

74. PRSS8 によるインスリン分泌制御機構の分子基盤の解明

北村 健一郎

山梨大学 医学部 内科学講座第3教室

Key words: インスリン抵抗性, グルコース応答性インスリン分泌, セリンプロテアーゼ, プロスタシン

緒 言

近年、肥満による2型糖尿病が急速に増加しており、日本のみならず多くの国々、特に先進国において極めて重要な健康課題となっている。高脂肪食を長期的に摂取するとインスリン抵抗性が生じることはよく知られているが、その詳細なメカニズムについては明らかにされていない¹⁻⁶⁾。高脂肪食による2型糖尿病発症の一因として小胞体 (ER) ストレスが注目されている。高脂肪食によって誘導される小胞体ストレスが肥満と2型糖尿病を発症させることがいくつかの遺伝子改変マウスを用いた研究によって示されているが、詳細な分子メカニズムには多くの不明な点が残されている^{7,8)}。また、インスリン抵抗性発症の背景には慢性炎症の病態が存在することが多くの研究によって明らかにされている。慢性炎症はサイトカイン発現を誘導してインスリンの作用を減弱させるのみならず、膵 β 細胞からのインスリン分泌を低下させて相加相乗的に耐糖能異常を悪化させる。

私たちはセリンプロテアーゼのプロスタシンが肝臓において TLR4 を shedding することによってその発現レベルを抑制的に制御すること、そして肥満や高脂肪食負荷による肝臓の ER ストレスがプロスタシンの発現を減少させ、shedding を逃れた TLR4 の発現が増加することによって炎症シグナルを介してインスリン抵抗性を惹起することを世界に先駆けて明らかにした⁹⁾。

プロスタシンは肝臓のみならず、膵臓、甲状腺、唾液腺など多くの内分泌臓器に発現するが、これら内分泌臓器における機能は不明である¹⁰⁾。本研究はプロスタシンの膵 β 細胞における機能を私たちが独自に開発した膵 β 細胞特異的プロスタシン KO マウスを用いて解析し、肝臓におけるインスリン感受性のみならず、膵臓のインスリン分泌におけるプロスタシンの役割を明らかにして、プロスタシンによる糖尿病発症の包括的な分子基盤を解明することを目的とする。

方 法

1. 肝臓特異的プロスタシン過剰発現マウス (Ltg) の作製と表現型の解析

(A) Ltg の作製

マウスアルブミンプロモーター下流にヒトプロスタシン cDNA を挿入したカセットを用いて Ltg を作製した。

(B) Ltg の表現型の解析

6週齢の Ltg に高脂肪食を12週間投与して、経時的に血糖を評価し、18週齢時にグルコース負荷試験を行った。同時に屠殺し、肝臓の中性脂肪含量や病理組織、TLR4 発現を検討した。

2. 膵 β 細胞特異的プロスタシン KO マウス (BKO) の作製と表現型の解析

(A) BKO マウスの作製

プロスタシンの Exon 3~5 を loxP 領域で挟んだ FLOX マウスとラットインスリンプロモーター下に Cre 遺伝子を組み込んだ RIP-Cre マウス (Jackson Laboratory より購入済) を交配し、BKO を作製した。

(B) BKO の表現型の解析

野生型マウスおよび BKO の膵組織を抗プロスタシン抗体で染色し、遺伝子改変を確認した。12週齢の BKO にグルコース負荷試験を行って、血糖値と血中インスリン濃度を測定した。

3. 膵β細胞株 (MIN6) のグルコース応答性インスリン分泌におけるプロスタシンの役割の検討

(A) プロスタシン knockdown 膵β細胞株 (PKD-MIN6) の作製

プロスタシン特異的 shRNA 発現レトロウイルスベクターを用いてマウス由来膵β細胞株 (MIN6) に感染させ、プロスタシン発現を knockdown した MIN6 細胞 (PKD-MIN6) を作製した。

(B) PKD-MIN6 の解析

PKD-MIN6 を用いて、グルコース応答性インスリン分泌能について検討した。グルコース刺激、SU 薬 (グリベンクラミド) 刺激、KCl による脱分極刺激を行い、インスリン分泌を測定した。MIN6 細胞に Fura-2 を load し、グルコース刺激、SU 剤刺激、または KCl 溶液による脱分極刺激下での細胞内 Ca^{2+} 動態を測定した。

