

平成 29 年 4 月 26 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461366

研究課題名(和文) GlucolipotoxicityにおけるPKC 依存性 細胞死

研究課題名(英文) Glucolipotoxicity-induced PKCdelta dependent pancreatic beta cell death

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高グルコースに遊離脂肪酸(FFA)が加わったglucolipotoxicityは膵 細胞機能障害および細胞死を誘導する。高グルコースおよびFFAはPKC を活性化させるが糖尿病におけるPKC の機能は不明である。Glucolipotoxicityモデルマウスにおいて耐糖能と膵 細胞容積が障害された。膵 細胞特異的PKC 欠失は膵 細胞死を抑制し膵 細胞容積および耐糖能を改善した。パルミチン酸はPdx1蛋白発現減少およびMIN6細胞死を誘導したが、PKC 発現抑制により共に改善した。以上よりglucolipotoxicityはPKC -Pdx1経路を介して膵 細胞死を誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glucolipotoxicity, a combination of high glucose and elevated free fatty acids (FFA), induces cell dysfunction and death. High glucose and FFA both activate novel protein kinase c (Pkc), including Pkc . However, the role of Pkc in diabetes remains unclear. Wild-type mice on neonate streptozotocin plus high-fat diet showed impaired glucose tolerance and reduced insulin secretion. Prkcd deficiency in cells improved glucose tolerance and insulin secretion. Prkcd deficiency in cells ameliorated cell mass via reduced cell death. To confirm the mechanisms of PKC in cells, we used MIN6 cells. High glucose and palmitate activated PKC and induced MIN6 cell death. Palmitate reduced Pdx1 protein expression and phosphorylated Pdx1 at T11. PKC deficiency prevented palmitate-induced MIN6 cell death and inhibited Pdx1 protein reduction and phosphorylation. These results suggest that glucolipotoxicity induces cell death via PKC -Pdx1 pathway.

研究分野：糖尿病

キーワード：Beta cell death Glucolipotoxicity Beta cell mass Diabetes

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病はインスリン抵抗性と相対的なインスリン分泌障害によって生じ、膵β細胞容積の低下は相対的なインスリン分泌障害の原因の 1 つである。よって膵β細胞容積を増加させる治療は 2 型糖尿病の治療において有用となりうる。膵β細胞容積の低下は膵β細胞死が主因であり、膵β細胞死の分子機構を明らかにする必要がある。

(1) Glucolipototoxicity は膵β細胞死を誘導する急性的な高グルコース暴露は膵β細胞からのインスリン分泌を亢進する。一方、慢性的な高グルコース暴露は膵β細胞のアポトーシスを惹起し、インスリン分泌障害を誘導する”glucotoxicity”として知られている。急性の遊離脂肪酸(FFA)増加は膵β細胞からのインスリン分泌を亢進し、マウスでは高脂肪食(HFD)開始 7 日目には細胞増殖を介して膵β細胞容積が増加する。一方、慢性的な高 FFA 状態において、FFA は膵β細胞のアポトーシスを誘導し、細胞死が細胞増殖を上回ることによって膵β細胞容積が反転減少し、インスリン分泌を障害する”lipotoxicity”を呈する。近年では、高 FFA が糖尿病に加わることで膵β細胞が障害されインスリン分泌障害を誘導する”glucolipototoxicity”の概念が提唱されているが、その詳細な分子機構は不明である。

(2) PKCδは直接的または間接的に膵β細胞機能に関与する

セリン/スレオニン残基のヒドロキシル基をリン酸化するキナーゼである protein kinase c (PKC)は 3 つのアイソフォームが存在する。Conventional PKC はカルシウムおよび diacylglycerol (DAG)によって活性化され、novel PKC は DAG によってのみ活性化され、atypical PKC はいずれによっても活性化を受けない。novel PKC の 1 つである PKCδは活性化を受けて核内に移行し細胞死に関与するが、糖尿病および膵β細胞における PKCδの役割は不明な点が多い。全身 PKCδノックアウト

