

論文の内容の要旨

論文題目 膵β細胞における Class IA PI3 キナーゼの役割

指導教員 門脇孝教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

金子和真

現代社会が直面している最も大きな問題の一つは糖尿病であり、その患者数は近年著明に増加しており、社会問題としても大きく取り上げられている。

糖尿病は、インスリン作用の不足により生じる慢性の高血糖を主徴とする代謝疾患群と定義される。特に 2 型糖尿病は、末梢臓器のインスリン抵抗性と膵β細胞からのインスリン分泌低下という 2 つの病態によって特徴付けられる。2 型糖尿病における膵β細胞の重要性は 50 年以上前から指摘されており、その病態の解明に重要な課題であると考えられていた。さらには、最近になりヒトの 2 型糖尿病患者の剖検結果から、膵β細胞の量の減少が 2 型糖尿病の病態の悪化に重要な要因であることが改めて示唆された。これらの報告を踏まえると、2 型糖尿病の発症機転では、この末梢のインスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償

性肥大が破綻し、膵β細胞の量や機能が障害され、インスリン抵抗性を代償するに十分なインスリンの分泌ができない状況に陥り2型糖尿病を発症すると考えられている。

この膵β細胞の量や機能の制御には、様々なシグナルが関与していることが報告されている。この中で我々はインスリンシグナルに注目して研究を行ってきた。インスリンシグナルの伝達に極めて重要な役割を担っている分子である、インスリン受容体や、IGF (insulin like growth factor) -1 受容体、IRS (insulin receptor substrate) -2、PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) を膵β細胞特異的に欠損させたマウスでは、膵β細胞の量は減少するとともにその機能も障害されていることが報告されている。これらの解析結果より、膵β細胞の量や機能の維持にはインスリンシグナルが重要な役割を担っていることが示唆されていた。しかしながら、膵β細胞におけるインスリン/IGF-1 シグナルの役割は未だに完全に解明されたとは言えず、まだ多くの課題が残されている。

そこで本研究では、まず遺伝子工学的手法を用いて明らかにされた膵β細胞におけるインスリン/IGF-1 シグナルが膵β細胞の量を制御しているという結果が、実際の2型糖尿病の病態でも同様の役割を果たしているのか、肥満・2型糖尿病病態モデルマウスを用いて検証を行った。

肥満・2型糖尿病病態モデルマウスとしては摂食を制御するホルモンであるレプチンの受容体に変異があるために過食・肥満による糖尿病を呈する *db/db* マウスを用いて検討

を行った。*db/db* マウスの単離臍島より抽出した RNA を用い定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行ったところ、*db/db* マウスにおいてインスリン受容体、IGF-1 受容体、IRS-2、p85 α 、p110 α 等のインスリンシグナル伝達分子の発現は対照群と比較し経時的に減少していることを見いだした。また、10 週齢の *db/db* マウスは既にインスリン分泌が低下し始めており、またリン酸化 Akt の免疫染色による検討でもその染色強度が膵 β 細胞で低下しており、膵 β 細胞におけるインスリン抵抗性の存在も示唆された。これらの所見は、*db/db* マウスの血糖コントロールが著明に悪化し、膵 β 細胞の代償的肥大が破綻すると想定される時期と相関しており、*db/db* マウスの膵 β 細胞の代償性肥大機構の破綻時にはインスリン/IGF-1 受容体シグナルを伝達する Class IA PI3 キナーゼの経路の作用が減弱しており、2 型糖尿病の病態においても膵 β 細胞のインスリンシグナルが膵 β 細胞の量や機能の制御に重要な役割を担っていることが示唆された。

インスリンはインスリン受容体あるいは IGF-1 受容体に結合すると IRS を介しその下流へとシグナルを伝達する。また、IRS の下流では MAP キナーゼ経路と PI3 キナーゼ/Akt 経路に分離するが、インスリン作用の多くは、後者の PI3 キナーゼ/Akt 経路を介して伝達されていることが既に報告されている。そこで、膵 β 細胞において PI3 キナーゼのレベルでシグナルを遮断し膵 β 細胞における PI3 キナーゼの役割を検討するために、私は膵 β 細胞特異的 Class IA PI3 キナーゼ欠損マウス（膵 β 細胞特異的 *pik3r1* 遺伝子欠損マウス、膵 β 細胞特

異的 *pik3r1* 遺伝子欠損および全身の *pik3r2* 遺伝子欠損マウス)を作成し、その解析を行った。

PI3 キナーゼは、特にほ乳類においてその基質特異性や配列の相同性により Class I, II, III に分類され、Class I PI3 キナーゼはその共役する受容体により IA および IB の 2 つのサブクラスに分類される。インスリンシグナルの伝達には Class IA PI3 キナーゼがその役割を担い、インスリン作用の多くを伝達している。Class IA PI3 キナーゼは、調節サブユニットと触媒サブユニットの 2 量体で構成され、調節サブユニットは *pik3r1*, *pik3r2*, *pik3r3* の 3 つの遺伝子によってコードされる。調節サブユニットの中では、*pik3r1* 遺伝子によってコードされる p85 α が約 70%、*pik3r2* 遺伝子によってコードされる p85 β が約 20% とこの両者によってその大部分が占められている。本研究では、組織特異的 *pik3r1* 遺伝子欠損マウス、全身の *pik3r2* 欠損マウス、Rat insulin promoter-Cre transgene 発現マウスを交配し、膵 β 細胞特異的 *pik3r1* 遺伝子欠損 (β Pik3r1KO) マウス、膵 β 細胞特異的 *pik3r1* 欠損および *pik3r2* 欠損 (β DKO) マウスを作成しその解析を行った。

