

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860698

研究課題名(和文) 膵切除モデルにおける新規膵 細胞増殖機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of pancreatic beta cell proliferation after a pancreatectomy

研究代表者

富樫 優 (TOGASHI, YU)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10710444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵切除後の膵 細胞増殖におけるIRS-2の役割を検討するため、野生型およびIRS-2欠損マウスに膵部分切除を行った。膵切除後IRS-2欠損マウスは高血糖とインスリン分泌障害を認め、高血糖是正によりインスリン分泌能が改善した。一方、単離膵島のインスリン分泌能は高血糖是正の有無に関わらず膵切除IRS-2欠損マウスにおいても障害を認めなかった。さらに、膵切除IRS-2欠損マウスの膵 細胞増殖能は高血糖是正により低下しなかった。以上より、膵部分切除後の膵 細胞増殖はIRS-2を介したインスリンシグナル非依存的であり、高血糖にも依存せず、膵 細胞増殖後のインスリン分泌能は正常に保たれることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated pancreatectomised wild-type and IRS-2-KO mice to clarify the role of IRS-2 in pancreatic beta cells. IRS-2 mice showed hyperglycemia and hypoinsulinemia after a pancreatectomy(Px), and oral administration of hypoglycemic agents improved the insulin secretion. The insulin secretion of isolated islets from Px IRS-2 mice were not impaired regardless of normalization of blood glucose levels. In addition, normalization of hyperglycemia in Px IRS-2 mice did not decrease the beta cell proliferation after a pancreatectomy in IRS-2 mice. These data suggests that the beta cell proliferation after a pancreatectomy is independent of insulin signal mediated IRS-2, or glucose signal, and that the function of regenerative beta cells have normal function.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵 細胞

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は、膵細胞からのインスリン分泌が相対的に不十分な状態を反映している。成体における膵細胞量調節は複製、新生、アポトーシスなどにより制御されているが、2 型糖尿病の発症・進展においては、発症前から膵細胞の機能低下に加えて、量の減少が認められており (Sakuraba H, et al. *Diabetologia*, 2002; Rhodes CJ. *Science*, 2005) 2 型糖尿病発症時には膵細胞量は既に 50% に低下しているとも想定されている。したがって、膵細胞の増殖促進、分化再生促進による膵細胞量増大は糖尿病の根治を目指す有効な治療戦略と考えられる。

膵細胞の主要なインスリン受容体基質である IRS-2 を欠損させたマウスは、成長に伴う膵細胞の増大や高脂肪食負荷に対する膵細胞増殖が障害されることが報告されており (Kubota N, et al. *J. Clin. Invest.*, 2007, Terauchi Y, et al. *J. Clin. Invest.*, 2007) これまでインスリンシグナルは膵細胞量の制御に不可欠であると考えられてきた。しかし、2 型糖尿病患者はすでに慢性的な高血糖、高インスリン血症により、インスリンシグナルは持続的に刺激されているにもかかわらず、2 型糖尿病患者の膵細胞では IRS-2 をはじめとするインスリンシグナル伝達分子群の発現が低下している (Gunton JE, et al. *Cell.*, 2005, Folli F, et al. *PLoS one.*, 2011)。そこで、我々は高血糖や高インスリン血症を伴わず、1~2 週間という短期間で有意な膵細胞の増殖が認められるモデルとして膵切除に注目した。膵部分切除は膵細胞の増殖・分化・再生を促すモデルであり、膵細胞量増大において増殖の寄与が最も大きいと考えられている (Dor Y, et al. *Nature.*, 2004) が、そのメカニズムは明らかになっていない。

まず、我々は膵部分切除における IRS-2 の必要性を IRS-2 欠損マウスを用いて検討した。興味深いことに、IRS-2 欠損マウスは野生型同様に膵切除後膵細胞増殖が認められ、高脂肪食負荷等の既存の経路とは異なり、インスリンシグナル非依存性の膵細胞増殖経路の存在が示唆された。また、cyclin D1、D2 の上昇は認められず、cyclin A、cyclin B1 といった M 期関連分子の活性化が大きな役割を担っている可能性が示唆された。

