

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860754

研究課題名(和文) 糖代謝シグナルを介した小胞体ストレス制御による膵 細胞保護機構

研究課題名(英文) Glucokinase Activation Ameliorates ER Stress-Induced Apoptosis in Pancreatic Beta-Cells

研究代表者

白川 純 (SHIRAKAWA, JUN)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：70625532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膵 細胞においてグルコキナーゼ活性化薬(GKA)により発現変化する分子群の機能を、膵島とマクロファージの共培養系および遺伝子欠損マウスを用いて解析した。その結果、グルコキナーゼを介したグルコースシグナルの活性化は、IRS-2を介した抗アポトーシス効果と、IRS-2に非依存的な小胞体ストレス分子の発現制御との2つの異なる経路により、小胞体ストレス誘導性のアポトーシスを抑制することが示した。以上より、膵 細胞においてグルコキナーゼを介したシグナルが、膵 細胞量調節の新たな系路を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glucokinase upregulates insulin receptor substrate 2 (IRS-2) expression in beta-cells, but the role of glucokinase and IRS-2 in ER stress has been unclear. In this study, we investigated the impact of glucokinase activation by glucokinase activator (GKA) on ER stress in beta-cells. GKA administration improved beta-cell apoptosis in Akita mice, a model of ER stress-mediated diabetes. IRS-2-deficient islets were vulnerable, but bIRS-2-Tg islets were resistant to ER stress-induced apoptosis. Meanwhile, GKA regulated the expressions of C/EBP homologous protein (CHOP) and other ER stress-related genes in an IRS-2-independent fashion in islets. GKA suppressed the expressions of CHOP and Bcl2-associated X protein (Bax) and protected against beta-cell apoptosis under ER stress in an ERK1/2-dependent, IRS-2-independent manner. Taken together, GKA ameliorated ER stress-mediated apoptosis by harmonizing IRS-2 upregulation and the IRS-2-independent control of apoptosis in beta-cells.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵 細胞 糖尿病 アポトーシス 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 2型糖尿病の発症・進展において、その発症前から膵β細胞の機能低下に加えて、アポトーシス亢進による膵β細胞量の減少が関与している (Rhodes CJ. Science, 2005)。高血糖や脂肪酸、炎症性サイトカイン、酸化ストレス等により膵β細胞に過剰な負荷がかかり、正常な高次構造に折り畳まれなかったタンパク質 (unfolded protein) が小胞体に蓄積し小胞体ストレスが生じる。小胞体ストレスが過剰になり適応できない状態に陥るとアポトーシスが惹起される。膵β細胞の小胞体ストレスに対して、アポトーシスを抑制し生存へ適応させることは、膵β細胞量低下を防ぎ糖尿病の発症・進展を抑制する治療法となり得る。

(2) グルコキナーゼは、解糖系の律速段階酵素であり、膵β細胞においては糖代謝およびグルコース応答性のインスリン分泌において中心的な役割を果たしている。そのため、グルコキナーゼを特異的に活性化するグルコキナーゼ活性化薬 (GKA) が新規糖尿病治療薬として開発されており、GKA は膵β細胞における糖代謝を促進させ、インスリン分泌の増強や膵β細胞の増殖を引き起こすことが報告されている。一方、膵β細胞におけるグルコキナーゼを介した糖代謝シグナルは、カルシニューリンや CREB を介してインスリンシグナル分子である IRS-2 を発現上昇させ、膵β細胞の増殖を促進させることが明らかになっている。しかし、糖尿病の発症進展に対する膵β細胞への糖代謝シグナル促進の影響はこれまで明らかになっていない。

(3) これまで、膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損マウスにおいて膵β細胞の小胞体ストレスが食事のリノール酸より惹起され、アポトーシスが誘導されることを明らかにしてきた (Shirakawa J. Diabetes, 2011; Shirakawa J. J Biol Chem, 2011; Shirakawa J. Endocrinology, 2012)。これらの研究から膵β細胞のグルコキナーゼが小胞体ストレスの制御に重要な役割を果たしていることが予想された。また、膵β細胞に小胞体ストレスを誘導した時に、インスリンシグナル分子である IRS-2 が一過性に発現上昇することを見出した。これより小胞体ストレス応答においてインスリンシグナル分子である IRS-2 の発現誘導が膵β細胞の生存に関与する可能性が考えられた。しかしこれまで、小胞体ストレスにおける IRS-2 やインスリンシグナルの役割についての報告はほとんどなく、不明な点が多い。

2. 研究の目的

新規糖尿病薬であるグルコキナーゼ活性化薬 (GKA) は、膵β細胞の増殖・生存との関与が示されており、膵β細胞の小胞体ストレスにおいてもグルコキナーゼが関与してい