マウスはインスリン分泌を障害し耐糖能を悪化させたことを報告したが、一方で全身 PKCδノックアウトマウスにおいて脂肪肝の減少により耐糖能が改善した報告がある。また、膵β細胞において dominant negative PKCδの過剰発現を行ったマウスでは高脂肪食(HFD)によるインスリン分泌を改善した。以上から、糖尿病および膵β細胞における PKCδの役割は未だ議論の余地がある

(3)Pdx1発現低下は膵β細胞死を誘導する

Pancreas duodenum homeobox 1(Pdx1) は膵β細胞の発生・維持に重要な転写因子である。Pdx1^{+/-}マウスに HFD を付加すると高血糖を呈し膵β細胞死および膵β細胞容積が低下した。近年、Pdx1 T11 のリン酸化が Pdx1 を細胞外移行させ、ユビキチン化された Pdx1 が膵β細胞容積低下の誘導に関与することが報告された。しかし、glucolipototoxicity における膵β細胞死の分子機構は不明である。

2. 研究の目的

Glucolipototoxicity における PKCδの分子機構を解明することで、膵β細胞死のメカニズムをより一層明らかにできる。申請者は PKCδ flox マウスを Washington 大学セントルイス校の Gerald W.DornII 教授より分与され保有している。これを用いて膵β細胞特異的 PKCδノックアウト($\beta Prkcd^{-/-}$)マウスを作製する。マウスインスリンノーマ(MIN6)細胞における細胞レベルの検討と併せ、glucolipototoxicity における PKCδ依存性膵β細胞死の分子基盤を細胞および個体レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) パルミチン酸による PKCδ発現の検討

MIN6 細胞に 25 mmol/l glucose 条件下で FFA の 1 つであるパルミチン酸 400 μ mol/l を 72 時間添加した。インキュベーション後、細胞を回収し PKCδ、Pdx1 の蛋白発現およびリ

ン酸化を検討した。PKC δ の細胞内移行を PKC δ 免疫染色および細胞質および核分画の immunoblot で検討した。

(2) AnnexinV/PI 染色による細胞死の検討

パルミチン酸添加後、AnnexinV-FITC および PI 染色を行った。MIN6 細胞死をフローサイトメトリーで検討した。

(3) PKC δ ノックダウンによる検討

レンチウイルスベクターを用いて PKC δ をノックダウンする shPKC δ を作製し、(1)および(2)を検討した。

(4) *in vitro* kinase assay を用いた PKC δ による PDX1 のリン酸化の検討

Human recombinant active PKC δ および human recombinant PDX1 を *in vitro* kinase assay により直接反応させ、PDX1 T11 のリン酸化の有無を検討する。

(5) $\beta Prkcd^{-/-}$ マウスの樹立

膵 β 細胞特異的な遺伝子である Rat insulin promoter 2(RIP2)に cre-recombinase を転写する RIP2-cre マウスと PKC δ flox マウスを交配し、 $\beta Prkcd^{-/-}$ マウスを樹立した。

(6) Glucotoxicity、lipotoxicity および glucolipotoxicity モデルの作製

新生児期に streptozotocin(STZ)を投与する neonatal STZ (nSTZ)モデルは非肥満型 2 型糖尿病の表現型を示す。STZ により破壊された膵 β 細胞容積は一旦改善し、その後緩やかに低下することが推測されており、nSTZ モデルを glucotoxicity モデルとして選択した。8 週齢より野生型マウスに HFD を負荷した (lipotoxicity モデル)。さらに、nSTZ モデルに HFD を負荷したモデルを glucolipotoxicity とし、20 週齢まで体重、随時血糖を検討した。さらに 20 週齢において経腹腔下ブドウ糖負荷試験(ipGTT)、インスリン分泌およびインスリン負荷試験(iTT)を検討した。

(7) 膵 β 細胞面積、膵 β 細胞容積および膵 α/β 細胞構築の検討

20 週齢の各モデルのマウスの膵臓を摘出

し、膵重量を測定した。インスリンおよびグルカゴン染色を用いて膵 β 細胞面積、膵 β 細胞容積、膵 α 細胞面積、膵 α 細胞容積および膵 α/β 細胞構築を検討した。撮影は共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss)を用いて行った。