インスリンシグナル非依存性の膵細胞増殖経路の増強は、膵細胞におけるインスリンシグナルが破綻している 2 型糖尿病患者において、膵細胞量に着目した最適な治療法開発への応用が期待できる。

2. 研究の目的

(1) これまでの野生型マウスは膵切除後に正常血糖を維持する一方、IRS-2 欠損マウスは膵切除後に高血糖を来した。高血糖によるグルコースシグナルの増強は、膵細胞増殖を誘導し、著しい高血糖が膵細胞の機能低

下に関与する。そこで、血糖を正常化した際の IRS-2 欠損マウスの膵細胞を解析することにより、膵切除 IRS-2 欠損マウスの膵細胞増殖能、機能における高血糖の影響について検証し、膵切除後の膵細胞量増加における IRS-2 の必要性について検証する。

(2) 膵切除後の膵細胞増殖に関与する遺伝子群およびシグナルを同定する。

3. 研究の方法

(1) 野生型および IRS-2 欠損マウスにコントロール手術または膵部分切除術を施行し、それぞれの群に対して血糖降下薬カナグリフロジン投与群、非投与群に分け、耐糖能、インスリン分泌能、膵細胞増殖能、単離膵島のインスリン分泌能について解析を行った。

(2) 野生型マウスのコントロール手術群、膵切除群の術後 3 日目の膵島を用いて遺伝子発現マイクロアレイを行い膵切除後の膵細胞で発現が変化する遺伝子群を解析した。GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) により膵切除により変化する遺伝子群を各細胞周期関連遺伝子群および、各シグナル関連遺伝子群との相関について解析した。

4. 研究成果

(1) 膵切除後 IRS-2 欠損マウスは著明な高血糖およびグルコース応答性インスリン分泌の障害を認め、膵切除後の高血糖を是正するとグルコース応答性インスリン分泌能が改善した。一方、単離膵島の生体外におけるグルコース応答性インスリン分泌能は高血糖是正の有無に関わらず膵切除 IRS-2 欠損マウスにおいても明らかな障害を認めなかった。すなわち、膵切除 IRS-2 欠損マウスのインスリン分泌障害は糖毒性によるものであり、正常血糖下ではインスリン分泌能が正常に保たれることが示された。

IRS-2 欠損マウスは膵切除後、野生型と同等に膵細胞量が増加し、膵細胞増殖能の亢進を認めた。さらに、膵切除 IRS-2 欠損マウスの膵細胞増殖能は高血糖の是正により低下しなかった。すなわち、膵切除後の膵細胞増殖は IRS-2 を介したインスリンシグナル非依存的であり、これは膵切除後の血糖上昇に依存しないことが示された。

以上より、膵部分切除後の膵細胞増殖は IRS-2 を介したインスリンシグナル非依存的であり、高血糖によるグルコースシグナルの亢進にも依存せず、再生した膵細胞によりインスリン分泌能は正常に保たれることが示唆された (Togashi Y. et al. *endocrinology*. 2014)。このインスリンシグナル非依存的な膵切除後膵細胞増殖機構を解明することにより、インスリンシグナルの低下した糖尿病患者においても膵細胞

を増やし、インスリン分泌能の回復を見込める治療法へ応用が期待できる。

(2)

遺伝子発現マイクロアレイにより、Pxにより膵島で発現上昇する 1729 遺伝子と発現低下する 972 遺伝子を同定した。また、Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)にて FoxM1 の下流遺伝子群と膵切除後に発現上昇する遺伝子群の相関を確認したところ、有意な相関を認め(p=0.0)、FoxM1 を活性化することが報告されている Melk の発現が膵切除群で 14.2 倍と著明な上昇を認めた。さらに、Melk は膵切除後の膵細胞増殖を欠く、高齢マウスにおいて膵切除後の発現上昇がほとんど認められなかった。このことから、膵切除後の膵島 Bub1 および Melk の発現は、加齢による膵細胞増殖の減弱と関連する可能性が示唆された。