ることを既に見出しているが、その機序は不明である。そこで、本研究では、膵β細胞において糖代謝シグナルがどのように小胞体ストレスを制御しているのか、その機構を明らかにし、小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制することによる糖尿病の新たな治療法創出に向けた分子基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

研究では、膵β細胞におけるグルコキナーゼを介した糖代謝シグナルによる小胞体ストレス制御機構に関して、次の項目について解析を進める。

(1) Akita マウスは、インスリン 2 の遺伝子異常 (Cys96Tyr) により異常プロインスリンが小胞体に蓄積し、膵β細胞の小胞体ストレスが自然に惹起され、膵β細胞アポトーシスおよび糖尿病発症を呈する糖尿病モデルマウスである。Akita マウスにおいて、糖代謝促進による糖尿病の発症抑制効果と膵β細胞アポトーシスの改善作用を解明する。

(2) グルコキナーゼを介した糖代謝促進により誘導される IRS-2 の膵β細胞小胞体ストレスにおける役割を、Akita マウスおよび、遊離脂肪酸や小胞体の Ca²⁺ポンプである SERCA 阻害薬のタプシガルギンなどで誘導した小胞体ストレス存在下の膵島において解析する。

(3) 膵β細胞のグルコキナーゼを介した糖代謝促進による小胞体ストレス制御における、IRS-2 非依存的経路を単離膵島および Akita マウスにおいて検討する。

(4) 膵β細胞のグルコキナーゼ活性化により発現が変化する新規標的分子を同定し、その小胞体ストレス制御における機能を解析する。

4. 研究成果

(1) 糖代謝促進の膵β細胞小胞体ストレスへの影響を解析するために、インスリン遺伝子 (Ins2) 変異により膵β細胞の小胞体ストレスが誘導され膵β細胞アポトーシスを呈する糖尿病モデルマウスである Akita マウスを用いて解析した。Akita マウスは 2 週間以内にすべてのマウスが随時血糖値 200mg/dL 以上となり糖尿病を発症したが、グルコキナーゼ活性化薬 (GKA) を投与した Akita マウスでは糖尿病発症が抑制された。GKA は Akita マウスの膵β細胞を有意に増加させ、TUNEL 染色にて、GKA は膵β細胞のアポトーシスを有意に抑制することも見出した。

また、膵β細胞特異的グルコキナーゼ欠損マウスと Akita マウスを掛け合わせ、グルコキナーゼ欠損 Akita マウスを作成し解析した結果、このマウスは、Akita マウスと比較して膵β細胞アポトーシスが減少していた。さ

らに、グルコキナーゼ欠損マウスの単離膵島は、薬剤誘導性の小胞体ストレスに脆弱であった。以上のことより、膵β細胞におけるグルコキナーゼを介した糖代謝の促進が、小胞体ストレス誘導性のアポトーシス抑制に重要であることが示唆された。さらに、フロリジン投与により血糖を低下させた時のアポトーシス制御を解析した。フロリジン投与によっても膵β細胞のアポトーシスは改善せず、GKAによる膵β細胞保護効果は血糖降下作用によるものではないことを明らかにした。

(2) 膵β細胞におけるグルコキナーゼを介した糖代謝シグナルは、インスリンシグナル分子である IRS-2 を発現上昇させる。この、IRS-2 の小胞体ストレスにおける役割を解析するために、IRS-2 欠損 Akita マウスおよび膵β細胞特異的 IRS-2 過剰発現 Akita マウスを作製した。Akita マウスと比較して、IRS-2 欠損 Akita マウスは膵β細胞アポトーシスが亢進しており、膵β細胞特異的 IRS-2 過剰発現 Akita マウスは膵β細胞アポトーシスが抑制されていた。また、IRS-2 欠損マウスの単離膵島は、小胞体ストレスに脆弱であり、アポトーシスを誘導する GSK-3β のリン酸化が抑制され、GSK-3β が活性化しており、一方、IRS-2 過剰発現単離膵島は、小胞体ストレス誘導下におけるアポトーシス誘導分子の Bax の発現が抑制されていた。

これらの事より、膵β細胞の糖代謝促進による IRS-2 の発現上昇は、小胞体ストレス誘導性のアポトーシスにおいて保護的に作用していることが明らかとなった。

そこで、IRS-2 による小胞体ストレス制御における細胞内シグナル伝達機構について、IRS-2 欠損単離膵島に飽和脂肪酸やタブシガルギンを添加し、小胞体ストレスを誘導下における、アポトーシス関連蛋白の発現変化、細胞内局在変化、およびリン酸化状態を検証した。その結果、GSK-3β の制御を介した IRS-2 による小胞体ストレス誘導性膵β細胞アポトーシスの制御が明らかとなった。

