠期の膵β細胞増殖において、5-HT1b 受容体による ERK1/2 のリン酸化、SERT シグナルによる pERK1/2 の核内移行という経路が関与する可能性が考えられるため、以下の検討を行う。

1) 5-HT2b 受容体阻害薬の投与実験同様に正常妊娠マウスへの 5-HT1b antagonist (SB224289) およびセロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の投与を行い、5-HT1b、SERT それぞれ、または両方併用した場合の膵β細胞容積量に対する影響の解析、細胞増殖に対する評価

2) 5-HT2b ノックアウトマウスを用いた検討と同様に、5-HT1b ノックアウトマウス、SERT ノックアウトマウス (および可能であればダブルノックアウトマウス) を入手し、全身の遺伝子改変の影響を除くため、各マウスの膵島を単離し、正常妊娠マウスの腎被膜内に移植し、細胞増殖に対する評価、妊娠時の耐糖能を腹腔内ブドウ糖負荷試験 (ipGTT) にて評価する。

3) 上記 1) および 2) の実験で用いた膵島において仮説と同様のシグナルトランスダクションが存在するか否かを検討するため、目的内の図に示すシグナル内の遺伝子発現レベルおよびタンパク発現レベルでの変化を real-time PCR 法および Western blot 法にて検討する。

4) 5-HT1b、または SERT を介した膵β細胞増殖作用の分子生物学的な検討を行うために代表的な膵β細胞系の培養細胞である INS-1 832/13 細胞を用いて、それぞれの遺伝子の過剰発現およびノックダウンを行う。過剰発現は各分子の遺伝子配列を cDNA ライブラリーよりクローニングし、アデノウィルスベクター作製キット (ViraPower™ Adenoviral Promoterless Gateway® Expression Kit; Invitrogen 社) を用いて発現ベクターを作成し、遺伝子導入を行う (Ogihara et al. Endocr J. 2008;55(4):691)。ノックダウンは各分子の遺伝子発現抑制効果を検証済みの既製 SiRNA (Stealth RNAi™; Invitrogen 社) を用いて transfection にて遺伝子導入を行う (Komiya et al. BBRC. 401(4):561-7. 2010)

4. 研究成果

①妊娠期間中における 5-HT1b 受容体、および SERT の発現変化の検討

dpc6.5~dpc16.5 が妊娠期間となるマウスを作成し、妊娠各日齢での妊娠マウスおよび非妊娠マウスから膵島単離を行い、mRNA 抽出、real-time PCR 法を用いて、5-HT1b 受容体、および SERT の遺伝子発現の変化について検討を行った。

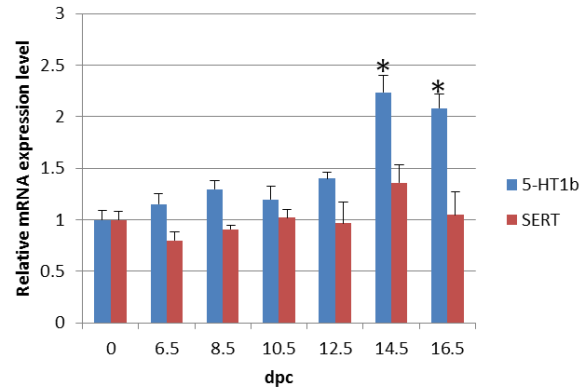


図 2 : 5-HT1b 受容体、SERT の発現変化

その結果を図 2 に示した。Htr1b については dpc14.5 で 16.5 有意に発現が増加しており、それ以前の日程でも多くなる傾向が認められた。また SERT については、有意差は認められないが、妊娠期間中、安定して発現していることが確認された。

②妊娠マウスへの 5-HT1b および SERT の antagonist 投与実験

5-HT1b 受容体と SERT がマウス妊娠期の膵β細胞増殖に影響しているかを確認する為に dpc6.5 から β-cell mass が最大になる直前の dpc15.5 まで投与を行い、β-cell mass が最大となる dpc16.5 で sacrifice、母体膵組織を insulin 抗体で染色することにより、β-cell mass の解析を行った。