結 果

1. 肝臓特異的プロスタシン過剰発現マウス (Ltg) の作製と表現型の解析

(A) Ltg の作製

図 1A に示すように、Ltg の肝臓ではプロスタシンが過剰に発現しており、zymography を用いたプロスタシン活性測定でも強い酵素活性を認めた。

(B) Ltg の表現型の解析

6 週齢の Ltg に高脂肪食を 12 週間投与して経時的に血糖を評価したところ、図 1B に示すように野生型も Ltg も体重は同程度であったが、血糖値は図 1C に示すように野生型では著明な高血糖を呈したが、Ltg では有意に血糖が低かった。18 週齢時にグルコース負荷試験を行ったところ、図 1D に示すように Ltg で有意に高血糖が抑制されていた。

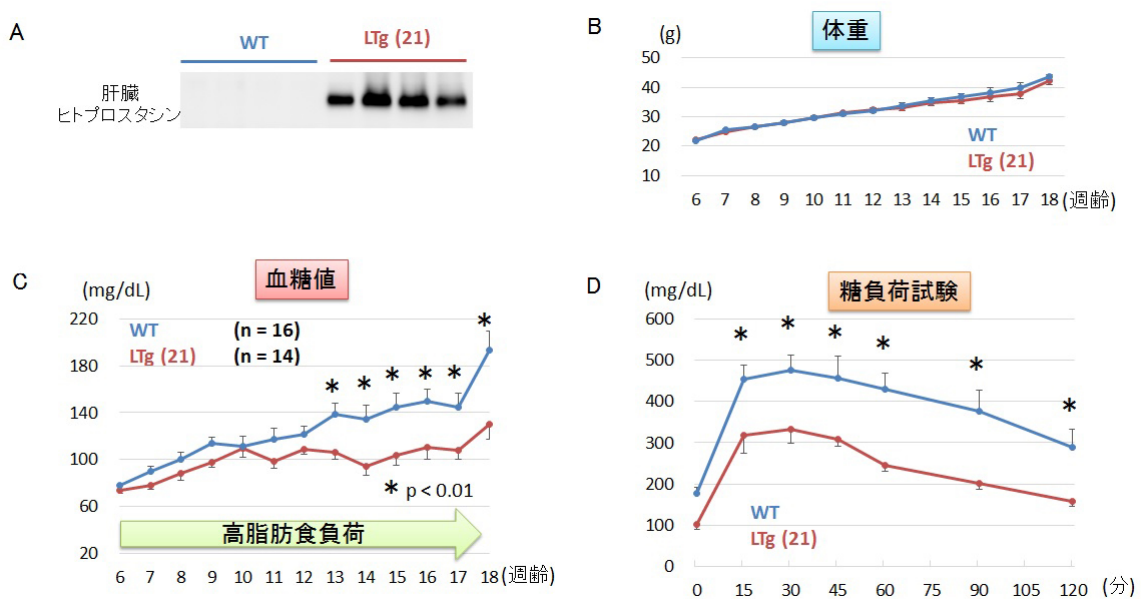


図 1. 肝臓特異的プロスタシン過剰発現マウス (Ltg) の作製と表現型の解析

野生型と Ltg における (A) 肝臓プロスタシン発現、(B) 体重変化、(C) 血糖値推移 (*P < 0.01、t 検定)、(D) 糖負荷試験における血糖値推移 (*P < 0.01、t 検定)。

高脂肪食負荷 12 週後における肝臓の TLR4 発現は Ltg で有意に減少し (図 2A)、Akt のリン酸化レベルは Ltg で有意に増強していた (図 2B)。肝臓の中性脂肪含量は Ltg で有意に減少しており (図 2C)、病理組織においても Ltg では脂肪肝の著明な改善を認めた (図 2D)。