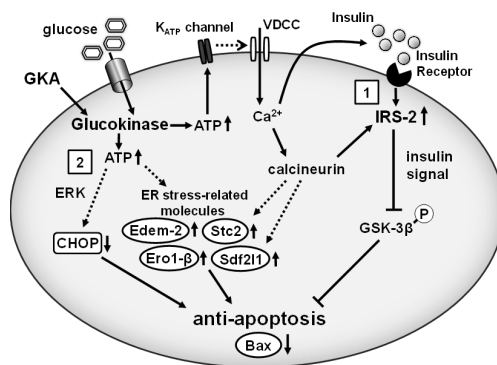
(3) 膵β細胞において糖代謝促進は、IRS-2 を発現上昇させるとともに様々な代謝経路を活性化させる。そこで、膵島において GKA により発現変化する分子群を遺伝子発現マイクロアレイにて解析したところ、GKA による糖代謝促進により発現上昇する 782 遺伝子と発現低下する 488 遺伝子を同定した。興味深いことに、インスリンシグナル関連分子、開口放出調節因子、カルシウムシグナル関連分子とともに、糖代謝促進により一部の細胞内ストレス関連分子群の発現変化を認められた。

次に、糖代謝促進による CHOP の発現抑制、Stc2、Sdf211、Edem2、Ero1-β の発現上昇といった、小胞体ストレス関連分子発現制御を、IRS-2 欠損膵島を用いて検討したところ、GKA による糖代謝促進は IRS-2 非依存的にこれらの小胞体ストレス分子の発現を制御し

ていた。

また、小胞体ストレス存在下の単離膵島においても、GKA による糖代謝促進は CHOP の発現低下等により小胞体ストレスを抑制し、Bax の発現を抑制しアポトーシスを改善することを見出した。これらの小胞体ストレス存在下における、糖代謝促進を介した小胞体ストレス分子の制御も IRS-2 に非依存的であった。

以上のことより、膵β細胞においてグルコキナーゼ活性化による糖代謝の促進は、IRS-2 の発現上昇を介した抗アポトーシス作用と、IRS-2 非依存的経路を介した小胞体ストレス関連分子群の発現制御によるそれとの、2 つの異なる経路があることが示唆された(下図)。



(4) 膵β細胞において GKA により発現変化する分子群のうち、主に中枢神経系のみで報告され、膵β細胞における機能は不明である S100A8、S100A9、Sema3c、Nptx2、Sema5a、Ttyh1、Slpi、Dapl1、Fam46a、Pdyn、Fbln5 等が GKA により膵島において有意に発現変化することを realtime-PCR にて確認した。さらに、これらの機能未知分子群において、小胞体ストレスが亢進している db/db マウスや IRS-2 欠損マウスの単離膵島では、GKA による発現変化が野生型膵島と異なるパターンを示す分子群も同定した。

グルコキナーゼの標的分子である S100A8 および S100A9 は、2 型糖尿病の膵島炎症発症過程において、マクロファージと膵島の相互作用に重要な役割を果たしていることが示された。同じくグルコキナーゼの標的分子として単離した Pdyn と Fbln5 に関して遺伝子欠損マウスを用いた解析を進めている。神経伝達物質の Pdyn は膵β細胞量制御に関与することが明らかになり、細胞外マトリクス関連分子である Fbln5 は膵β細胞での機能だけでなく肝臓でのインスリン抵抗性に関与することを見いだしている。

以上より、膵β細胞においてグルコキナーゼを介したシグナルが、膵島炎症や膵β細胞量調節の新たな系路を制御していることが示唆され、さらに膵β細胞におけるグルコキナーゼの標的分子が肝臓におけるインスリ

ン抵抗性を制御する機構も明らかになりつつある。

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 8 件)

Shirakawa J, Okuyama T, Yoshida E, Shimizu M, Horigome Y, Tuno T, Hayasaka M, Abe S, Fuse M, Togashi Y, Terauchi Y.

Effects of the antitumor drug OSI-906, a dual inhibitor of IGF-1 receptor and insulin receptor, on the glycemic control, β cell functions, and β cell proliferation in male mice.

Endocrinology. 155(6):2102-1120, 2014.

DOI: 10.1210/en.2013-2032 (査読有)

Shirakawa J, Murohashi Y, Okazaki N, Yamazaki S, Tamura T, Okuyama T, Togashi Y, Terauchi Y.

