

表 題 膵β細胞の内因性機能制御因子としての Nesfatin-1 の役割の解明

論文の区分 博士課程

著 者 名 楊 怡飛

担当指導教員氏名 中條 浩一 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
人間生物学系 専攻
生体制御医学 専攻分野
臓器・システム連関生理学 専攻科

2019年1月10日申請の学位論文

目次

- 1.論文要旨
- 2.研究背景と研究目的
 - 2.1 NUCB2/Nesfatin-1
 - 2.2 NUCB2/Nesfatin-1 の食欲抑制作用
 - 2.3 NUCB2/Nesfatin-1 の血糖維持作用
 - 2.4 膵β細胞のグルコース刺激インスリン分泌 (GSIS) と増殖の機序
 - 2.5 研究目的
- 3.実験材料と実験方法
 - 3.1 膵β細胞特異的 NUCB2/Nesfatin-1 欠損(β NUCB2 KO)マウス
 - 3.2 膵β細胞株 MIN 6 細胞への NUCB2 shRNA 遺伝子投与と培養
 - 3.3 体重と随時血糖の測定
 - 3.4 腹腔内グルコース負荷実験と血漿インスリン濃度の測定
 - 3.5 門脈採血と血中 GLP-1 測定
 - 3.6 マウス膵臓ランゲルハンス島の分離
 - 3.7 インスリン分泌測定
 - 3.8 マウス膵β細胞の単離
 - 3.9 単離細胞質遊離カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の測定
 - 3.10 遺伝子発現解析
 - 3.11 タンパク質の解析
- 4.結果

4.1 膵β細胞特異的 NUCB2/Nesfatin-1 欠損 (βNUCB2 KO) マウス

4.1.1 膵島 NUCB2/Nesfatin-1 の消失

4.1.2 体重低下および随時血糖値・空腹時血糖値の上昇

4.1.3 耐糖能障害、グルコース刺激に対するインスリン分泌の低下

4.1.4 血漿 GLP-1 濃度・膵島グルカゴンの免疫染色

4.1.5 分離膵島におけるグルコース刺激インスリン分泌の低下

4.1.6 単膵β細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) のトルブタミト、アルギニン刺激に対する応答

4.1.7 単膵β細胞 $[Ca^{2+}]_i$ のグルコース刺激に対する応答の低下

4.1.8 βNUCB2 KO マウスにおける小サイズ膵島数の低下

4.2 NUCB2 shRNA を遺伝子導入した (NUCB2 shRNA) MIN6 細胞

4.2.1 NUCB2 タンパク質の発現、グルコース刺激インスリン分泌の低下

4.2.2 UCP-2 mRNA 発現の上昇

4.2.3 PCNA 発現、生細胞数、BrdU の取り込みの低下

4.2.4 IRS-2 mRNA 発現、Akt リン酸化の低下

5. 考察

5.1 研究結果のまとめ

5.2 膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 の役割：糖代謝

5.2.1 血糖とグルコース刺激インスリン分泌の維持

5.2.2 膵β細胞グルコース応答の維持

5.3 膵β細胞内在性 NUCB2/nesfatin-1 の役割：膵β細胞増殖

5.4 今後の課題と臨床応用への可能性

6. おわりに

7. 謝辞

8. 参考文献

1.論文要旨

1. 研究目的

現在、日本ならびに世界において糖尿病患者が増加しており、深刻な健康上の問題となっている。糖尿病の90%以上を2型糖尿病(T2DM)が占めている。T2DMは、インスリンの絶対的あるいは相対的な不足により、慢性的な高血糖を呈する。インスリンの不足は膵β細胞と深く関わっている。膵β細胞は、インスリンを分泌する唯一の細胞であり、インスリンは血糖を低下させる唯一のホルモンである。

膵β細胞においてグルコース刺激インスリン分泌(glucose-stimulated insulin secretion ; GSIS)の機序として、グルコースが細胞内に取り込まれ、解糖系やミトコンドリア代謝によりATPが産生され、ATP/ADP比が上昇する。これによりATP感受性K(K_{ATP})チャネルの開口率が低下する。その結果、細胞膜脱分極が起これ、電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開口し、細胞質内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)が増加する。 $[Ca^{2+}]_i$ 増加によりインスリン顆粒の開口放出が惹起される。

一方、膵β細胞の増殖経路として、膵β細胞膜におけるインスリン受容体(IR)/インスリン様増殖因子受容体(IGF-1R)のチロシン残基IRS-2をリン酸化する。その下流因子Aktのリン酸化が起これ、シグナル伝達され、膵β細胞分化・増殖を刺激する。

Nesfatin-1は、前駆体NEFA/nucleobindin2(NUCB2)のプロセッシングにより作られるN末端の82個アミノ酸のペプチドである。2006年に、Nesfatin-1が摂食抑制作用を持つことが初めて報告された。2009年に、室傍核

parventricular nucleus (PVN)に局在する Nesfatin-1 がオキシトシンを介して摂食を抑制する神経経路が報告された。その後の研究において、Nesfatin-1 の構造はヒトやげっ歯類動物で高度に保存されていること、中枢に加えて末梢組織の胃、十二指腸、脂肪組織、膵β細胞に発現していることが報告された。さらに、Nesfatin-1 の末梢投与はインスリン分泌を促進することが報告された。そこで、膵β細胞から分泌させる Nesfatin-1 は、オートクライン作用で膵β細胞のインスリン分泌、増殖を促進する可能性が示唆される。しかし、膵β細胞内の内在性 NUCB2/Nesfatin-1 の機能は、明らかでない。

そこで本研究は、膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 のインスリン分泌および膵β細胞保護・増殖における役割、および、その膵β細胞内情報伝達系を解明することを目的とする。

2. 研究方法

2.1 膵β細胞において特異的に NUCB2/Nesfatin-1 がノックアウトされたマウス(β NUCB2 KO)を用い、以下の解析を行った。体重、随時血糖値と耐糖能を測定した。膵臓組織を採取しパラフィン切片を作製し、免疫染色を行なった。コラゲナーゼを用いて膵ランゲルハンス島（膵島）を採取し、グルコース刺激によるインスリン分泌量を ELISA kit を用いて測定した。膵島からβ細胞を単離し、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 fura-2 を用い蛍光画像解析により細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定を行い、各種分泌刺激に対する応答を計測した。

2.2 NUCB2 shRNA 発現プラスミドを遺伝子導入し、安定発現した膵β細胞株 MIN6 細胞 (NUCB2 shRNA-MIN6 細胞) を用い、以下の解析を行った。ELISA kit を用いてグルコース刺激によるインスリン分泌量を測定した。リアルタイム

RT-PCR 法と Western Blot 法を行い、インスリン分泌及び細胞増殖に關与する遺伝子とタンパク質の発現をそれぞれ検討した。WST-1 法、BrdU 取り込み、DNA 染色マーカー PCNA の方法を用い、細胞増殖能を検討した。

3. 研究成績

3.1 β NUCB2 KO マウス

β NUCB2 KO マウスは、(1)随時血糖値が上昇し、体重が減少した。(2)グルコース負荷試験における耐糖能が低下した。血漿 GLP-1 濃度の変化がなかった。(3)単離膵島において、低濃度グルコース (2.8 mM) 存在下のインスリン基礎分泌が低下傾向を示し、高濃度グルコース (8.3 mM) 存在下のインスリン分泌が有意に抑制された。(4)単離 β 細胞における、高濃度グルコース (8.3 mM) 刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ 増加が抑制された。一方、トルブタミド、アルギニン刺激 (2.8 mM グルコース存在下) に対する $[Ca^{2+}]_i$ 増加は変化しなかった。

3.2 NUCB2 shRNA-MIN6 細胞

NUCB2 shRNA-MIN6 細胞では、(1)高濃度グルコース (16.6 mM) 刺激下のインスリン分泌が有意に抑制された。(2)UCP-2 mRNA の発現が増加した。IRS-2 mRNA、リン酸化 Akt の発現が低下した。(3)生細胞数、DNA 合成が減少し、PCNA 蛍光染色が抑制された。

4. 考察

インスリン分泌：

β NUCB2 KO マウスは、随時血糖値の増加および耐糖能障害が示したことから、膵 β 細胞内在性 Nesfatin-1 には血糖を維持する機能があることが示唆される。次に、 β NUCB2 KO マウス膵島と NUCB2 shRNA-MIN6 細胞は、高グル

コース刺激によるインスリン分泌が低下したことから、膵β細胞内在性 Nesfatin-1 は膵β細胞からのインスリン分泌を維持することが示唆される。また、βNUCB2 KO マウスの単離β細胞[Ca²⁺]_iの各種分泌刺激応答のうち、高グルコースに対する応答が障害されていた。一方、トルブタミト、アルギニンに対する反応は正常であったことから、脱分極応答、K_{ATP} チャンネル自身は正常であることが考えられる。以上の結果から、内在性 Nesfatin-1 は、脱分極よりも上位のグルコース代謝の過程・分子に障害があると示唆される。候補分子として、グルコーストランスポータ 2 (GLUT2)、グルコースリン酸化酵素 glucokinase およびグルコース 6-リン酸 (G6P) 酵素が挙げられる。一方、NUCB2 shRNA-MIN6 細胞において、ATP 産生を低下させる UCP-2 mRNA の発現が増加したことから、膵β細胞内在性 Nesfatin-1 は細胞内 ATP 産生を維持する機能を持つ可能性がある。

膵β細胞の再生・増殖：

NUCB2 shRNA-MIN6 細胞において、細胞増殖マーカーが低下することから、内在性 NUCB2/Nesfatin-1 には膵β細胞増殖を維持する機能が示唆される。さらに IRS-2 mRNA の発現および下流因子 Akt のリン酸化が抑制されることから、膵β細胞内在性 Nesfatin-1 はインスリンシグナル伝達経路を維持していることが示唆される。

