



PKC λ regulates glucose-induced insulin secretion through modulation of genes expression in pancreatic β cells

橋本, 尚子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3369

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003369>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 95 】

氏 名・（本 籍） 橋本 尚子 （ 兵庫県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1648号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月25日

【 学位論文題目 】

PKC λ regulates glucose-induced insulin secretion
through modulation of genes expression in
pancreatic β cells

(PKC λ は膵 β 細胞において遺伝子発現の調節を
介してブドウ糖応答性インスリン分泌を制御する)

審 査 委 員

主 査 教 授 山村 博平

教 授 中村 俊一

教 授 横野 浩一

(序文)

2型糖尿病の発症にはインスリン分泌不全とインスリン抵抗性という2つの因子が関与すると考えられているが、最近、2型糖尿病に対するインスリン分泌不全機構解明の研究が再認識されている。これまでに、受容体チロシンキナーゼからのシグナルがβ細胞量やインスリン分泌の制御に関与しているとのデータが報告されている。そのシグナル伝達系路上にある Atypical protein kinase C (PKC) は PI-3 kinase のエフェクター分子であり、インスリン分泌やインスリン合成、β細胞の増殖に関わっている可能性が示唆されているが、その詳細は明らかにはされていない。そこで我々は、β細胞量特異的に Atypical PKC のメンバーである PKC λ 遺伝子を欠損させたマウスを作製し、in vivo でのβ細胞における PKC λ の機能解析を行った。

(実験方法と結果)

膵β細胞特異的 PKC λ 欠損マウスの作成

膵β細胞特異的 PKC λ 遺伝子欠損マウス(KO 群)は、PKC λ 遺伝子のエクソン5の両側に loxP 配列を有するマウスと、インスリンプロモーターにより Cre リコンビナーゼを膵β細胞特異的に発現したトランスジェニックマウスと交配して作成した。対照として、PKC λ 遺伝子両側アレルに loxP 配列を有するマウス(C 群)を実験に供した。膵ラ氏島における PKC λ 蛋白の発現量は、KO 群では C 群に比し、約 20%に低下していたが、他の臓器では両群間で差を認めず、膵β細胞でのみ PKC λ 遺伝子の発現抑制が認められた。Atypical PKC のもう一つのアイソフォームである PKC ζ の膵ラ氏島における発現量は両群間で差がなかった。

膵β細胞特異的 PKC λ 欠損マウスの表現型解析

(1)代謝パラメーター：2ヶ月齢の血糖値、血清インスリン値は両群間で差を認めなかったが、6ヶ月齢では空腹時血糖値は KO 群で有意な低下を認めた。随時摂食時の血糖値、インスリン値に差はみられなかった。

腹空内ブドウ糖負荷試験では、KO 群は負荷後血糖値の有意な上昇と負荷後インスリン値の有意な低下を認めた。インスリン負荷テストでは有意な差は認めなかった。

(2)インスリン分泌能：PKC λ 欠損によるインスリン分泌に対する影響を検討するために、単離膵ラ氏島を用いてブドウ糖、カリウム刺激によるインスリン分泌能を検討した。KO 群は C 群に比し、低濃度ブドウ糖刺激下ではインスリン過分泌を示したが、高濃度ブドウ糖刺激下では逆にインスリン分泌の有意な低下を示した。高濃度カリウム負

荷では有意な差は認められず、PKC λ 欠損によるインスリン分泌不全の原因は膜脱分極以前の機序に関与していると推測され、ブドウ糖刺激に特異的なインスリン分泌が障害されていることが示された。

(3)形態学的解析：次に PKC λ 欠損による形態に対する影響を免疫組織染色法や電子顕微鏡を用いて検討した。膵β細胞面積やインスリン含量は両群間で差を認めなかった。このことから、KO 群で膵β細胞の増殖やインスリン合成能は障害されていないことが示された。電子顕微鏡による観察ではインスリン顆粒や小胞体、細胞極性などのβ細胞の超微細構造には変化はみられなかった。以上の結果より、膵β細胞特異的 PKC λ 欠損マウスにおけるブドウ糖応答性のインスリン分泌不全は細胞構造やインスリン合成の障害によるものではないことが示された。

(4)高脂肪食負荷：高脂肪食負荷により生じたインスリン抵抗性が KO 群のβ細胞機能に与える影響を検討した。離乳後21週間の高脂肪食負荷後の随時血糖値は両群間に差はみられなかったが、インスリン値は KO 群で低下の傾向を示した。腹腔内ブドウ糖負荷により、負荷後血中インスリン値は C 群で著明に上昇したが、KO 群では軽度な上昇に留まり、C 群と比べ有意な差を示した。インスリン抵抗性に対するラ氏島過形成は両群間で差を認めなかった。