Using miglitol at 30 min before meal is effective in hyperinsulinemic hypoglycemia after a total gastrectomy.

Endocr J. 61(11):1115-23, 2014.

DOI: 10.1507/endocrj.EJ14-0290 (査読有)

Shirakawa J, Terauchi Y.

Selective and sequential loss of transcriptional factors: a hallmark of β cell failure in type 2 diabetes?

J Diabetes Invest. 5(4):359-61, 2014.

DOI: 10.1111/jdi.12212 (査読有)

Togashi Y, **Shirakawa J**, Orime K, Kaji M, Sakamoto E, Tajima K, Inoue H, Nakamura A, Tochino Y, Goshima Y, Shimomura I, Terauchi Y. β cell proliferation after a partial pancreatectomy is independent of IRS-2 in mice.

Endocrinology. 155(5):1643-52, 2014.

DOI: 10.1210/en.2013-1796 (査読有)

Shirakawa J, Togashi Y, Sakamoto E, Kaji M, Tajima K, Orime K, Inoue H, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y.

Glucokinase activation ameliorates ER stress-induced apoptosis in pancreatic β cells.

Diabetes. 62(10):3448-58, 2013.

DOI: 10.2337/db13-0052 (査読有)

Tajima K, Nakamura A, **Shirakawa J**, Togashi Y, Orime K, Sato K, Inoue H, Kaji M, Sakamoto E, Ito Y, Aoki K, Nagashima Y, Atsumi T, Terauchi Y.

Metformin prevents liver tumorigenesis induced by high-fat diet in C57Bl/6 mice.

Am J Physiol Endocrinol Metab.

305(8): E987-98, 2013.

DOI: 10.1152/ajpendo.00133.2013 (査読有)

Orime K, **Shirakawa J**, Togashi Y, Tajima K, Inoue H, Ito Y, Sato K, Nakamura A, Aoki K, Goshima Y, Terauchi Y.

Trefoil factor 2 promotes cell proliferation in pancreatic β cells through CXCR-4-mediated ERK1/2 phosphorylation.

Endocrinology. 154(1):54-64, 2013.

DOI: 10.1210/en.2012-1814 (査読有)

Tajima K, **Shirakawa J**, Togashi Y, Inoue H, Sato K, Orime K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Nakamura A, Aoki K, Goshima Y, Atsumi T, Terauchi Y.

AMPK is involved in the regulation of incretin receptors expression in pancreatic islets under a low glucose concentration.

Plos One. 8(5):e64633, 2013.

DOI: 10.1371/journal.pone.0064633 (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

白川純, 寺内康夫

シンポジウム1 膵 細胞障害と再生

増殖およびアポトーシスの制御による膵

細胞量の調節機構

第 28 回 日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(宮崎) 2014 年 2 月 14 日

白川純, 寺内康夫

ワークショップ 糖尿病・肥満動物に関わる実験のノウハウ

膵島の単離と 細胞の培養法

第 28 回 日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(宮崎) 2014 年 2 月 14 日

Jun Shi rakawa, Kazuki Orime, Yu Togashi, hideaki Inoue, Yasuo Terauchi

Characterization of target genes of glucokinase activator (GKA) in pancreatic islets.

73th American Diabetes Association (ADA) meeting 2013 (Chicago, IL, USA) 2013 年 6 月 24 日

Jun Shi rakawa, Yu Togashi, Kazuki Orime, Kazuki Tajima, Mitsuyo Kaji, Eri Sakamoto, and Yasuo Terauchi

The roles of glucokinase activation and IRS-2 in ER stress-induced apoptosis in pancreatic cells.

第 56 回 日本糖尿病学会年次学術集会(熊本) 2013 年 5 月 16 日

白川純, 井上英明, 田島一樹, 富樫優, 寺内康夫

シンポジウム 膵 細胞研究の進化と展望

増殖およびアポトーシスの制御による膵

細胞量の調節機構

第 56 回 日本糖尿病学会年次学術集会(熊本) 2013 年 5 月 16 日

白川純、富樫優、田島一樹、井上英明、
寺内 康夫
小胞体ストレス存在下の膵 細胞における
グルコースシグナル活性化と IRS-2 の役割
第 85 回 日本内分泌学会年次学術集会（宮
城県仙台）2013 年 4 月 25 日

Jun Shirakawa and Yasuo terauchi
Glucokinase activation ameliorates ER
stress-induced apoptosis in pancreatic
cells.
Beta cell workshop 2013 (京都) 2013 年 4
月 23 日

〔その他〕
ホームページ
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~nai3naib/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

白川 純 (SHIRAKAWA, Jun)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：70625532