5. 結論

本研究では、膵β細胞内在性 NUCB2/nesfatin-1 はインスリン分泌を維持する機能と細胞増殖を維持する機能を持つことを明らかにした。また、膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 は、インスリンシグナル伝達を維持・促進することによ

り、膵β細胞の増殖に関わることを示した。

本研究の結果は、膵β細胞内在性 NUCB2/nesfatin-1 を分子標的としてインスリン分泌促進および膵β細胞増殖を促進する、新規糖尿病治療薬開発の基盤となる可能性がある。今後、膵β細胞内在性 NUCB2/nesfatin-1 発現と膵β細胞増殖の因果関係の検証が重要な課題である。

2.研究背景と研究目的

2.1 NUCB2/Nesfatin-1

Nucleobindin-2 (NUCB2) は、マウスにおいて 14 個のエキソンから転写される 1,697 bp の mRNA で、420 アミノ酸に翻訳される。NUCB2 は、Nesfatin-1、Nesfatin-2、Nesfatin-3 に切断される (図 1) [1]。NUCB2 から由来する 82 アミノ酸のペプチド Nesfatin-1 には摂食、循環をはじめとしていくつかの生物学的な作用が認められている[2,3]。一方、Nesfatin-2 と Nesfatin-3 については明確な作用は報告されていない[4,5]。

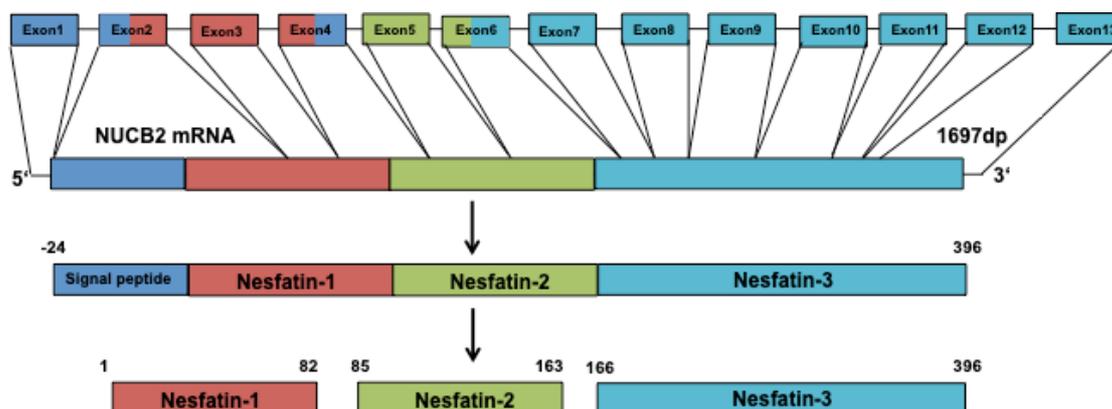


図 1 Nucleobindin-2 遺伝子、転写産物およびタンパク質

2.2 NUCB2/Nesfatin-1 の食欲抑制作用

2006年に、Nesfatin-1は、視床下部における摂食抑制因子として報告された。すなわち、Nesfatin-1を脳室内 (i.c.v.) 投与すると、マウスは用量依存的に摂食量と体重が減少した。一方 Nesfatin-1 中和抗体を i.c.v.投与すると、マウスの食欲が亢進した[1]。2009年に、我々の研究室では Nesfatin-1 が室傍核 (PVN)

のオキシトシン(Oxt)ニューロンの活性化と分泌を促進し、摂食を抑制することを明らかにした[6]。さらに PVN の NUCB2/Nesfatin-1 は、レプチンの食欲抑制作用を仲介している [7]。Nesfatin-1 は強力な満腹信号であり、肥満治療への臨床応用の可能性がある[1,4,8,9,10,11,12,13]。

2.3 NUCB2/Nesfatin-1 の血糖維持作用

血糖値を調節する最も重要なホルモンは、膵β細胞から分泌されるインスリンである。糖尿病のうち2型糖尿病 (T2DM) が主要な部分を占めており、その成因は膵β細胞からのインスリン分泌障害およびインスリンの標的組織におけるインスリン抵抗性である。

Nesfatin-1は、BMIと血漿インスリン濃度とインスリン抵抗性に関連している[9,14,15,16,17,18]。視床下部のNesfatin-1は肝インスリン感受性を増加させる[19,20]。そして、Nesfatin-1を高血糖db/dbマウスに静注すると、血糖値が有意に低下した[21]。さらに、Nesfatin-1はグルコース誘発インスリン分泌 (GSIS) を促進するので、糖尿病肥満治療への臨床応用の可能性がある[22,23]。

2.4 膵β細胞のグルコース刺激インスリン分泌 (GSIS) と増殖の機序

血中のグルコースはグルコース輸送体 2 (GLUT2) を介して膵β細胞に取り込まれ、解糖系および Krebs 回路で NADH、FADH₂ などの還元物質に代謝され、電子伝達系を経て ATP に代謝されるので、ATP/ADP 比が上昇する。その結果、ATP 感受性カリウム(K_{ATP})チャネルの開口率が低下することによって、細胞膜の脱分極が起り電位依存型 Ca²⁺チャネルを通して細胞外 Ca²⁺が流入し、イン

スリンが放出される（図 2）。さらに、インクレチンの GLP-1 は膵β細胞膜の受容体を刺激すると、細胞内のサイクリック adenosine monophosphate(cAMP) 濃度の上昇を介して GSIS を増強する。膵β細胞では、インスリンはインスリン受容体基質 2(IRS-2)タンパクのリン酸化を促進する [24]。その結果、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ(PI3K)が細胞膜へ移動すると、PDK1 と Akt のリン酸化を介してβ細胞が分化・増殖する（図 3）。

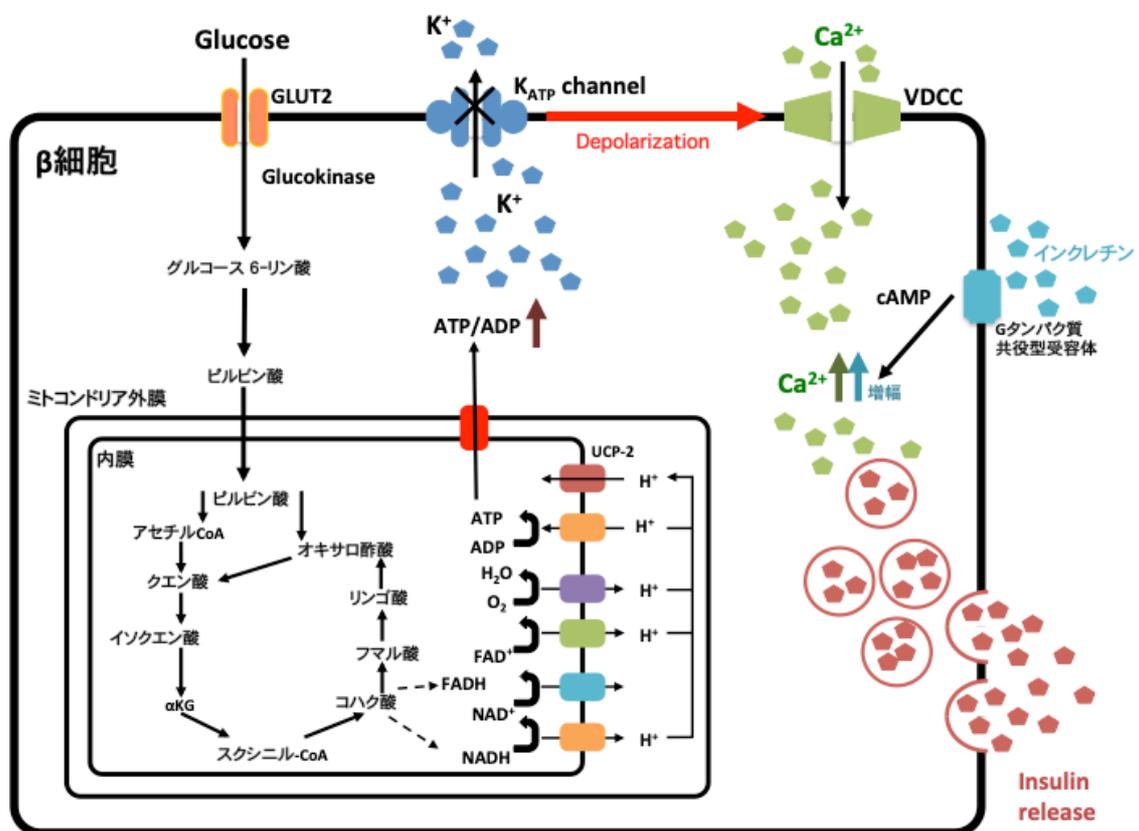


図 2 インスリン分泌の基礎となる β細胞代謝経路

GLUT2, glucose transporter 2; VDCC, voltage-dependent calcium channel; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; UCP-2, uncoupling protein 2