(8) 膵 β 細胞死および細胞増殖の検討

膵 β 細胞容積の調節は細胞死と細胞増殖で規定される。20 週齢の各モデルのマウス膵切片標本を用いて、terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay で膵 β 細胞死を検討した。さらに膵 β 細胞の細胞増殖を ki-67・インスリン二重染色で検討した。

4 . 研究成果

パルミチン酸添加によって、PKC δ の mRNA および蛋白発現は変化しなかったが、PKC δ のリン酸化が誘導された。さらに PKC δ の核内移行が免疫染色および immunoblot で認められた。よってパルミチン酸により PKC δ の活性化が誘導され核内に移行することが示唆された。

MIN6 細胞死をフローサイトメトリーで検討したところ、パルミチン酸添加により AnnexinV、PI 分画いずれも増加を認め、アポトーシスおよびネクローシスが誘導されていることが示唆された。

さらに PKC δ のノックダウンを行ったところ、アポトーシスは抑制されなかったがネクローシスは抑制された。よって、PKC δ 依存性 MIN6 細胞死はネクローシスを中心として誘導されることが示唆された。

Pdx1 は T11 リン酸化を介して Pdx1 発現が減少し細胞死を誘導する。MIN6 細胞における Pdx1 蛋白の発現を検討したところ、パルミチン酸添加により Pdx1 蛋白発現の減少と Pdx1 T11 リン酸化の増加を認めた。PKC δ のノックダウンをおこなったところ、パルミチン酸添加による Pdx1 T11 リン酸化が減少し Pdx1 蛋白発現の減少を改善した。よって

PKC δ は Pdx1 T11 のリン酸化を介して Pdx1 の発現調節をすることが示唆された。さらに PKC δ が Pdx1 T11 を直接リン酸化するかを *in vitro* kinase assay を用いて検討したが、human recombinant PKC δ は human recombinant PDX1 を直接リン酸化しなかった。よって PKC δ は間接的な経路を介して Pdx1 T11 のリン酸化を制御し Pdx1 の発現調節に関与することが示唆された。以上から、高グルコースおよび FFA による glucolipototoxicity は PKC δ を活性化し、PKC δ -Pdx1 pathway を介して膵 β 細胞死を誘導する。

Glucotoxicity および lipotoxicity モデルマウスを用いた検討では 20 週齢において体重および耐糖能の増悪を認めたが、 $\beta Prkcd^{-/-}$ マウスでは野生型マウスとの差を認めなかった。この結果から、膵 β 細胞の PKC δ 欠失は glucotoxicity および lipotoxicity による耐糖能障害に関与しないことが示唆された。一方、glucolipototoxicity モデルにおいて膵 β 細胞の PKC δ 欠失は体重変化には影響を与えなかった。ipGTT において、glucolipototoxicity モデルの野生型マウスは著明な耐糖能異常を認めしたが、膵 β 細胞の PKC δ 欠失により耐糖能が大きく改善した。グルコース応答性インスリン分泌は glucolipototoxicity モデルにおいて低下したが、膵 β 細胞の PKC δ 欠失により分泌低下は抑制された。一方、インスリン抵抗性は野生型マウスと差を認めなかった。よって、膵 β 細胞の PKC δ 欠失はインスリン分泌を改善することにより耐糖能を改善することが示唆された。

Glucolipototoxicity モデルにおける膵 β 細胞容積および膵島構造を免疫染色で検討したところ、野生型マウス膵島においてインスリン陽性膵 β 細胞は著減し膵島構造は破綻していた。驚くべきことに、膵 β 細胞の PKC δ 欠失により、膵 β 細胞面積、膵 β 細胞容積および膵島構造の改善が認められた。一方、膵重量、膵 α 細胞面積、膵 α 細胞容積は膵 β 細胞の PKC δ

欠失により変化は認めなかった。よって膵 β 細胞容積の調節に膵 β 細胞の PKC δ が関与することが示唆された。TUNEL 染色を用いた細胞死の検討では glucolipototoxicity モデルの野生型マウスにおいて TUNEL 陽性膵 β 細胞数が増加したが、膵 β 細胞の PKC δ 欠失により TUNEL 陽性膵 β 細胞数増加が改善した。細胞増殖は glucolipototoxicity モデルの野生型マウスにおいて減少したが、膵 β 細胞の PKC δ 欠失による差は認めなかった。よって膵 β 細胞における PKC δ は glucolipototoxicity による膵 β 細胞死を負に制御するが細胞増殖には関与しない。以上から、膵 β 細胞における PKC δ 欠失は glucolipototoxicity による膵 β 細胞死の抑制を介して膵 β 細胞容積の減少を改善する。

