

清野 進

神戸大学大学院医学研究科・教授

糖代謝恒常性を維持する細胞機能の制御機構

## §1. 研究実施体制

### (1)「清野」グループ

① 研究分担グループ長:清野 進(神戸大学大学院医学研究科、教授)(研究代表者)

#### ② 研究項目

- ・ 研究の総括
- ・ メタボローム解析
- ・ 膵島細胞機能の解析
- ・ 膵島細胞維持機構の解析

### (2)「溝口」グループ

① 研究分担グループ長:溝口 明(三重大学大学院医学系研究科、教授)(主たる共同研究者)

#### ② 研究項目

- ・ 膵島細胞の形態学的解析
- ・ 膵島細胞機能の形態学的解析

### (2)「稲垣」グループ

① 研究分担グループ長:稲垣 暢也(京都大学大学院医学研究科、教授)(主たる共同研究者)

#### ② 研究項目

- ・ 膵島の代謝測定
- ・ 膵島の機能解析

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### 1. 膵島機能の制御機構の解明

インクレチン応答性の膵β細胞株(K8)とインクレチン不応性の膵β細胞株(K20)との包括的比較メタボローム解析から、インクレチン/cAMP シグナル反応性の違いが NADH シヤトルの1つであるリンゴ酸-アスパラギン酸(MA)シヤトルに起因する可能性を見出した。MA シヤトルの阻害薬であるアミノオキシ酢酸(AOA)を添加すると、グルコースによるインスリン分泌には影響しないが、インクレチンによる増強反応がほぼ完全に消失することを発見した。また、MA シヤトルの酵素であるアスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST) 1 および 2、あるいはアスパラギン酸-グルタミン酸輸送担体(aralar1)を shRNA を用いてノックダウンするとインクレチンによるグルコース応答性インスリン分泌の増強効果が強く抑制された。一方、もう1つの NADH シヤトルであるグリセロールリン酸シヤトルの酵素であるグリセロール 3リン酸脱水素酵素(GPD) 1 および 2 のノックダウンではインクレチン作用は影響を受けなかった。これらの結果から、インクレチンによるグルコース応答性インスリン分泌の増強効果には MA シヤトルの活性が必須であることが明らかとなった。さらに、MA シヤトルに関連するインスリン分泌増強シグナル(代謝物)を同定し、その重要性を検証した。

また、インスリン分泌に関与する小胞関連分子 Noc2 のノックアウトマウスのインクレチン分泌細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、野生型マウスではインクレチン(GIP, GLP-1)と Noc2 が共局在し、基底膜側に多く分布する分泌顆粒で共局在していたのに対し、Noc2 ノックアウトマウスではインクレチン分泌顆粒が頂端側にも多く見られた。

これまでの我々のインスリン分泌研究から、グルコース応答性インスリン分泌の一過性の第1相と持続的な第2相はいずれも、主として細胞内に局在する顆粒プールからのインスリン顆粒によって引き起こされる新たなモデルを提唱した(Seino et al., *J Clin Invest* 121:2118-25, 2011)。

### 2. 膵島細胞の再生制御機構の解明

膵β細胞を任意のタイミングで標識できる Ins2-CreER/R26R-YFP ダブルノックインマウスを用いて膵β細胞の運命を追跡、解析した。妊娠マウスにタモキシフェンを投与することによって、仔マウスで約 30%の膵β細胞が標識された。膵β細胞量は出生後 4 週間で約 55 倍に増加し、出生直後から 2 週間では膵β細胞の標識率に有意な変化はなかったが、4 週目の標識率は有意に低下した<sup>1)</sup>。4 週目以降、8 週目まででは標識率の変化はなかった。出生 4 週目では、YFP で標識されない数個から数十個のインスリン陽性細胞で構成されるクラスターが散見された。これらの結果は、出生 2 週から 4 週目までの離乳期に相当する時期には、既存のβ細胞の自己複製だけでなく非β細胞からの新生も寄与することを示している。

さらに、インクレチンシグナルの膵β細胞再生に及ぼす影響についても解析を行った。アロキサンの投与によって膵β細胞を破壊して糖尿病(高血糖)状態にしたマウスに、glucagon-like peptide-1 (GLP-1)受容体作動薬であるリラグルチドを 1 日 1 回 4 週間投与したところ血糖値の

改善が認められた。アロキサン糖尿病マウスでは血清インスリンは検出感度以下まで低下するが、リラグルチドの投与によって明らかな増加を認めた。膵組織の解析から、リラグルチドの投与によって膵β細胞量が増加していることが明らかとなった。この結果から、インクレチンシグナルの活性化が膵β細胞の再生を誘導する可能性が示された。