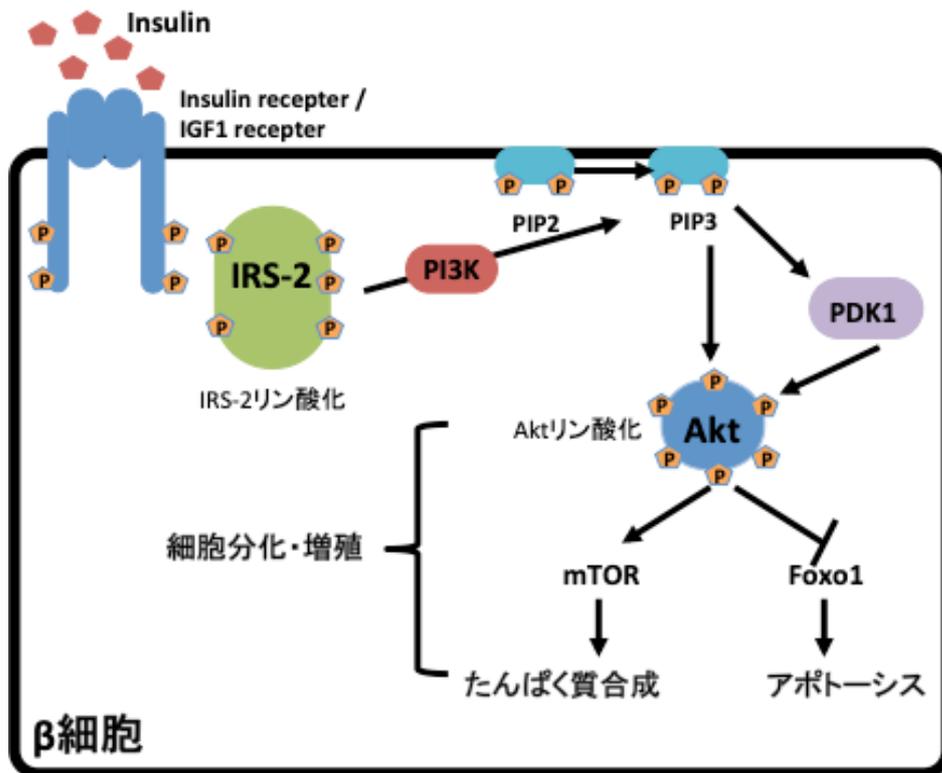


図 3 膵臓β細胞インスリンシグナル伝達増殖経路

IRS-2, insulin receptor substrate 2; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP₃, phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphate; PDK1, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; Akt, protein kinase B; mTOR, mechanistic target of rapamycin; Foxo1, forkhead box protein O1

2.5 研究目的

Nesfatin-1 は高グルコース応答性インスリン分泌を促進する。さらに、ヒト及びラットの膵β細胞は NUCB2 mRNA を発現している[25,26]。従って、膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 はインスリン分泌を調節している可能性がある[27]。しかし、膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 のインスリン分泌における役割は、未だ明らかにされていない。本研究は、膵β細胞の内在性

NUCB2/Nesfatin-1 の膵 β 細胞機能における役割を明らかにする事を目的とした。

3. 実験材料と実験方法

3.1 膵β細胞特異的 NUCB2/Nesfatin-1 欠損(β NUCB2 KO)マウス

NUCB2^{flox/flox} マウスは、エクソン 3-6 を挟むように flox が挿入されている (図 4) [28]。Rat insulin II promoter (RIP) 下流に組み換え酵素 Cre の配列を持つ RIP-Cre マウスと交配し、RIP-Cre/NUCB2^{flox/flox} (β NUCB2 KO)マウスを作成した。

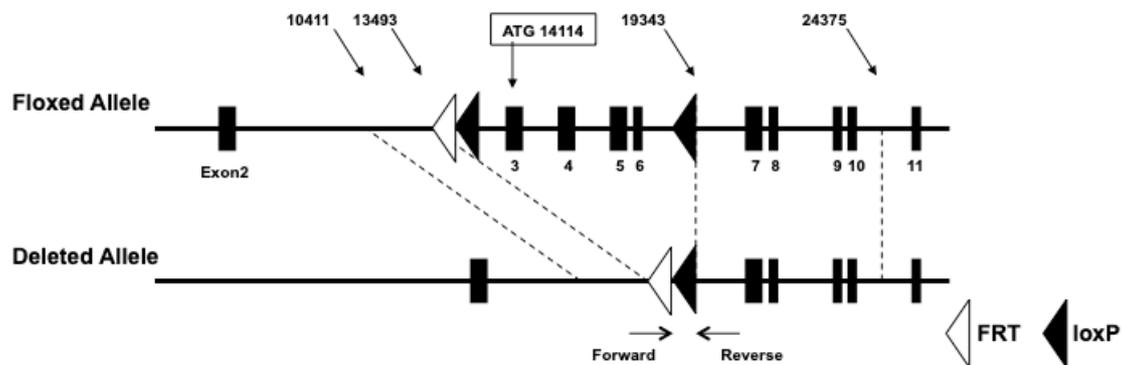


図 4 NUCB2 対立遺伝子のターゲティングベクターの略図

各マウスの耳試料からの抽出 DNA を用いて genotyping を行った。

プライマー:

Cre

forward は、5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC-3'、

reverse は、5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTAC-3'

NUCB2

forward は、5'-AAAACCTTGGCCTGTCTGAA-3'、

reverse は、5'-CATCGATAGGAACAGCTTCCA-3'

全ての動物は 24°C、湿度 40-60%、12 時間明暗 (7:30-19:30 明) の条件の下

で飼育した。餌と水は実験まで自由摂取させた。本論文における全ての実験は、自治医科大学実験医学センター運営委員会で承認され、自治医科大学動物実験指針に従って行った。雄性マウスを以下の解析に用いた。

3.2 膵β細胞株 MIN 6 細胞への NUCB2 shRNA 遺伝子投与と培養

膵β細胞株の MIN6 細胞に、NUCB2 の shRNA 発現プラスミド(NM 016773, 5'-GGATCATCCAAGTACAGTA-3'; 298-316)をリポフェクション法により遺伝子導入した。対照用の細胞ラインは Scramble の shRNA (5'-CAACACTAGTTGACATGTA-3')を導入した (Scr shRNA)。10 µg/mL puromycin 添加の培地交換は 2 日毎に行い細胞株を樹立した。

3.3 体重と随時血糖の測定

体重、血糖値の測定は、毎週水曜日午後 15:00 に行った。マウスの尾静脈から血液を採取し、GlucoCard DIA メーター(Arkray, Kyoto)を用いて血糖値を測定した。

3.4 腹腔内グルコース負荷実験と血漿インスリン濃度の測定

腹腔内グルコース負荷実験の前に 7:30 から 8 時間マウスを絶食とした。そして、実験開始前に各マウスの体重を測定した。20%グルコース溶液 (大塚製薬、東京) 2 g/kg を腹腔内投与した。投与後 5 分、30 分、60 分、120 分時点で尾静脈から採血し、GlucoCard DIA メーターを用いて血糖値を測定した。また、投与後 15 分、血液サンプルを尾の先端から集め、遠心(5000 rpm, 10 分間)して上

清を血漿サンプルとして回収した。動物の負担を軽減するため、採血量を制限し、インスリンの測定は15分の時点のみで行った。超高感度マウスインスリン測定キット(Morinaga Institute of Bio Science, 横浜)を用いて測定した。

3.5 門脈採血と血中 GLP-1 測定

採血の1分前にマウスをイソフルラン（イソフルラン：フロピレングリコール 3:7）で麻酔した。1 mL シリンジ先端に 500 IU/mL Heparin (Wako)、5000 KIU/mL Aprotinin (Wako)、100 μ M Vildagliptin (Novartis)の Mix を 50 μ L 入れ、下大静脈から採血した。その後、4°C、10 分間 3300 回転で遠心し、上清を-80°C で保存した。Total GLP-1 キット(EZGLP1T-36K, EMD)を用い、血中 GLP-1 濃度を測定した。

3.6 マウス膵臓ランゲルハンス島の分離

膵島の分離、採取は既報に従った[29]。2.8 mM グルコースを含む Ca-free Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer (HKRB; in mM/L: NaCl 129, NaHCO₃ 5.0, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.0, MgSO₄ 1.2, and HEPES 10 at pH 7.4, with 0.1% BSA) (2.8G- HKRB)に、コラゲナーゼ 1.14 mg/mL を加え、コラゲナーゼ溶液を調整した。マウスを麻酔後に総胆管にコラゲナーゼ溶液を注入し、膵臓全体にコラゲナーゼ溶液を充填させた。膵臓を切り出し、37°C 16 分間温浴した。その後、氷上に置いたシャーレに膵島懸濁液を移し、実体顕微鏡下に形態の保たれた膵島を収集した。

3.7 インスリン分泌測定

膵島各 10 個ずつをディスポガラスチューブに入れ、2.8G- HKRB 1ml を加えて 37°C 15 分静置しプレインキュベーションを行なった。上清を除去した後、それぞれに 2.8G- HKRB または 8.3G- HKRB を 1 mL 加えて、37°C で 30 分間インキュベーションした。1 分間 800 回転で遠心後、上清を 200 μ L ずつ回収した。それぞれの試料のインスリン濃度を ELISA インスリン測定キット (MercoDia Mouse Insulin ELISA, Sweden) を用いて測定した。

MIN6 細胞のインスリン放出は、HKRB を用いて 37°C でインキュベーションした。1 ウェルあたり 1.4×10^5 細胞の密度で 24 ウェルプレートに播種し、2.8G- HKRB を 500 μ L 加えて、37°C で 30 分間プレインキュベートした。それぞれに 2.8G- HKRB または 8.3G- HKRB を 500 μ L 加えて、37°C で 30 分間インキュベーションした。それぞれの分泌上清中のインスリン濃度を ELISA インスリン測定キット (Morinaga Institute of Bio Science) にて測定した。

3.8 マウス膵 β 細胞の単離

先述の分離した膵島から膵島細胞を単離するために 0.1 mM EGTA を加えた 2.8G-HKRB で 15 分間室温処理した。ピペティングを加え膵島細胞を懸濁させた。細胞懸濁液を 10 mL のペニシリン・ストレプトマイシン添加 minimum essential medium (MEM, Invitrogen : USA) に加え 5 分間 800 回転で遠心した。上清を廃棄し MEM を適量加えたのち再度懸濁し、20 μ L ピペットマンを用いて滅菌済みシャーレに入れカバーガラス上に水滴状にして静置した。細胞がカバーガラスに接着するよう 35 分間 37°C でインキュベートした。インキュベート