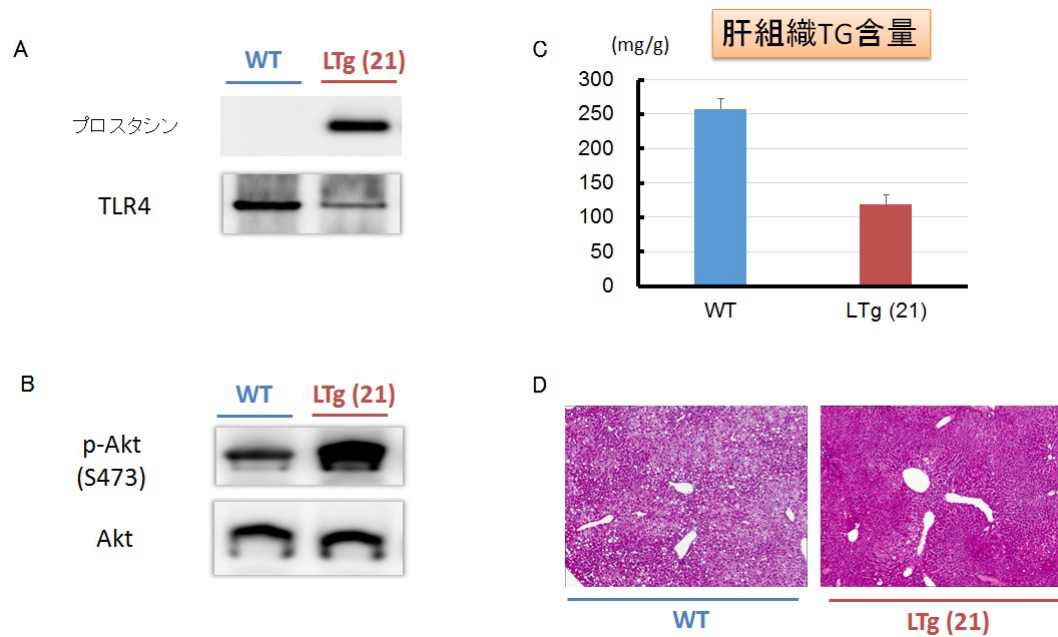


図 2. 肝臓特異的プロスタシン過剰発現マウス (Lt看) の肝臓における表現型

(A) TLR4 発現、(B) インスリン負荷後のリン酸化 Akt 発現、(C) 肝組織 TG 含量 (P < 0.05、t 検定)、(D) 肝組織所見 (HE 染色、× 200)。

2. 膵 β 細胞特異的プロスタシン KO マウス (BKO) の作製と表現型の解析

(A) BKO の作製

BKO の遺伝子欠失を確認するために、野生型と BKO の膵臓を抗プロスタシン抗体で免疫染色したところ、図 3A のようにプロスタシンは膵臓の膵島ならびに腺房細胞に発現していることが明らかとなり、また BKO では膵島におけるプロスタシンの発現のみが欠失していることが示された。

(B) BKO の表現型の解析

通常食で飼育した 12 週齢の BKO にグルコース負荷試験を行って、血糖値を測定したところ、図 3B に示すように BKO において著明な高血糖を認めた。同時に測定した血中インスリン濃度は、野生型と BKO の間に基礎分泌の程度には差がないが、グルコース応答性インスリン分泌に顕著な差を認める結果となった (図 3C)。このことから、BKO においてはグルコース応答性インスリン分泌能の低下による高血糖を生じている可能性が示唆された。