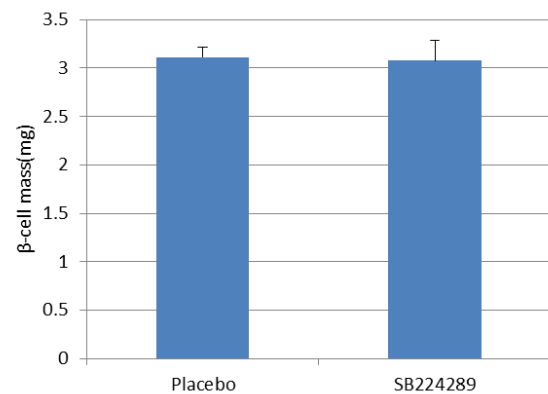


図 3 : SB224289 投与群での β-cell mass

SB224289 を投与した実験群での β-cell mass について検討を行ったところ、図 3 のような結果が得られた。SB224289 投与群と Placebo 群間に有意な差が認められなかった。実際、妊娠時に β-cell mass の増加は WT マウスで認められるものの、最大になる dpc16.5 でも非妊娠時と比較して約 1.2 倍程度の増加しか我々の検討においては認められていない。1.2 倍の増加を antagonist で阻害したとしても、大きな影響が出ないことが考えられた

め、SERT antagonist 投与群については β -cell mass についての検討は行わず、dpc12.5 が最も盛んになり、変化率も約 2.5 倍となる細胞増殖についての検討を行うこととした。この検討では antagonist 投与を dpc6.5 から dpc11.5 に行い dpc12.5 で sacrifice、マウス母体の膵組織を ki67 抗体で染色することによって、細胞増殖の割合の評価を行った。

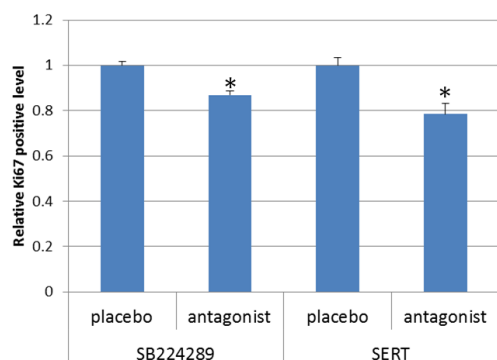


図4：SB224289 および SERT 投与での ki67 発現の変化

SB224289 および SERT を投与したマウスの ki67 解析結果を図4に示した。antagonist 投与を行ったマウスで ki67 の割合が SB224289 投与群および SERT 投与群で 2 割前後減少していることが確認され、仮説に挙げた 5-HT1b と SERT を介したシグナルが妊娠時の膵 β 細胞増殖に関与している可能セリが強く示唆された。

研究方法②の 2)～4)については、マウスでの antagonist 投与データを再現するための islet primary culture の系の立ち上げを行うことを優先したため、検討を行うことができなかった。

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5件)

1. 豊福優希子, 綿田裕孝: 妊娠による膵 β 細胞機能、容積変化のメカニズム. 内分泌・糖尿病・代謝内科, 32:197-203, 2011
2. 綿田裕孝, 豊福優希子, 内田豊義: セロトニンによる妊娠時の膵 β 細胞機能・容積変化のメカニズム. 実験医学, 29:1226-1232, 2011
3. 綿田裕孝, 豊福優希子, 内田豊義: 妊娠に伴う膵 β 細胞増殖のメカニズム. Diabetes Journal: 糖尿病と代謝, 39:193-199, 2011
4. 豊福優希子, 内田豊義, 綿田裕孝: 妊娠時の膵 β 細胞機能における新知見.

Daiabetes Frontier, 23:407-412, 2012

5. 豊福優希子, 内田豊義, 綿田裕孝: 膵 β 細胞の分子増殖: 妊娠時の膵 β 細胞. Islet equality, 1:20-24, 2012

[学会発表] (計1件)

1. 豊福優希子, 内田豊義, 藤谷与士夫, 田蒔基行, 小宮幸次, 河盛隆造, 綿田裕孝: 妊娠期の膵 β 細胞増殖とセロトニン. 第84回日本内分泌学会学術集会口演 2011. 4. 21-23

6. 研究組織

(1)研究代表者

豊福 優希子 (TOYOFUKU YUKIKO)

順天堂大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 70598078