後シャーレ内に MEM を 3 mL 追加して、37°C インキュベータ内で 12 時間以上インキュベートし一次培養膵β細胞とした。

3.9 単離細胞質遊離カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の測定

単離β細胞を、 Ca^{2+} 感受性色素 fura-2/acetoxymethyl(AM) (同仁科学研究所、熊本) 2 μ M/L を含む HKRB にて 37°C で 30 分インキュベーションした (2.8G-HKRB)。Fura-2 負荷した細胞が接着したカバーガラスを蛍光顕微鏡ステージ上の保温チャンバーに静置し、35°C にて流速 1 mL/分で灌流し、340 nm 及び 380 nm の励起光を交互に照射し (照射時間 ; 0.5 秒)、放出される 510 nm 蛍光を顕微鏡から誘導し intensified-CCD カメラを用いて 8 秒おきに測定した。340 nm 励起による 510 nm 蛍光 (F340) と 380 nm 励起による 510 nm 蛍光 (F380) の比 (F340/F380) を計算した。これらのデータの取得と処理は Aquacosmos システム (浜松フォトニクス、浜松) を用いて行った。

膵β細胞の判定基準は、直径 12 μ m 以上の円型の細胞で、2.8 mM 低グルコース存在下でトルブタミト 500 μ M 刺激に対して $[Ca^{2+}]_i$ 増加を示した細胞を採用した。

3.10 遺伝子発現解析

TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて、MIN6 細胞から total RNA を抽出し、RQ1-DNase(Promega, Madison, WI)を加え 37°C で 15 分間加熱処理し、混入した DNA を除去した[30]。Real-time PCR 法を用いて、UCP-2 mRNA および IRS-2 mRNA の発現量を測定した。

使用したプライマー配列：

UCP-2

forward primer 5'-CCCAATGTTGCTCGTAATGC-3'

reverse primer 5'-AGAAGTGAAGTGGCAAGGGA-3'

IRS-2

forward primer 5'-GTCCAGGCACTGGAGCTTT-3'

reverse primer 5'-GCTGGTAGCGCTTCACTCTT-3'

3.11 タンパク質の解析

6 ウェルプレート (MICROTEST (TM) 6; BD FALCON, Franklin Lakes, NJ, USA) で培養した細胞は RIPA 緩衝液 (1%NP40、150mM NaCl、1 mM PMSF、0.2 unit/mL aprotinin、4 mM EDTA、50 mM Tris; pH7.5) 中で溶解した。BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用い、タンパク質定量を行った。タンパク質 5 μ g を 8%ポリアクリルアミドゲル泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。その後、Tris buffered saline with tween 20 (TBS-T: 10 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween20)で溶解した 5% skim milk を用い、室温にて 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体及び二次抗体は TBS-T で希釈した。一次抗体を 4°C で一晩または室温で 1 時間反応させ、二次抗体を室温にて 1 時間反応させた。その後、Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)により検出した。以下に一次抗体及び二次抗体と希釈率を示す。一次抗体：Rabbit anti-human NUCB2 (Sigma-N9414, 1:10000) 、 Mouse anti- β -actin

(Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, 1:10000)、phospho-Ser473 Akt (CST, Beverly, MA, 1:10000)、anti-Akt (CST, Beverly, MA, 1:10000)。二次抗体として用いた抗体は、Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugated(ab6721, 1:2000)、Goat anti-mouse IgG peroxidase conjugated(ab6789, 1:2000)。

3.12 膵臓組織スライドガラス標本

各マウスを 2 g/kg ウレタンで麻酔後に右心耳を切開し、Heparin を含む 0.9% 生理食塩水を灌流し、脱血した。その後、4%PFA 固定液に換え、200 mL 程度の固定液をペリスタルティックポンプ (0.5 mL/秒)で流した。膵臓組織を摘出し、10%ホルマリンに浸した。固定 24 時間後の膵臓組織は、パラフィン固化した。組織はマイクロトームを用い、厚さ 4-5 μm を切り出した。

3.13 免疫組織の染色

膵臓組織スライドガラス標本は、脱パラフィン後、1% BSA/2% normal goat serum(NGS)/PBS で 1 時間ブロッキング後、以下の抗体を用いて免疫染色を行った：anti-insulin (A0654; Dako Japan, Tokyo, Japan; 1:1000) 抗体、anti-nesfatin-1 (Ab24; 1:1000) 抗体[1]、anti-glucagon (A0565; Dako Japan ; 1:1000) 抗体、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti rabbit IgG (Invitrogen, USA; 1:500)、Alexa Fluor 594-conjugated goat anti rabbit IgG (Invitrogen, USA; 1:500)。100 μL の最適に希釈した一次抗体をスライド上に覆い、室温で 1 時間湿潤チャンバー内で反応させた。一次抗体の希釈にブロッキングバッファーを使用した。1% BSA/ PBS に希釈した二次抗体は 100 μL をスライドに注

ぎ、室温で 30 分間湿潤チャンバー内に反応させた。

7×10^5 /mL 細胞/dish となるように MIN6 細胞を播種し、2 日後に 0.1% Triton X-100/PBS で 60 分処理した。その後、1%BSA/PBS でブロッキングした後、各抗体を用い免疫染色を行った。Proliferating Cell Nuclear Antigen; PCNA) の免疫染色を行った。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) の対比染色による DAPI および PCNA の両方に染色された細胞の数を、DAPI に染色された細胞の総数で割ることによって、PCNA 陽性細胞の割合を得た。

染色の観察は、BX51 カメラ (OLYMPUS、TOKYO、JP) を備えた蛍光顕微鏡で画像化した。

3.14 細胞増殖マーカーの解析

実験用培地は、96 ウェルプレート (MICROTEST (TM) 96; BD FALCON、Franklin Lakes、NJ、USA) に 100 μ L MIN6 細胞懸濁液 (7×10^4 細胞) を添加播種した。培養 3 日目に 7.5 μ L の WST-1 試薬を補充し、37°C で 2 時間インキュベートした。各ウェルの吸光度を 450 nm で測定した。

1 ウェルあたり 100 μ L の MIN6 細胞懸濁液 (7×10^4 /細胞) は 96 ウェルプレートに播種し、37°C で 24 時間、DMEM 中でインキュベートした。ELISA BrdU 化学発光キット (669915, Roche, Basel, Switzerland) を使用した。その後、培地を除去し、100 μ M の BrdU を添加して、37°C で 24 時間インキュベートし、BrdU 標識および検出を作成した。マイクロプレートリーダー (iMark™ Microplate Absorbance Reader, BIO-RAD) を用い、490 nm / 630 nm での吸光度で測定した。

3.15 データの解析と統計

すべての実験結果は平均値±標準誤差で示した。有意差の検定は Unpaired Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4.結果

4.1 膵β細胞特異的 NUCB2/Nesfatin-1 欠損 (βNUCB2 KO) マウス

4.1.1 膵島 NUCB2/Nesfatin-1 の消失

膵β細胞特異的 NUCB2/Nesfatin-1 欠損(βNUCB2 KO)マウスと Cre マウスの膵臓切片を作成し、抗 Nesfatin-1 抗体と抗インスリン抗体で二重染色を行った。Cre マウス膵島においてはインスリン陽性細胞である膵β細胞は Nesfatin-1 陽性細胞を発現していた (図 5A 上段)。一方、βNUCB2 KO マウスでは Nesfatin-1 発現が消失していた (図 5A 下段)。視床下部弓状核においては、両マウスで同様に Nesfatin-1 が発現していた (図 5B)。

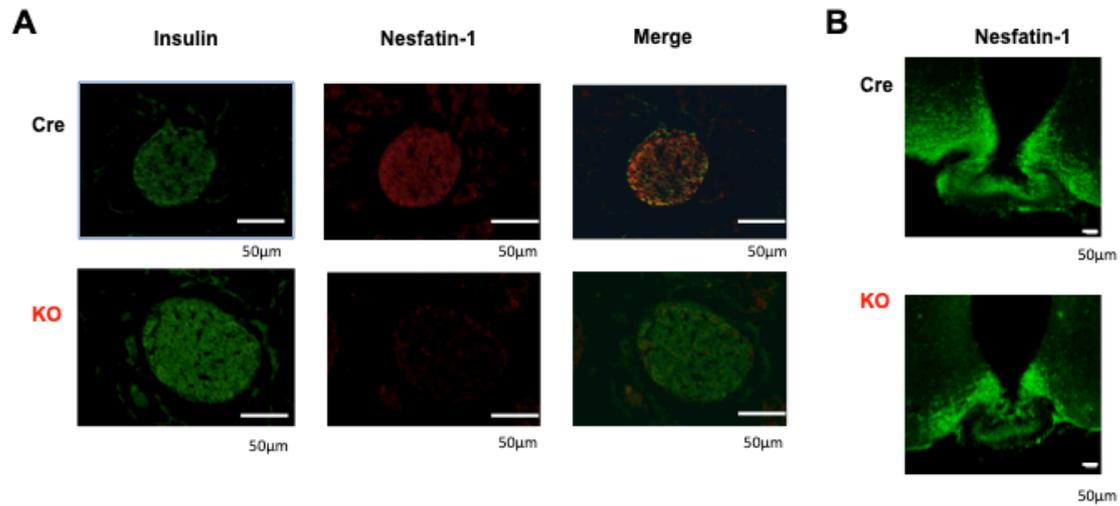


図 5 Nesfatin-1 の膵β細胞内局在と、膵β細胞特異的 NUCB2/Nesfatin-1 欠損マウスにおけるその消失

A: β NUCB2 KO (KO)マウスと Cre マウス (各 20 週齢雄) の膵島におけるインスリン免疫染色像、Nesfatin-1 免疫染色像、および共局在。マウス膵臓切片を、インスリン (緑色)、Nesfatin-1 (赤色) に対する抗体で免疫染色した。B: KO マウスと Cre マウスの視床下部弓状核における Nesfatin-1 免疫染色像。Nesfatin-1 (緑色)。 Cre マウス 6 匹、膵島組織切片 n = 9/匹; KO マウス 7 匹、膵島組織切片 n = 9/匹。スケールバー : 50 μ m。