これまでの結果から、PKC λ 欠損により膵β細胞の増殖やインスリンの合成には明らかな影響はないが、インスリン分泌障害を示すことが明らかとなった。

膵β細胞特異的 PKC λ 欠損マウスの膵ラ氏島の遺伝子発現解析

以上に述べた表現型の発現機序を検討するために、単離膵ラ氏島を用いて定量的 RT-PCR による解析を行った。KO 群では、C 群と比較し、糖輸送担体2 (GLUT2) や ATP 感受性カリウムチャネルの構成ユニットであるスルホニル尿素受容体1 (SUR1) と内向き整流カリウムチャネル (Kir6.2) の発現が有意に低下しており、KO 群で見られたブドウ糖応答性インスリン分泌障害の一因は、これらのブドウ糖感受性分子の減少によるものであることが示唆された。これに一致して、トルブタミド (ATP 感受性カリウムチャネルを閉じてインスリン分泌を促すスルフォニルウレア剤) 刺激でのインスリン分泌能の減少を KO 群で認めた。また、KO 群では C 群に比し、転写因子 hepatocyt nuclear factor 3 β (HNF3 β) が有意に減少し、ヘキシナーゼ 1 および 2 は有意な上昇を示した。

膵β細胞特異的 PKC λ 欠損マウスの膵ラ氏島への PKC λ の入れ戻し

次に、KO 群から単離したラ氏島に野生型 PKC λ をアデノウイルスベクターにより入れ戻すことにより、KO 群で見られたインスリン分泌と遺伝子発現(HNF3 β , ヘキソキナーゼ 1, Kir6.2)の異常が改善することを確認した。

また、KO 群で見られた表現型発現に HNF3 β が果たす役割を検討した。遺伝子発現と同様に、蛋白レベルにおいても、KO 群で HNF3 β 蛋白の減少を認めた。アデノウイルスベクターにより HNF3 β を C 群とほぼ同程度の蛋白量に戻したラ氏島を用いて分泌実験を行なったところ、高濃度ブドウ糖刺激によるインスリン分泌低下の有意な改善を認め、低濃度ブドウ糖下ではインスリンの過分泌が改善の傾向を認めた。

(考察)

私たちは本研究において、膵 β 細胞特異的 PKC λ 欠損マウスが膵 β 細胞の形態には影響を与えずに、インスリンの基礎分泌の上昇とブドウ糖応答性のインスリン分泌不全を呈することを示した。これまで報告された β 細胞における atypical PKC の機能解析研究では、atypical PKC の阻害剤や抗体を用いたものがほとんどであったが、私たちは Cre-loxP システムを用いて PKC λ を膵 β 細胞において特異的に欠損するマウスを作製し、膵 β 細胞における PKC λ の役割を個体レベルで検討した。

Atypical PKC, PAR-3, PAR6 の複合体は、線虫やショウジョウバエ、哺乳動物の上皮細胞において、細胞の極性に関与しているとの報告があるが、電顕像やカリウム刺激によるインスリン分泌能は両群間で差を認めなかったことより、KO 群の β 細胞は極性やインスリン顆粒の開口分泌に明らかな障害はないと考えられた。PKC λ は細胞増殖や分化、生存に関わる増殖因子シグナルを調節するとの報告もあるが、KO 群では膵 β 細胞量やインスリン含量、アポトーシスには差はみられなかった。

PKC λ の欠損により膵 β 細胞機能に重要とされるいくつかの遺伝子発現の変化を認めた。高親和性ヘキソキナーゼ 1 および 2 の発現上昇は KO 群で見られた低濃度ブドウ糖に対するインスリン過分泌の一因であると考えた。また SUR1 遺伝子欠損マウスでは血糖値低下に伴うインスリン分泌低下が遅れるために空腹時低血糖を生じることが報告されており、我々のマウスも SUR1 遺伝子発現の低下により同様の機序が働いている可能性が考えられた。また、SUR1、Kir6.2 遺伝子の発現低下、および Glut2 発現も低下していることから、高濃度ブドウ糖刺激下でのインスリン分泌低下を示したと考えた。さらに、HNF3 β がヘキソキナーゼ 1, 2 や SUR1、Kir6.2 の発現に関与している報告もあり、HNF3 β の発現低下が PKC λ 遺伝子欠損マウスの表現型発現に重要な役割を果たしている可能性が想定された。遺伝子欠損マウスで低下した HNF3 β 発

現レベルを正常に復するとブドウ糖応答性インスリン分泌の有意な改善を認めたことより、PKC λ は HNF3 β , ヘキソキナーゼ, SUR1, Kir6.2, Glut2 やその他の β 細胞機能に重要な遺伝子発現の調節を介して、ブドウ糖応答性のインスリン分泌を制御していると思われる。

私たちが作成した PKC λ 遺伝子欠損マウスで見られたインスリン基礎分泌の上昇やブドウ糖刺激によるインスリン分泌の低下は 2 型糖尿病に特徴的な所見であり、PKC λ が 2 型糖尿病の成因において重要な役割を果たしている可能性が考えられ、PKC λ を介するシグナルのさらなる解明が、インスリン分泌不全に対する治療応用へつながることが期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1651号	氏 名	橋本 尚子
論文題目	<p>PKCλ regulates glucose-induced insulin secretion through modulation of genes expression in pancreatic β cells</p> <p>PKCλは膵β細胞において遺伝子発現の調節を介してブドウ糖応答性インスリン分泌を制御する</p>		
審査委員	<p>主 査 山 村 隆 平</p> <p>副 査 中 村 俊 一</p> <p>副 査 横 野 浩 一</p>		
審査終了日	平成 17 年 2 月 16 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