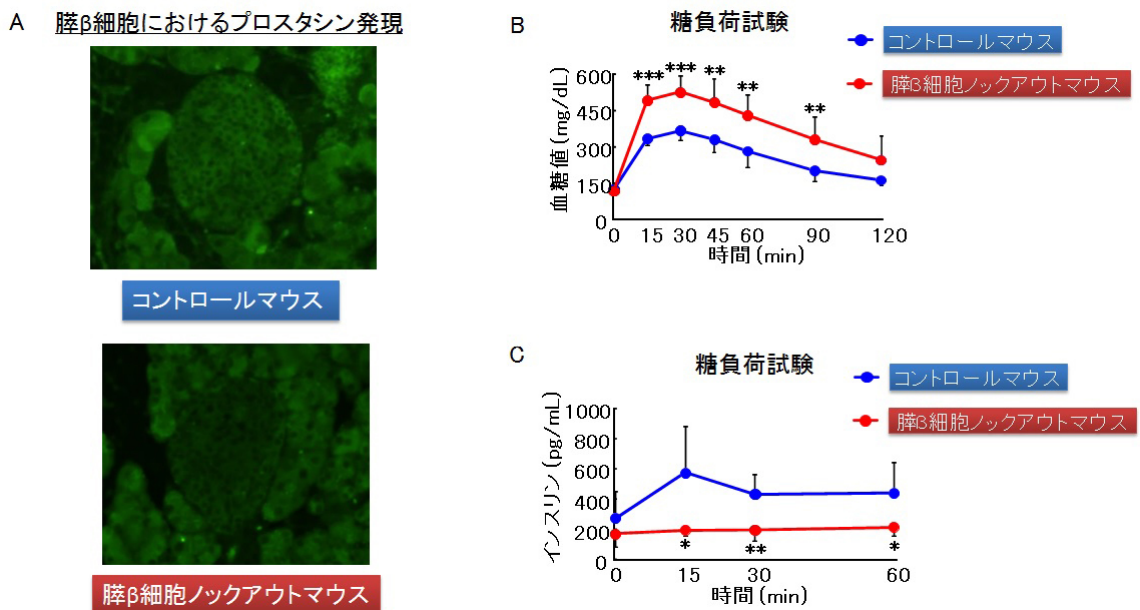


図 3. 膵 β 細胞特異的プロスタシン KO マウス (BKO) の作製と表現型の解析

(A) 野生型と BKO の膵臓におけるプロスタシン発現 (× 400)、野生型マウスと BKO における糖負荷試験時の (B) 血糖値の推移 (**P < 0.01、***P < 0.001、t 検定)、(C) 血中インスリン濃度の推移 (*P < 0.05、**P < 0.01、t 検定)。

3. 膵 β 細胞株 (MIN6) のグルコース応答性インスリン分泌におけるプロスタシンの役割の検討

(A) プロスタシン knockdown 膵 β 細胞株 (PKD-MIN6) の作製

PKD-MIN6 におけるプロスタシンの発現レベルをウエスタンブロットで確認したところ、PKD-MIN6 では 85% のプロスタシン発現低下を認めた (図 4A)。

(B) PKD-MIN6 の解析

PKD-MIN6 を用いて、グルコース応答性インスリン分泌について検討した。高グルコース刺激、SU 薬 (グリベンクラミド) 刺激、KCl による脱分極刺激を行い、インスリン分泌を測定したところ、すべての刺激において PKD-MIN6 ではインスリン分泌が低下していることが判明した。PKD-MIN6 に Fura-2 を load し、グルコース刺激、SU 剤刺激、または KCl 溶液による脱分極刺激下での細胞内 Ca 動態を測定したところ、同様にすべての刺激において PKD-MIN6 では細胞内 Ca 濃度の変化が欠落していた。