4.1.2 体重低下および随時血糖値・空腹時血糖値の上昇

β NUCB2 KO マウスと Cre マウスの、20 週までの体重、随時血糖値を測定した。 β NUCB2 KO マウスは、18 週齢から体重が低下し、12 週齢から随時血糖値が上昇した (図 6A,B)。 β NUCB2 KO マウスは、12 週における空腹時血糖値も有意に高値を示した (図 6C)。

4.1.3 耐糖能障害、グルコース刺激に対するインスリン分泌の低下

耐糖能を評価するため、腹腔内グルコース負荷試験 (グルコース 2 g/kg) を行った。 β NUCB2 KO マウスの血糖値は 0 分と 120 分時点で Cre マウスに比べて有意に高値であった (図 6D)。負荷後 15 分の β NUCB2 KO マウスの血漿インスリン濃度は Cre マウスに比べて有意に低値であった (図 6E)。これらの結果より、 β NUCB2 KO マウスは Cre マウスに比べてインスリン分泌の抑制による耐糖能不全を示すことが示唆された。

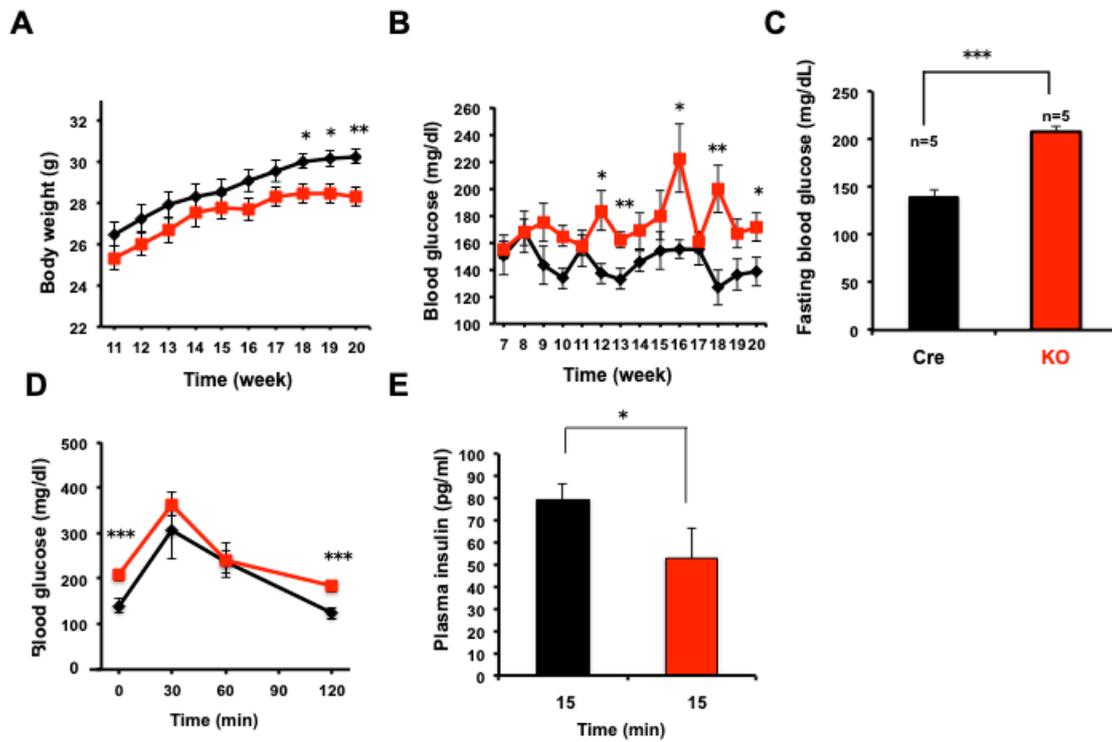


図 6 β NUCB2 KO マウスの体重低下、随時血糖値・空腹時血糖値上昇および耐糖能障害

A and B: KO マウスと Cre マウスの 20 週齢までの体重 (*A*) と随時血糖値 (*B*)。Cre, n = 6; KO, n = 7。 *C*: KO マウスと Cre マウスの 12 週齢での 8 時間絶食後の空腹時血糖値。 *D and E*: KO マウスと Cre マウスの 12 週齢における腹腔内グルコース負荷試験における血糖値 (0-120 分) (*D*) と血漿インスリン値 (15 分) (*E*)。 n = 5. mean \pm S.E. *P < 0.05, **P < 0.01。

4.1.4 血漿 GLP-1 濃度・膵島グルカゴンの免疫染色

β NUCB2 KO マウスの血糖値上昇および耐糖能障害の原因として、インスリン分泌を促進する GLP-1 の血漿濃度を検討した。Total GLP-1 濃度は、 β NUCB2 KO マウスと Cre マウスの相違はなかった (図 7A)。また、膵臓の抗グルカゴン抗体を用いた免疫染色において、 β NUCB2 KO マウスでグルカゴン陽性細胞の分布に有意な違いは見られなかった (図 7B)。

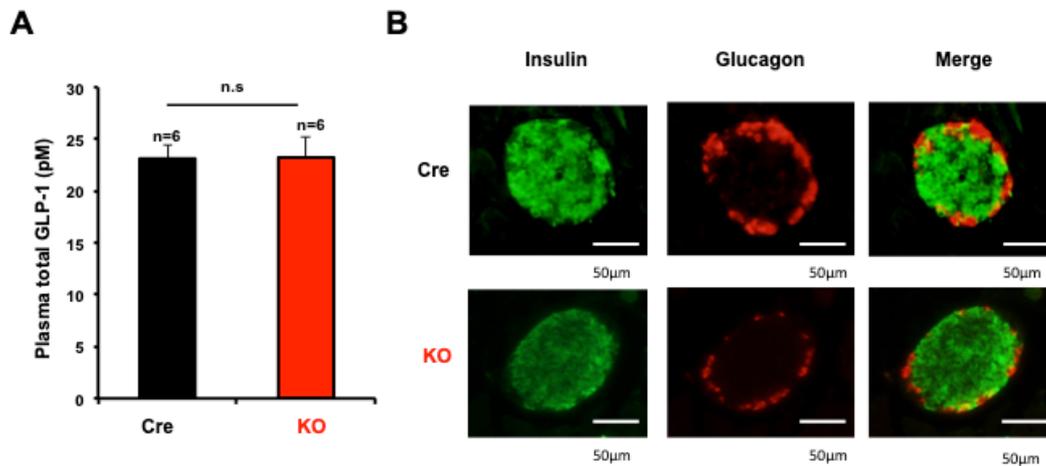


図 6 β NUCB2 KO マウスにおける血中 GLP-1 濃度と膵島グルカゴン陽性細胞分布

A and B: KO マウスと Cre マウスにおける血漿 GLP-1 濃度(A)および膵島グルカゴン免疫染色(B)。インスリン (緑色)、グルカゴン (赤色)。NS: not significant (有意差なし)。スケールバー : 50 μ m。

4.1.5 分離膵島におけるグルコース刺激インスリン分泌の低下

グルコース負荷試験で、 β NUCB2 KO マウスの血糖値上昇、血漿インスリンの低下が観察された。そのメカニズムを解明するため、単離膵島におけるグルコース応答インスリン分泌の変化を検討した。2.8 mM グルコース存在下での基礎インスリン分泌は、 β NUCB2 KO マウスでは Cre マウスと比べて低下傾向を示したが、統計的に有意差はなかった。高濃度 8.3 mM グルコース刺激によるインスリン分泌の増加の程度は、Cre マウスと比べ β NUCB2 KO マウスでは有意に低下していた。以上の結果から、内在性 NUCB/Nesfatin-1 が膵島インスリン分泌、特にグルコース刺激インスリン分泌を維持・促進していることが示唆された (図 8)。

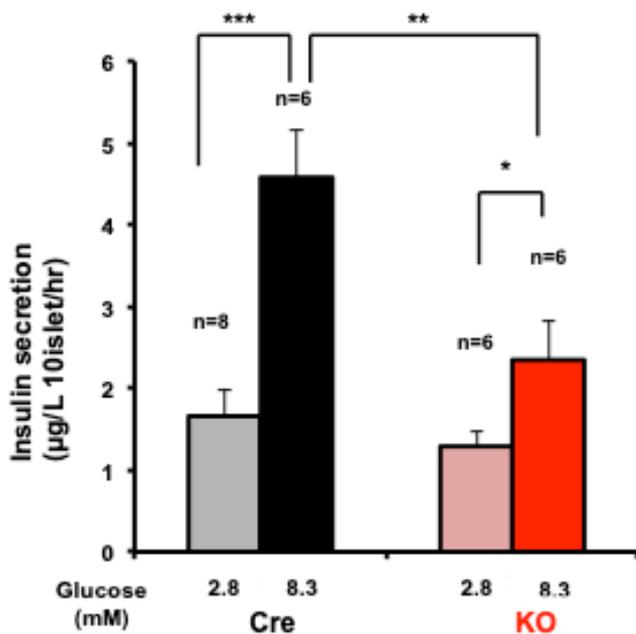


図 8 β NUCB2 KO マウスの単離膵島におけるグルコース刺激インスリン分泌の抑制

単離膵島を 2.8 mM 及び 8.3 mM グルコース存在下に 30 分間インキュベートし、上清中のインスリン濃度を測定した。KO マウス分離膵島 (n=10) は Cre マウス分離膵島 (n=10) に比べ、グルコース刺激インスリン分泌が有意に抑制された。mean \pm S.E. *P < 0.05; **P<0.01; ***P<0.001。

4.1.6 単膵β細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) のトルブタミト、アルギニン刺激に対する応答

