

【要約】

Roles of insulin signaling on survival and function of pancreatic β cells

(膵 β 細胞の生存と機能におけるインスリンシグナルの重要性)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻 細胞治療内科学

(主任：横手幸太郎教授)

北本 匠

【背景・目的】

糖尿病は、インスリンの相対的な作用不足による慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患である。その主な病型である2型糖尿病は、インスリン分泌不全あるいは、インスリン作用障害により発症し、これらは遺伝的及び環境的要因による影響を受ける。1999年に米国から発表された2型糖尿病患者のインスリン分泌能及び作用について発症前から経時的に評価を行ったコホート研究により、2型糖尿病患者では、まずインスリン抵抗性が出現し、次いでインスリン分泌能が低下し、高血糖を発症することが示されている。さらに2003年にButlerらは膵β細胞量が境界型糖尿病の状態から健常人に比較し有意に減少していることを示した。すなわち膵β細胞量の減少が、2型糖尿病の病態形成における主要因であることが示唆された。これまで膵β細胞量制御メカニズムを解明するために、いくつもの動物モデルを使って解析された。その結果、マウスの膵臓を90%以上切除した場合や、毒素を用いて直接膵β細胞を破壊した場合に、その直後から残存した膵β細胞が増殖を開始することが明らかとなり、膵β細胞量減少時に生じるその制御機構について多くの知見が明らかにされてきた。そこで私は、過剰な膵β細胞がマウス体内に存在した場合に、マウスの膵β細胞量がどのような制御を受けるのかを明らかにするため、新たな動物モデルを作製した。膵β細胞株であるMIN6細胞を用いて偽膵島を作製し、野生型マウスの腎被膜下に移植 (SRT; Sub-renal transplantation)を行った。偽膵島は移植後、マウス体内で徐々に増殖し、SRTマウスは、約2週間後から進行性に血糖の低下を示した。組織学的検討により、このマウスの膵β細胞量は有意に減少し、アポトーシスを起

こしていることが確認された。本研究は、この新たな実験モデルを用いて膵β細胞量の制御機構の解明を目指した。

【方法】

膵β細胞株である MIN6 細胞を用いて作製した偽膵島を、野生型マウスの腎被膜下あるいは、膵臓内に移植を行い、組織学的検討を行った。また、*in vitro* 実験として、MIN6 細胞を用いて、低血糖・過分極・インスリンシグナル阻害が膵β細胞の生存に与える影響を検討した。膵β細胞特異的に赤色蛍光蛋白 (RFP)を発現するマウスを用いて、移植後の膵β細胞について、運命追跡実験を行った。

【結果・考察】

移植後様々な時期における SRT マウスの膵組織の組織学的検討を行った。その結果、移植後 30 日近く経て、重症低血糖を起こしたマウスの膵島は委縮し、膵β細胞量が減少していることが確認された。さらに、その程度はサンプリング直前 7 日間の血糖値の合計値 (AUC_{Glc}) に比例しており、実際に膵β細胞量を示すインスリン陽性 (INS+)細胞量と AUC_{Glc} は強い相関を示した ($n = 12, r^2 = 0.87$)。このメカニズムを調べるために INS+細胞サイズと TUNEL 染色によるアポトーシスの評価を進めると、前者は AUC_{Glc} と強い相関を示す ($n = 12, r^2 = 0.91$)一方で、後者は AUC_{Glc} が 300 以下となってから急激に TUNEL 陽性細胞率が上昇することが判明した。続いて TUNEL 陽性率が急激に上昇する AUC_{Glc} 300 以下の SRT マウスについて定量的評価を進めたところ、コントロールに比較し (コントロールマウス; $n = 5$, SRT マウス; $n = 5$)、

INS+細胞量は 20%に、INS+細胞サイズは 55%に、TUNEL 陽性率は 15 倍に増加していることが判明した。従って、異所性の過剰な膵 β 細胞は内因性膵 β 細胞量とその生死に大きな影響を与えることが示唆された。