糖尿病の大半を占める2型糖尿病の発症にはインスリン分泌不全とインスリン抵抗性という2つの因子が関与すると考えられている。膵臓ラ氏島 β 細胞において、受容体チロシンキナーゼからのシグナルが β 細胞の量やインスリン分泌の制御に関与していると報告されている。そのシグナル伝達経路上にあるAtypical protein kinase C (PKC) はPI-3 kinaseのエフェクター分子であり、インスリン分泌やインスリン合成、 β 細胞の増殖に関わっている可能性が示唆されている。本申請者は、 β 細胞量特異的にAtypical PKCのメンバーであるPKC λ 遺伝子を欠損させたマウス(KO群)を作製し、in vivoでの β 細胞におけるPKC λ の機能解析を行った。
KO群の膵ラ氏島 β 細胞におけるPKC λ 蛋白の発現量は、対象群(C群)に比し、約20%に低下していたが、他の臓器では両群間で差を認めず、膵 β 細胞でのみPKC λ 遺伝子の発現抑制が認められた。
代謝パラメーターは、6ヶ月齢での空腹時血糖値はKO群で有意な低下を認めたが、随時摂食時の血糖値、インスリン値に差はみられなかった。腹腔内ブドウ糖負荷試験では、KO群は負荷後血糖値の有意な上昇と負荷後インスリン値の有意な低下があった。インスリン負荷テストでは有意な差はなかった。
単離膵ラ氏島を用いたブドウ糖によるインスリン分泌能の検討では、KO群はC群に比し、低濃度ブドウ糖刺激下ではインスリン過分泌を示したが、高濃度ブドウ糖刺激下では逆にインスリン分泌の有意な低下を示した。高濃度カリウム負荷では有意な差はなく、PKC λ 欠損によるインスリン分泌不全の原因は膜脱分極以前の機序に関与していると推測され、ブドウ糖刺激に特異的なインスリン分泌が障害されていることが示された。
免疫染色、電子顕微鏡による検討では形態学的変化は認められず、また、膵 β 細胞の増殖やインスリン合成能も正常であった。
高脂肪食負荷により生じたインスリン抵抗性状態では、KO群のインスリン分泌能の低下はより顕著に現れたが、ラ氏島過形成は両群間で差はなかった。
単離膵ラ氏島を用いて定量的RT-PCRによる解析では、KO群は、C群と比較し、糖輸送担体2 (GLUT2) やATP感受性カリウムチャネルの構成ユニットであるスルホニル尿素受容

<p>体1 (SUR1) と内向き整流カリウムチャネル (Kir6.2) の発現が有意に低下しており、KO群で見られたブドウ糖応答性インスリン分泌障害の一因は、これらのブドウ糖感受性分子の減少によるものであることが示唆された。また、KO群ではC群に比し、高親和性ヘキソキナーゼ1および2の有意な上昇が見られ、これが低濃度ブドウ糖に対するインスリン過分泌の一因であると推測している。またSUR1遺伝子欠損マウスでは血糖値低下に伴うインスリン分泌低下が遅れるために空腹時低血糖を生じることが報告されており、申請者のマウスもSUR1遺伝子発現の低下により同様の機序が働いている可能性が考えられた。またKO群では転写因子hepatocyte nuclear factor 3β (HNF3β)の有意な減少を認めており、HNF3βがヘキソキナーゼ1, 2やSUR1、Kir6.2の発現を制御している報告もあり、HNF3βの発現低下がPKCλ遺伝子欠損マウスの表現型発現に重要な役割を果たしていると推測された。</p>
<p>KO群から単離したラ氏島に野生型PKCλをアデノウイルスベクターにより入れ戻すことにより、KO群で見られたインスリン分泌と遺伝子発現(HNF3β, ヘキソキナーゼ1, Kir6.2)の異常が改善することを確認している。</p>
<p>また、HNF3βの果たす役割については、遺伝子欠損マウスで低下したHNF3β発現レベルを正常に回復させるとブドウ糖応答性インスリン分泌の有意な改善を認めたことより、PKCλはHNF3β, ヘキソキナーゼ, SUR1, Kir6.2, Glut2やその他のβ細胞機能に重要な遺伝子発現の調節を介して、ブドウ糖応答性のインスリン分泌の制御を推論している。</p>
<p>申請者が作成したPKCλ遺伝子欠損マウスで見られたインスリン基礎分泌の上昇やブドウ糖刺激によるインスリン分泌の低下は2型糖尿病に特徴的な所見であり、PKCλが2型糖尿病の成因において重要な役割を果たしている可能性を示唆したこれまで報告のない新しい知見であり、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。</p>