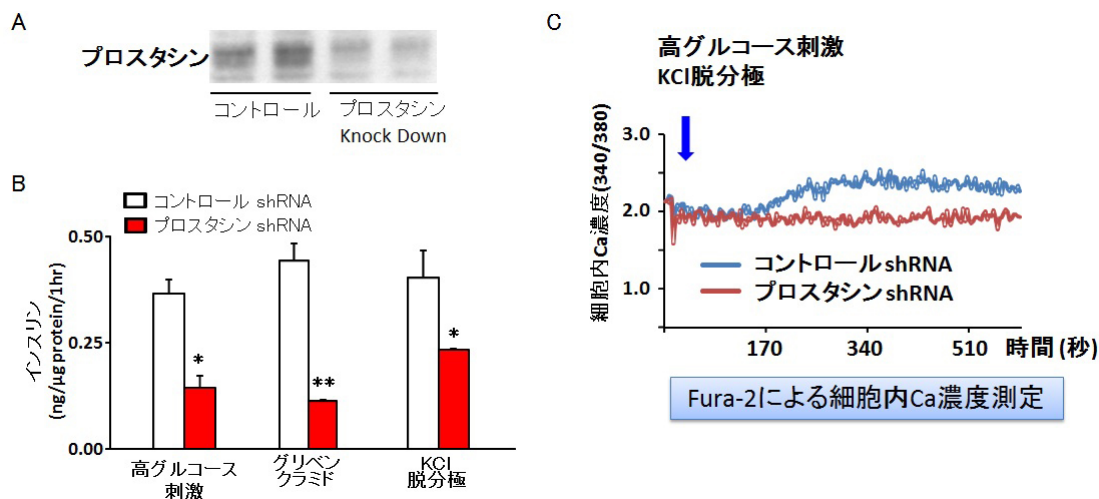


図 4. 膵 β 細胞株 (MIN6) のグルコース応答性インスリン分泌におけるプロスタシンの役割
(A) プロスタシンを knockdown した MIN6 (PKD-MIN6) におけるプロスタシン発現、
(B) PKD-MIN6 における各種刺激下のインスリン分泌 (* $P < 0.05$, t 検定)、(C) PKD-MIN6 における各種刺激下の細胞内 Ca^{2+} 濃度。

考 察

本研究によって、肝臓におけるプロスタシン発現を増強させることが高脂肪食下における耐糖能異常を改善することが明らかとなった。この事実は、私たちが以前に報告した肝臓におけるプロスタシン発現の低下が肝インスリン抵抗性を惹起するという発見を強く裏付ける証拠となった。Ltg では、肝臓における TLR4 の発現が低下しており、そのことが高脂肪食下における肝臓の慢性炎症を抑制し、インスリン感受性の維持につながったことが想定される。肝臓におけるプロスタシン発現を増強する方法を発見できれば、2 型糖尿病の発症を抑える新たな治療法の開発につながることを期待される。

さらに、BKO において著明な高血糖とインスリン分泌能の低下が認められた。糖負荷試験において基礎分泌は保たれていたが、糖負荷によるインスリン分泌の上昇を認めなかったことから、BKO では膵 β 細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌機構のどこかに障害が生じていることが示唆された。マウス由来膵 β 細胞株である MIN6 においてもプロスタシンを knockdown することによってグルコース応答性インスリン分泌が抑制されたことから、プロスタシンのグルコース応答性インスリン分泌への関与が確認された。また、高グルコース刺激、SU 薬、KCl による脱分極刺激のいずれにおいてもインスリン分泌が低下していたことから、脱分極による細胞内 Ca^{2+} 流入以降のメカニズムに異常があることが推測された。細胞内 Ca^{2+} の測定結果もそれを示唆するものであった。現在、プロスタシンの標的となる分子を同定すべく、Silac 法による LC-MS/MS を用いて網羅的に解析している。

これまでその関与がまったく知られていなかったプロスタシンによるインスリン分泌制御メカニズムの一端を明らかにし、糖尿病の発症におけるプロスタシンの関与を明らかにすることができた。今後、本研究のさらなる推進によってインスリン分泌の新たな制御因子が明らかになることが期待される。本研究の継続によってプロスタシンを標的とした新規治療法の開発が可能になるだけでなく、1 型糖尿病の発症メカニズム解明および新規診断法の開発に貢献することも可能となる。

文 献

- 1) Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. Mol Cell. 1999 Oct;4(4):597-609. PMID: 10549291.

- 2) Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y, Ofrecio J, Lin M, Brenner MB, Olefsky JM. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med.* 2012 Sep;18(9):1407-12. PMID: 22863787.
- 3) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med.* 2001 Aug;7(8):941-6. PMID: 11479627.
- 4) Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1111-9. DOI: 10.1172/JCI25102.
- 5) Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1793-801. PMID: 16823477.
- 6) Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab.* 2012 May 2;15(5):635-45. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.001.
- 7) Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):900-17. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.034.
- 8) Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004 Oct 15;306(5695):457-61. PMID: 15486293.
- 9) Uchimura K, Hayata M, Mizumoto T, Miyasato Y, Kakizoe Y, Morinaga J, Onoue T, Yamazoe R, Ueda M, Adachi M, Miyoshi T, Shiraishi N, Ogawa W, Fukuda K, Kondo T, Matsumura T, Araki E, Tomita K, Kitamura K. The serine protease prostaticin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signalling. *Nat Commun.* 2014 Mar 11;5:3428. doi: 10.1038/ncomms4428. DOI: 10.1038/ncomms4428.
- 10) Yu JX, Chao L, Chao J. Prostaticin is a novel human serine proteinase from seminal fluid. Purification, tissue distribution, and localization in prostate gland. *J Biol Chem.* 1994 Jul 22;269(29):18843-8. PMID: 8034638.