この β Pik3r1KO マウス、 β DKO マウスはインスリン感受性に差を認めないものの、耐糖能障害を呈した。実際にこれらのマウスでは、対照群と比較しグルコース応答性インスリン分泌が低下しており、その原因検索として、まず膵 β 細胞の量について検討を行った。 β Pik3r1KO マウス、 β DKO マウスでは 8 週齢では、膵 β 細胞量に変化を認めないものの、32 週齢では β DKO マウスが Pik3r2KO マウスと比較し有意に膵 β 細胞量が低下して

いた。

8 週齢においてアポトーシスについて TUNEL 染色を用いて検討したところ、 β Pik3r1KO マウス・ β DKO マウスともにその対照群と比較しアポトーシスが亢進していた。8 週齢においては、各遺伝子型において膵 β 細胞量に差が無いにも関わらずアポトーシスが亢進していたために、細胞増殖が亢進していることを疑い BrdU 染色を用いて検討を行った。実際、BrdU 染色による検討では β Pik3r1KO マウス・ β DKO マウスで細胞増殖能が亢進していた。この細胞増殖の亢進については、PI3 キナーゼ/Akt シグナルが遮断されているために、MAP キナーゼシグナルが関与していることが考えられたため、MAP キナーゼシグナルの活性化状態について Erk のリン酸化レベルの検討を行った。Western blot による検討では、リン酸化 Erk が β DKO マウスの膵島で著明に亢進しており、PI3 キナーゼ/Akt シグナルが障害されるために代償的に MAP キナーゼ経路が亢進していることが考えられた。これらの結果から、少なくとも 8 週齢の段階では膵 β 細胞の細胞増殖能が亢進しているためにアポトーシスによる減少代償しており、膵 β 細胞量に変化を認めなかったものと考えられた。また、あらためて膵 β 細胞の PI3 キナーゼ/Akt シグナルは抗アポトーシス作用を介しその量を制御していることが示唆された。

次に、我々は膵 β 細胞の機能について検討を行った。2 光子励起顕微鏡による観察でグルコース刺激による Ca^{2+} 流入のステップが障害、特に膵 β 細胞同士の同期機構が障害

されていることが観察された。膵β細胞同士の同期は、Gap junction を介して制御されていることが報告されているが、β Pik3r1KO マウスおよびβ DKO マウスの単離膵島を用いた定量的 RT-PCR 法による解析では、膵β細胞同士を結合する Gap junction を構成する Connexin36 の発現が低下しており、少なくとも一部はこのために膵β細胞同士の同期障害を生じていることが考えられた。

また、β DKO マウスではグルコース応答性インスリン分泌の特に第一相分泌が障害されていたことから、インスリン顆粒の開口放出機構の障害が存在することが示唆されたが、実際に Caged Ca²⁺刺激によるインスリン開口放出イベントはβ DKO マウスで有意に障害されていた。定量的 RT-PCR 法による観察においてもインスリン顆粒の開口放出機構を制御する SNARE タンパクである Syntaxin1a、SNAP25、VAMP2、Rab27a 等の発現が有意に減少しており、インスリン顆粒の開口放出機構が障害されていることが示唆された。

これらの障害が実際の 2 型糖尿病の発症メカニズムに関与しているかどうかを検討するために、再度肥満・糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスを用いて検討を行ったところ、膵β細胞の同期障害は *db/db* マウスの膵島でも認められ、開口放出機構を制御する SNARE タンパクの発現は、*db/db* マウスの加齢に伴い発現が減少することが確認された。

以上のように、膵β細胞特異的 Class IA PI3 キナーゼ欠損マウスでは、膵β細胞の量および機能に障害が認められ、これらの制御に Class IA PI3 キナーゼが関与している

ことが示唆された。また、膵β細胞の同期障害に関しては *db/db* マウスでも同様の所見が認められること、開口放出機構を制御する SNARE タンパクの発現は 2 型糖尿病患者で有意に低下している報告があることなどから、これらの障害は実際に 2 型糖尿病の発症メカニズムに関与していることが示唆された。

以上より、我々は 2 型糖尿病の病態においてもインスリンシグナルが膵β細胞の量や機能の制御に関与している可能性があること、また膵β細胞における Class IA PI3 キナーゼが、膵β細胞の量や機能の制御に重要な役割を果たしていることを本研究では明らかにした。これらの結果から、膵β細胞における Class IA PI3 キナーゼは 2 型糖尿病の治療あるいは発症予防の新規標的分子となる可能性があることが示唆された。今後、実際に膵β細胞の Class IA PI3 キナーゼを標的とした薬物の開発が望まれる。