膵切除後の膵島ではマウスの膵細胞増殖に中心的な役割を果たすとされる cyclin D1(1.0 倍)、cyclin D2(0.8 倍)は発現変化せず、cyclin A2(9.6 倍)、cyclin B1(5.5 倍)が発現上昇した。遺伝子発現マイクロアレイで同定された膵切除後の膵島における遺伝子発現変化を、各細胞周期関連遺伝子群との相関について解析し、膵切除後膵島において発現が上昇した遺伝子群は、細胞周期の G1/S 期(p=0.00)のみならず、M 期(p=0.00)とも有意な相関を示した。高脂肪食負荷マウスのマイクロアレイデータと比較したところ、膵切除後膵島において明らかに異なる経路が示唆された。膵切除後の膵細胞増殖は他の膵細胞増殖モデルとは異なる、新たな増殖経路を介してい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 6 件)

1. Togashi Y, Shirakawa J, Okuyama T, Yamazaki S, Kyohara M, Miyazawa A, Suzuki T, Hamada M, Terauchi Y. Evaluation of the appropriateness of using glucometers for measuring the blood glucose levels in mice. *Sci Rep.* 6:25465, 2016.(査読あり)
doi: 10.1038/srep25465.

2. Shirakawa J, Okuyama T, Kyohara M, Yoshida E, Togashi Y, Tajima K, Yamazaki S, Kaji M, Koganei M, Sasaki H, Terauchi Y. DPP-4 inhibition improves early mortality, cell function, and adipose tissue inflammation in db/db mice fed a diet containing sucrose and linoleic acid. *Diabetol Metab Syndr.* 1;8:16, 2016.(査読あり)

doi: 10.1186/s13098-016-0138-4.

3. Orime K, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Inoue H, Nagashima Y, Terauchi Y. Lipid-lowering agents inhibit hepatic steatosis in a non-alcoholic steatohepatitis-derived hepatocellular carcinoma mouse model. *Eur J Pharmacol.* 5;772:22-32, 2016.(査読あり)
doi: 10.1016/j.ejphar.2015.12.043.

4. 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, -Cell Functions, and -Cell Proliferation in Male Mice. *Endocrinology.* 155(6):2102-11, 2014.(査読あり)
doi: 10.1210/en.2013-2032.

5. 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.(査読あり)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/61/11/61_EJ14-0290/_article

6. Togashi Y, Shirakawa J, Orime K, Kaji M, Sakamoto E, Tajima K, Inoue H, Nakamura A, Tochino Y, Goshima Y, Shimomura I, Terauchi Y. -Cell Proliferation After a Partial Pancreatectomy Is Independent of IRS-2 in Mice. *Endocrinology.* 155(5):1643-52, 2014.(査読あり)
doi: 10.1210/en.2013-1796.

[学会発表](計 5 件)

1. 富樫 優、簡易血糖測定器を用いたマウスの血糖測定の評価、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、国立京都国際会館(京都、京都府) 2016 年 5 月 19 日~21 日
2. 富樫 優、膵部分切除マウスによる新規膵細胞増殖シグナルの探索、第 30 回日本糖尿病・肥満動物学会、大宮ソニックシティ(大宮、埼玉県) 2016 年 3 月 10 日~11 日
3. 富樫 優、膵部分切除マウスによる新規膵細胞増殖シグナルの探索、第 85 回日本糖尿病学会年次学術集会、海峡メッセ下関(下関、山口県) 2015 年 5 月 21 日~24 日

4. 富樫 優、膵部分切除モデルにおける膵 細胞量および機能の解析、第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会、京都大学医学部創立百周年記念施設芝蘭会館（京都、京都府）、2015 年 2 月 13 日～14 日
5. 富樫 優、膵部分切除マウスにおける膵 細胞増殖機構の解明、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪国際会議場（大阪、大阪府）、2014 年 5 月 22 日～24 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~nai3naib/wp/research/papers/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富樫 優 (TOGASHI Yu)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10710444

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

寺内 康夫 (TERAUCHI, Yasuo)

白川 純 (SHIRAKAWA, Jun)

田島 一樹 (TAJIMA, Kazuki)

折目 和基 (ORIME, Kazuki)