βNUCB2 KO マウスと Cre マウスの膵島から膵β細胞を単離し、灌流液のグルコース濃度を基礎値の 2.8mM で細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を測定した (図 9A)。細胞膜 K_{ATP} チャンネル阻害薬であるトルブタミト (500 μM、10 分間)、及び、細胞膜を脱分極させるアルギニン (10 mM、5 分間) 添加により、両マウスの膵β細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加が観察された (図 9A)。トルブタミトとアルギニンによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加はβNUCB2 KO と Cre マウスで相違はなかった (図 9B)。

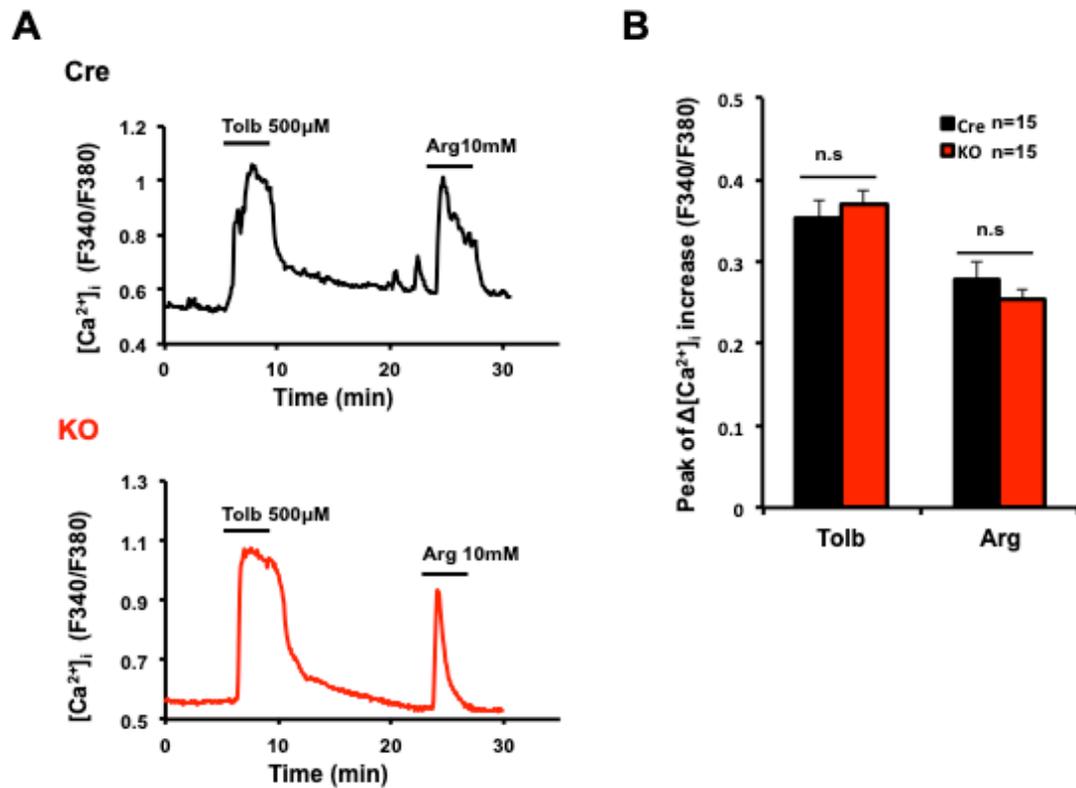


図 9 βNUCB2 KO および Cre マウスの単離膵β細胞における、トルブタミト、アルギニンに対する[Ca²⁺]_i 応答。

A and B: トルブタミト、アルギニン添加は単離膵β細胞の[Ca²⁺]_iを増加させ (A)、[Ca²⁺]_i 増加のピークの平均値はβNUCB2 KO と Cre マウスで有意な違いは見られなかった(B)。NS, no significant (有意差なし)。

4.1.7 単膵β細胞 $[Ca^{2+}]_i$ のグルコース刺激に対する応答の低下

次に、灌流液のグルコース濃度を基礎値の 2.8 mM から 8.3 mM に上昇させると、両マウスの膵β細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の増加が観察された (図 10A)。 $[Ca^{2+}]_i$ 増加のピークの平均値は、KO マウスでは Cre マウスと比べて有意に低値を示した (KO マウス 0.36 ± 0.02 (n=77) vs. Cre マウス 0.43 ± 0.01 (n=160) , $P < 0.05$) (図 10B)。従って、膵β細胞内在性 NUCB/Nesfatin-1 は膵β細胞のグルコース応答性インスリン分泌を維持・制御することが明らかとなった。

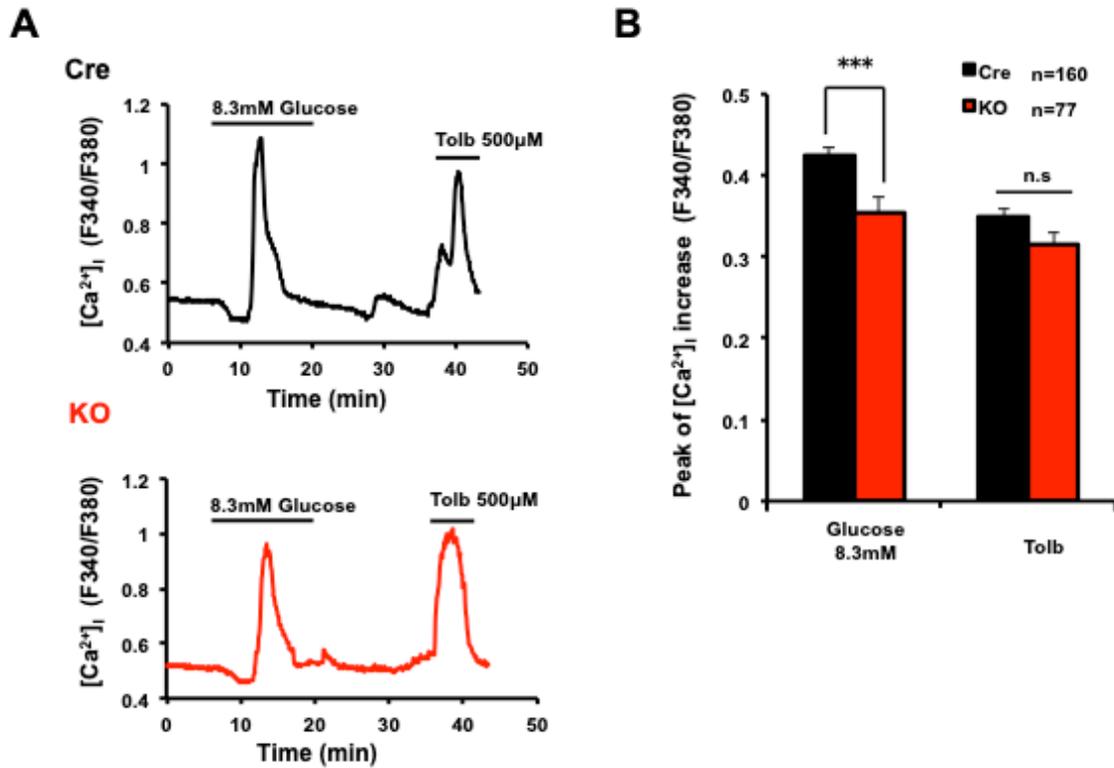


図 10 β NUCB2 KO マウス単離膵 β 細胞におけるグルコース刺激に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答の低下

A: 灌流液のグルコース濃度を基礎値の 2.8 mM から 8.3 mM に上昇させると、両マウスの膵 β 細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加が観察された。B: グルコース応答の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加のピークの平均値は、KO マウスでは Cre マウスと比較して有意に低値を示した。mean \pm S.E. ***P<0.001。

4.1.8 β NUCB2 KO マウスにおける小サイズ膵島数の低下

マウスから摘出した膵臓切片を作成し、抗インスリン抗体を用いて免疫染色を行い、膵島の直径を計測した。小型の膵島は Cre マウスでは多数観察されたが、 β NUCB2 KO マウスでは稀であった (図 11A)。また、膵島直径の分布を解析したところ、 β NUCB2 KO マウス膵臓では直径 60 μm 以下の小サイズ膵島の数及び全体に占める比率が低下していた。(図 11B,C)