### 3. 代謝異常と膵島機能異常との関係の解明

膵島細胞の機能障害と膜脂質代謝産物メタボロームとの連関について解析を進める過程で、活性酸素種産生機構の過剰作用との関連<sup>2)</sup>やミトコンドリアリン酸キャリアの担う役割<sup>3)</sup>について検討し、一方では糖代謝異常発症に関与する候補遺伝子の絞込み<sup>4)</sup>を行った。また、飽和脂肪酸(パルミチン酸)負荷による膵β細胞脂肪毒性 *in vitro* モデルについて、最も再現性が高く、脂肪毒性顕著でかつ生理学的にも負荷濃度を逸脱しない条件を確立した。このとき、n-3系多価不飽和脂肪酸(EPA)により飽和脂肪酸負荷による脂肪毒性が一部解除されることを確認し、インスリン分泌量、インスリン含有量などの変化を測定するとともに、RT-PCRにて多価不飽和脂肪酸による脂肪毒性に関与する候補遺伝子を探索した。その中で、一価不飽和脂肪酸(C16およびC18)合成の律速酵素である stearoyl-CoA 不飽和化酵素(stearoyl-CoA desaturase: SCD)を見出した。

また、質量分析計を利用した比較プロテオーム解析の手法を用いて、糖尿病の発症にきわめて密接に関連するインスリン抵抗性を引き起こす因子を探索した。3T3-L1 脂肪細胞を用いて *in vitro* でインスリン抵抗性状態を誘導し、発現量の変化する分子を質量分析計によって解析したところ、プログラニューリン(PGRN)を同定した。PGRN は肥満マウスで血中濃度が高く、インスリン抵抗性改善薬の投与によりその濃度が低下した。一方、PGRN 欠損マウスに高脂肪食を与えてもインスリン抵抗性や肥満を生じないが、健常マウスに PGRN を慢性投与するとインスリン抵抗性が惹起された。これらの結果から、PGRN はインスリン抵抗性や肥満のマーカーとなるだけでなく、インスリン抵抗性を引き起こす原因になっていると考えられた。さらに、PGRN によるインスリン抵抗性には、炎症性アディポカインの1つであるインターロイキン 6 が関与することも明らかにした<sup>5)</sup>。

さらに、糖尿病モデルラットを用いた血液メタボローム解析により糖尿病の超早期診断や病態評価に有用なバイオマーカーの探索を進め、非肥満性 2 型糖尿病モデルである GK ラットおよび SDT ラットを用いた血液メタボローム解析から糖尿病のバイオマーカー候補となり得る代謝物を同定した。さらに、少数のヒトサンプルを用いたパイロット解析を実施し、ヒトにおいてもラットと同様に血液メタボローム解析を行うことが可能であることを確認した。

## §3. 成果発表等

### (3-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Nakamura K, Minami K, Tamura K, Iemoto K, Miki T, and Seino S. Pancreatic  $\beta$ -cells are generated by neogenesis from non- $\beta$ -cells after birth. *Biomed Res* 32:167-174, 2011 (DOI: 10.2220/biomedres.32.167)
2. Mukai E, Fujimoto S, Sato H, Oneyama C, Kominato R, Sato Y, Sasaki M, Nishi Y, Okada M, Inagaki N. Exendin-4 suppresses Src activation and reactive oxygen species production in diabetic GK rat islets in an Epac-dependent manner. *Diabetes* 60:218-226, 2011 (DOI: 10.2337/db10-0021)
3. Nishi Y, Fujimoto S, Sasaki M, Mukai E, Sato H, Sato Y, Tahara Y, Nakamura Y, Inagaki N. Role of mitochondrial phosphate carrier in metabolism-secretion coupling in rat insulinoma cell line INS-1. *Biochem J* 435 : 421-430, 2011 (DOI: 10.1042/BJ20101708)
4. Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Takenaka K, Harada K, Koizumi A, Inagaki N: GCKR mutations in Japanese families with clustered type2 diabetes. *Mol Genet Metab* 102:453-460, 2011 (DOI: 10.1016/j.ymgme.2010.12.009)
5. Matsubara T, Mita A, Minami K, Hosooka T, Kitazawa S, Takahashi K, Tamori Y, Yokoi N, Watanabe M, Matsuo E, Nishimura O, Seino S: PGRN is a key adipokine mediating high-fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. *Cell Metab* 15:38-50, 2012 (DOI: 10.1016/j.cmet.2011.12.002)

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)