本研究より、glucolipototoxicity 条件下において PKC δ は PKC δ -Pdx1 経路を介して膵 β 細胞容積調節に関与することが示唆された。今後膵 β 細胞の PKC δ を標的とした分子治療により、脂質異常症を合併した糖尿病における膵 β 細胞容積低下を改善できる可能性が示された。

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 1 件)

1. Tajima N, Noda M, Origasa H, Noto H, Yabe D, Fujita Y, Goto A, Fujimoto K, Sakamoto M, Haneda M. Evidence-based practice guideline for the treatment for diabetes in Japan 2013. *Diabetol Int.* (2015) 6:151-187 (査読あり)
DOI: 10.1007/s13340-015-0206-2

[学会発表] (計 6 件)

1. 塩崎正嗣, 藤本啓, 宇都宮一典. 脂毒性は PKC δ を介して膵 β 細胞死を誘導する. 第58回 日本糖尿病学会年次学術集会,

- 2015年5月22日, 下関
2. Shiozaki M, Fujimoto K, Sasaki T, Yoshida K, Utsunomiya K. PKCdelta is a key regulator of palmitate-induced beta cell death. 51st European association for the study of diabetes, 2015年9月16日, Stockholm (Sweden)
 3. 藤本啓, 吉益忠則, 小峰直彦, 歳側伸一, 小池優, 吉田博. 動脈硬化指数としての中心血圧の有用性. 第19回 適応医学会, 2015年9月13日, 東京
 4. 塩崎正嗣, 藤本啓, 宇都宮一典. 遊離脂肪酸はPKCδを介して膵β細胞死を誘導する. 第29回 糖尿病・肥満動物学会, 2015年5月22日, 下関
 5. 藤本啓, 春山雄史, 佐々木敬, 中村明日香, 鈴木英明, 森豊, 根本昌実, 横山淳一, 岡部正隆, 宇都宮一典. FBP1 遺伝子変異はFBP1 タンパク分解亢進と多量体形成不全を誘導し糖新生を障害する. 第57回 日本糖尿病学会年次学術集会, 2014年5月24日, 大阪
 6. 藤本啓, 大杉満, 柴輝男, 林道夫, 平野勉, 森保道, 宇都宮一典. 2型糖尿病患者におけるシタグリプチンの血糖コントロール目標達成率についての検討. 第52回 日本糖尿病学会関東甲信越地方会, 2014年1月24日, 横浜

〔図書〕(計 7件)

1. 藤本啓. 日本医事新報, β細胞マス温存をめざした治療 [インクレチン関連薬とインスリンの併用が有効], 2016, 4822, 52
2. 藤本啓, 宇都宮一典. 臨床雑誌「内科, 経口薬(最新の新薬: SGLT2 阻害薬), 2015, 115, 593-597
3. 藤本啓, 宇都宮一典. 診断と治療, 2型糖尿病治療薬 オングリザ, 2014, 127, 762-766
4. 藤本啓, 宇都宮一典. 臨床栄養, 糖尿病治療の新薬—ナトリウム共役グルコース

トランスポーター (SGLT)2 阻害薬, 2014, 125, 582-583

5. 藤本啓. プラクティス, 高血糖高浸透圧症候群(HHS)の病態と治療, 2013, 30, 305-310
6. 藤本啓, 宇都宮一典. ここが知りたいインクレチン関連薬, 糖尿病患者におけるインクレチン, DPP-4, グルカゴン, 2013, 34, 41
7. 塩崎正嗣, 藤本啓, 宇都宮一典. ホルモンと臨床, 糖尿病性ケトアシドーシス・高血糖高浸透圧性症候群, 2013, 61, 745-752

〔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〕
ホームページ等
<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・准教授
研究者番号: 40372974
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし
- (4)研究協力者
なし