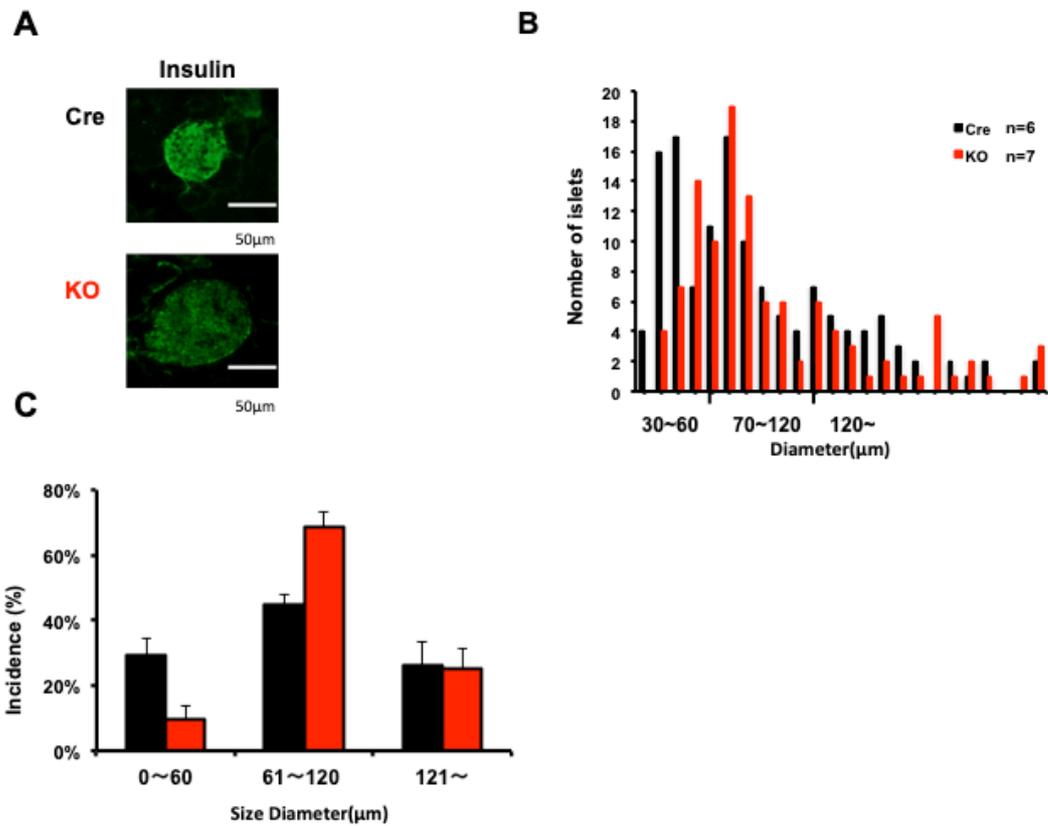


図 11 β NUCB2 KO マウスにおける小型膵島の比率の低下

A: 12 週齢 KO マウスと Cre マウス膵島におけるインスリン免疫蛍光染色像 (緑色)。B: KO マウスと Cre マウスの膵島直径の分布。C: KO マウスと Cre マウスにおける大 (120~)、中 (61~120)、小 (30~60) サイズの膵島の比率。Cre マウス 6 匹、膵島組織切片 n = 9/匹; KO マウス 7 匹、膵島組織切片 n = 9/匹。スケールバー : 50 μ m。

4.2 NUCB2 shRNA を遺伝子導入した (NUCB2 shRNA) MIN6 細胞

4.2.1 NUCB2 タンパク質の発現、グルコース刺激インスリン分泌の低下

膵β細胞株の MIN6 細胞に、NUCB2 の 2 種類の shRNA 発現プラスミドをリポフェクション法により遺伝子導入し、安定発現細胞株を樹立した。①配列において NUCB2 タンパク質の発現が低下していることが確認された (図 12A)。

NUCB2 shRNA-MIN6 細胞におけるインスリン分泌能を解析する目的で、細インスリン分泌をインキュベーション法で測定した。MIN6 細胞において、2.8 mM グルコースと比べ、16.6 mM 高濃度グルコース刺激下でインスリン分泌は有意に亢進された。一方、NUCB2 shRNA-MIN6 細胞における 16.6 mM グルコース刺激下インスリン分泌の上昇の程度は MIN6 細胞に比べ、有意に低値であった (図 12B)。

4.2.2 UCP-2 mRNA 発現の上昇

NUCB2 shRNA-MIN6 細胞において UCP-2 mRNA の発現は有意に上昇した (図 12C)。

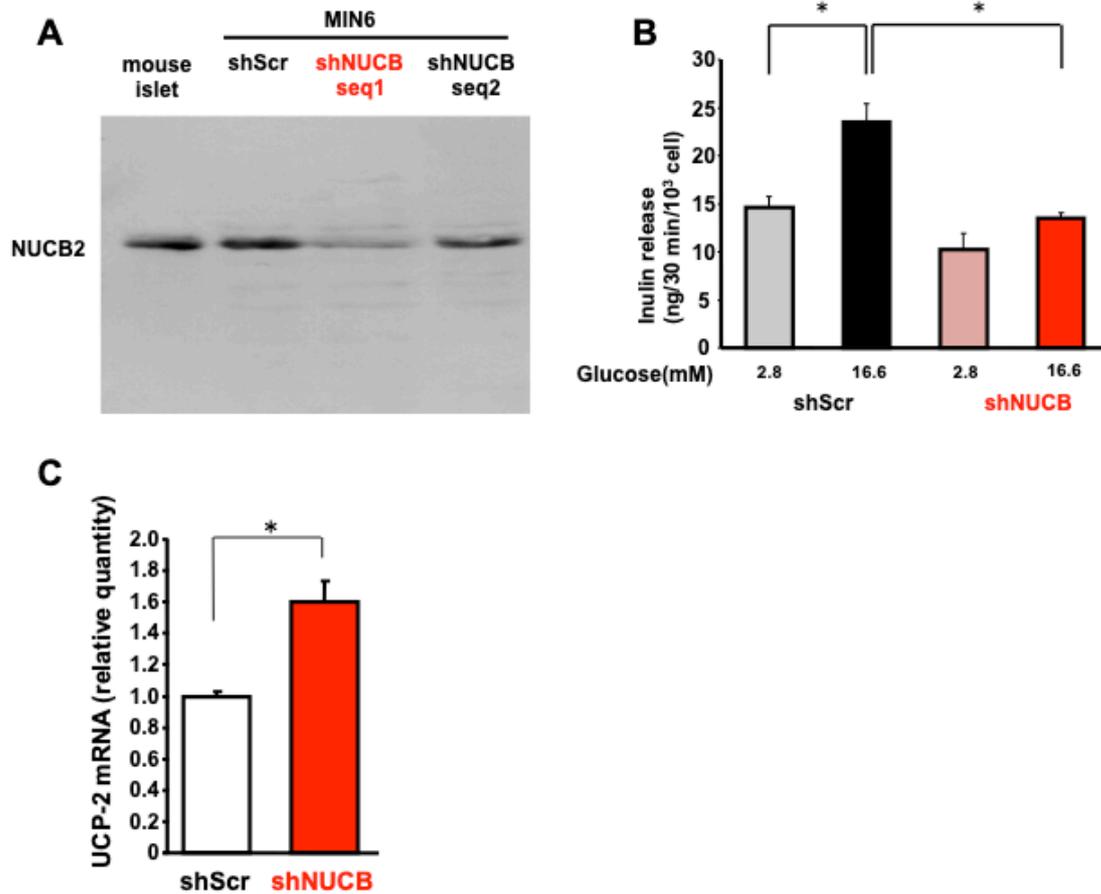


図 12 NUCB2 shRNA-MIN6 細胞におけるグルコース刺激インスリン分泌の低下。

A: NUCB2 shRNA-MIN6 (shNUCB2) 細胞における NUCB2 発現の抑制。
 B: NUCB2 shRNA-MIN6 細胞における高濃度グルコース刺激インスリン分泌は抑制された。2.8 mM グルコース及び 16.6 mM グルコースで 30 分間のインキュベーション後の上清中のインスリン濃度。C: UCP-2 mRNA の発現。mean \pm SEM. *P < 0.05。

4.2.3 PCNA 発現、生細胞数、BrdU の取り込みの低下

WST-1 法で NUCB2 shRNA-MIN6 細胞の細胞数は有意に低下した (図 13A)。さらに、NUCB2 shRNA-MIN6 細胞は BrdU 取り込み量が有意に減少した (図 13B)。NUCB2 shRNA-MIN6 細胞の PCNA 陽性細胞数が約 50% 有意に低下していた (図 13C,D)。そのため、NUCB 2 の発現抑制は、膵β細胞の増殖を抑制することが示唆された。

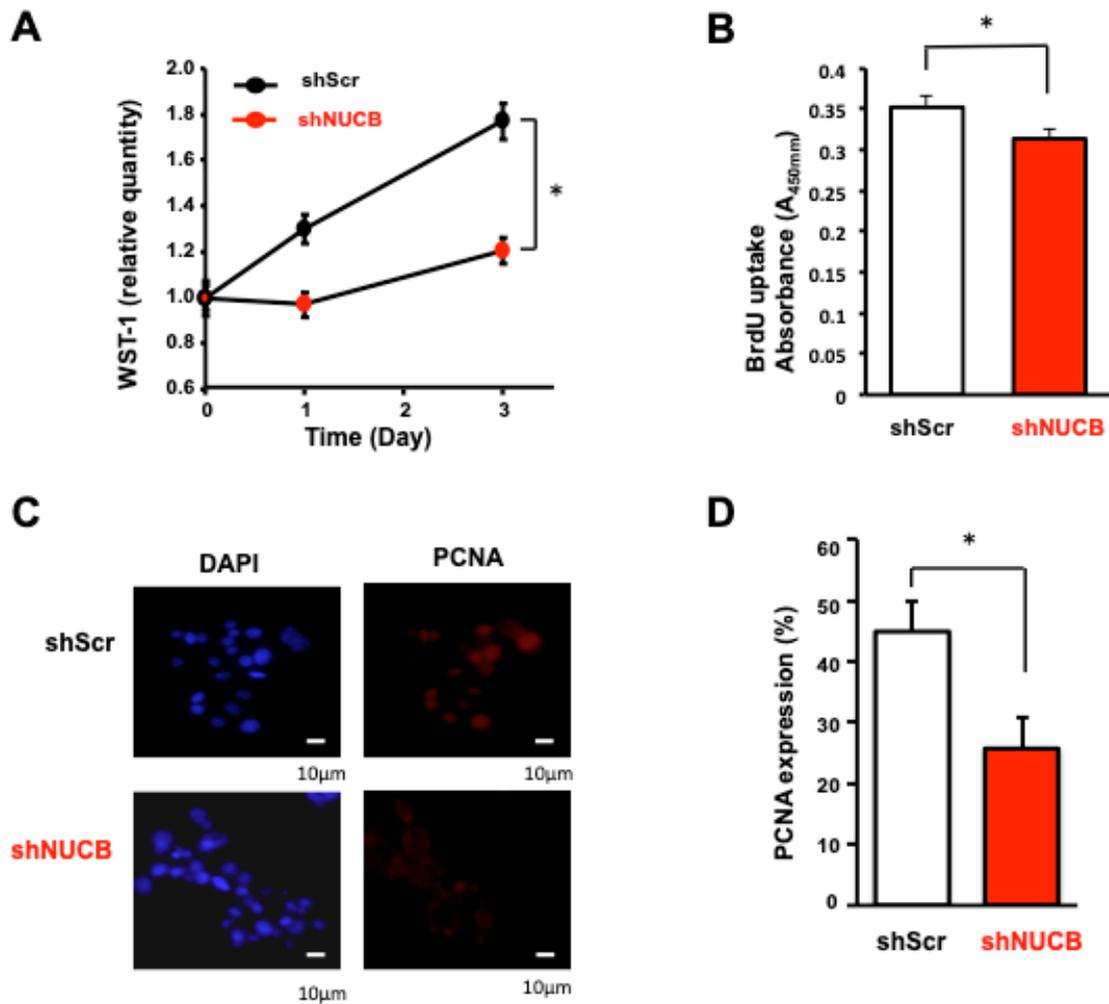


図 13 NUCB2 shRNA- MIN6 細胞 (shNUCB2) による活性化および増殖能の阻害。

A: WST-1 アッセイ吸光度による生細胞数の評価, n=4。 B: 3 日間インキュベーション後、2 時間 BrdU を添加し、増殖を評価した。 n=8。 C and D: MIN6 細胞における DAPI および PCNA の免疫染色 (C) と PCNA 陽性細胞の割合 (D)。 Anti-DAPI (青色) ; Anti-PCNA (赤色)。スケールバー : 10 μ m。 mean \pm SEM。 *P < 0.05。