既報では、膵 β 細胞の増殖・生死には細胞外糖濃度、電氣的発火、インスリンシグナルのいずれも重要であることが示されている。重症低血糖を示した SRT マウスは低血糖に暴露され、過分極の状態となり、インスリン分泌を停止していることから Auto/paracrine によるインスリンシグナルの減弱が起こっていると考えられた。そこで、各々が生死に与える影響を明らかにするために、MIN6 細胞に対して、低糖濃度条件 (LG; 1mM glucose DMEM)、あるいはジアゾキサイド (DZ; 200 μ M)、高濃度インスリン(HI; 1000nM)、インスリン受容体特異的チロシンキナーゼ阻害剤である HNMPA(100 μ M)を各々培地に添加した際の生存細胞数を、通常の培養条件 (25mM glucose DMEM)と比較することで、各種条件が生存に与える影響を評価した。その結果、LG ではわずかだが有意に生存細胞数が減少したが {85.8 \pm 21.1 [a.u. (%)], $p<0.01$ }、DZ や HI ではこれらの変化が見られなかった。一方、HNMPA は劇的に生存細胞数を減少させた {21.7% \pm 0.5 [a.u. (%)], $p<0.01$ }。この HNMPA による細胞死誘導効果は MIN6 細胞以外の細胞株 (ミドリザル腎細胞株; COS-1 cells、マウス血管内皮細胞株; MAE cells)ではみられなかった。これらの結果から、インスリンシグナルは、膵 β 細胞特異的に生存に対して重要な役割を担っていることが示唆された。

AUC_{Glc} <300 の SRT マウス体内の膵 β 細胞は、インスリン分泌を停止し、膵 β 細胞周囲のインスリン濃度は低下していると考えられる。その場合、SRT マウス体内の膵 β 細胞に対するインスリンシグナルは減弱し、細胞死が誘導された可能性がある。この仮説を証明するために、MIN6 細胞を腎被膜下の代わりに、膵臓内に直接移植 (IPT; Intra-pancreas transplantation) することで、膵 β 細胞周囲のインスリン濃度を上昇させ、細胞死が減少するのか評価を行った。IPT マウスは SRT マウスと同様の血糖推移を経ることを確認し、同様の検討を行った。予想通り、AUC_{Glc} <300 の状態に至った IPT マウスは、SRT マウスに比較し、アポトーシスを起こしている INS+細胞が有意に少ないことが判明した。しかし INS+細胞量も IPT マウスで有意に減少していた。この原因として、インスリン合成を停止している膵 β 細胞の存在が疑われた。そこで、膵 β 細胞特異的に赤色蛍光タンパクである Tomato を発現させたマウスを用いて運命追跡実験を行った。AUC_{Glc} <300 の SRT マウス、IPT マウスの Tomato 陽性細胞 (Tomato+) を観察した結果、IPT マウスでは、SRT マウスに比較し、INS-/Tomato+細胞が多く観察され、Tomato+細胞量が有意に多く残存していることが確認された。さらに、両モデルマウスの生存している膵 β 細胞である Tomato+細胞は共通して、膵 β 細胞機能に重要な転写因子である MafA の発現は低下し、Pdx1 発現の核外移行が確認された。

最後にこれらの一連の変化の可塑性について評価を行うため、SRT マウスに対して移植腎摘出を行うことで偽膵島を取り除いた。その結果、マウスは一時的に著しい高血糖を示したが、

4 日以内に正常血糖に戻り、この時インスリン、MafA、Pdx1 の発現も正常化していた。さらに膵 β 細胞のサイズは元のサイズに戻り、細胞量も 2 倍に増殖していることが確認された。

【考察・結語】

膵 β 細胞の生存について、 AUC_{Glc} が 300 以下となった時に急激にアポトーシスの増加を認めた一方で、膵 β 細胞量は AUC_{Glc} と強い正の相関を示すことから、膵 β 細胞の生存と細胞量は異なるメカニズムで制御を受けていると考えられた。インスリンシグナル阻害剤による MIN6 細胞特異的な細胞死誘導と、IPT によるアポトーシスが減少したことから、膵島局所のインスリン濃度が膵 β 細胞の生存に極めて重要であることが明らかとなった。膵島局所インスリン濃度が高まることで膵 β 細胞の死は減少するが、代わりに生存した膵 β 細胞はインスリン合成を停止するものと思われた。また、膵島内インスリン濃度によらず、インスリンにより厳密に制御を受ける血糖値と膵 β 細胞量が強い相関を示したことから、膵 β 細胞量の制御には血糖が重要であると考えられた。

従って、インスリンは膵 β 細胞の生存と細胞量の制御において、直接的あるいは間接的に異なる役割を担うと考えられた。