4.2.4 IRS-2 mRNA 発現、Akt リン酸化の低下

インスリンシグナルは細胞増殖に重要である。NUCB2 shRNA-MIN6 細胞の IRS-2 mRNA 発現レベルは、shScr MIN6 細胞より有意に低下した (図 14A)。また、下流の Akt シグナル伝達は、IRS-2 活性化の主要な経路である。NUCB2 shRNA-MIN6 細胞においてリン酸化 Akt の発現は減弱した (図 14B)。これらの結果より、インスリンシグナルの低下が示された。

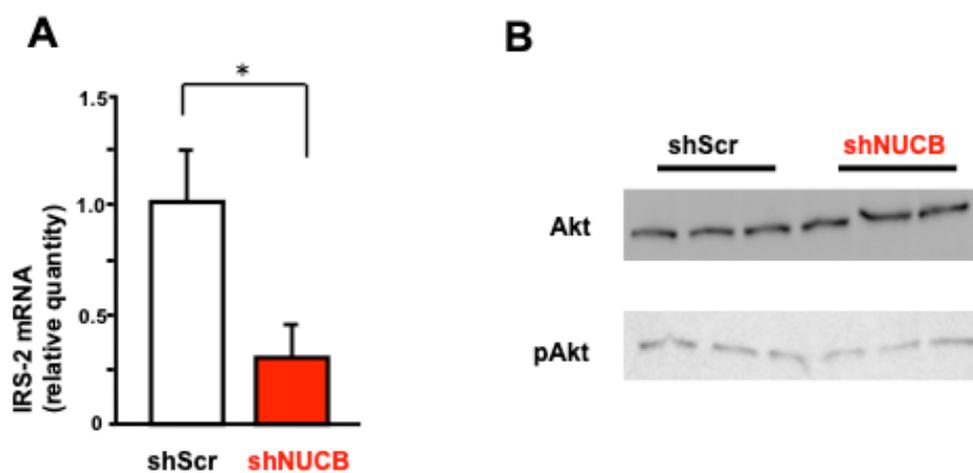


図 14 インスリンシグナル伝達は、NUCB2 shRNA-MIN6 細胞 (shNUCB2) において阻害された。

A: MIN6 細胞における IRS-2 mRNA の発現。B: Akt リン酸化。mean \pm SEM.

*P < 0.05。

5. 考察

5.1 研究結果のまとめ

本研究では膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 によるインスリン分泌及び細胞増殖に関して以下の知見を得た。

1. 膵β細胞特異的 NUCB2/Nesfatin-1 欠損マウス：

- ① 体重が低下し、随時血糖値および空腹時血糖値が上昇した。
- ② 分離膵島において、高濃度グルコース刺激インスリン分泌が抑制された。
- ③ 単離β細胞において、高濃度グルコース刺激に対する細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が抑制された。

2. NUCB2 shRNA 遺伝子導入(NUCB2 shRNA)MIN6 細胞：

- ④ UCP-2 mRNA の発現が増加した。
- ⑤ 細胞増殖が抑制された。
- ⑥ IRS-2 mRNA の発現及び下流因子 Akt のリン酸化が低下した。

5.2 膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 の役割：糖代謝

5.2.1 血糖とグルコース刺激インスリン分泌の維持

本研究で用いた膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 ノックアウト(β NUCB2 KO)マウスにおいては、Nesfatin-1 と Nesfatin-2 と Nesfatin-3 の全てがノックアウトされている。現在までに、Nesfatin-1 について複数の生物学的作用が認められているが、Nesfatin-2 と Nesfatin-3 の生物学的作用は報告されていない。従って、本研究において β NUCB2 KO マウスで観察された糖代謝の変化は

Nesfatin-1 の欠損に起因すると考えられる。

本研究で、 β NUCB2 KO マウスは体重の低下に加えて、随時血糖値の上昇を示した。なお、雌性の β NUCB2 KO マウスでは随時血糖値は変化しなかった。糖負荷実験を行った結果、 β NUCB2 KO マウスは、腹腔内グルコース負荷 15 分の血漿インスリン濃度上昇が有意に低下した。これらの結果より、 β NUCB2 KO マウスの耐糖能の障害が示唆され、インスリン分泌が抑制されていることが推察された。以上の結果から、膵 β 細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 は血糖を正常に維持する機能をもつことが明らかとなった。グルコース刺激インスリン分泌 (GSIS) は、グルコースが細胞内に取り込まると、グルコース代謝による ATP/ADP 比の上昇により ATP 感受性 K^+ チャネル(K_{ATP} チャネル)が閉口して膜が脱分極し、電位依存性 Ca^{2+} チャネルが活性化されてインスリン開口放出が惹起される反応である。本研究より、 β NUCB2 KO マウス単離膵島において、高濃度グルコース刺激インスリン分泌が約 40%抑制された。また、NUCB2 shRNA-MIN6 細胞においても、高濃度グルコース刺激インスリン分泌が約 40%抑制された。このように、膵 β 細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 の欠損は GSIS の低下を呈した。従って、膵 β 細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 は GSIS を維持することが示唆された。

この結果は以下の先行研究の報告と合致している。Nesfatin-1 はマウス膵島と MIN6 細胞においてグルコース応答性インスリン分泌を用量依存的に促進し [31]、インスリン感受性を改善する [32]。Nesfatin-1 はマウス静脈糖負荷試験において、インスリン分泌をわずかに上昇させ、血糖値を低下させる [27]。NUCB2/Nesfatin-1 は、白色脂肪組織を含む末梢組織に発現し、ヒトとげっ歯

類の膵β細胞でも存在している [25,26,27]。膵臓において Nesfatin-1 がインスリンと共局在することは、NUCB2/Nesfatin-1 の膵島またはβ細胞における局所的な役割を示唆している。一連の結果は、NUCB2/Nesfatin-1 がインスリン分泌を調節し、血糖恒常性に関わることを示唆している。さらに、膵島から Nesfatin-1 が分泌されていること [31] から、膵島細胞から分泌された Nesfatin-1 はオートクライン・パラクライン作用でβ細胞に作用し、グルコース刺激インスリン分泌を促進する可能性が考えられる。しかし、膵β細胞における Nesfatin-1 の作用機序については、Nesfatin-1 受容体が未同定であるため不明な点が多く、今後のさらなる研究が必要である。

本研究の結果から、膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 は膵β細胞 GSIS を維持する機能を持つことが示唆された。

5.2.2 膵β細胞グルコース応答の維持

本研究では、基礎グルコース濃度 (2.8 mM) 下で観察される、トルブタミト (Tolb) 及びアルギニン (Arg) 刺激による膵β細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 増加は、βNUCB2 KO マウスで Cre マウスと比べ相違は見られなかった。トルブタミトは、 K_{ATP} チャネルを抑制する。アルギニンは、正電荷を持つ側鎖アミノ酸であり、膵β細胞膜を直接脱分極させる [33]。膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 の欠損は K_{ATP} チャネルの閉鎖及び細胞膜の脱分極に対して影響がなかったことから、GSIS 反応において K_{ATP} チャネルより上流の過程のグルコース代謝に障害があると推察される。そこで、本研究では K_{ATP} チャネルより上流にある ATP の産生に注目した。ミトコンドリアでの電子伝達系と ATP の合成は、脱共役タンパク質 2

(UCP-2) により抑制される[34]。本研究は、GSIS 低下の機序に関して、UCP-2 の mRNA 発現が、NUCB2 shRNA-MIN6 細胞において上昇することを見出した。これまでの報告で、糖尿病の発症における UCP-2 の役割が示唆されており[35,36]、一方、UCP-2 欠損マウス膵島では、GSIS が改善されることが報告されている[36,37]。また、UCP-2 の過剰発現は、膵島[38]および培養 MIN6 細胞[39]における GSIS を低下させる。本研究では、NUCB2 shRNA-MIN6 細胞において UCP-2 の発現が上昇していたことから、ATP 産生の抑制による GSIS の低下の機序が推察される。従って、膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 が膵β細胞内グルコースセンサーとして UCP-2 を抑制して GSIS を維持する機能が示唆された。

5.3 膵β細胞内在性 NUCB2/nesfatin-1 の役割：膵β細胞増殖

近年、2 型糖尿病においても、膵β細胞量の減少つまり膵β細胞の量的異常もインスリン分泌不全の成因となることが報告されている。本研究では、βNUCB2 KO マウスおよび NUCB2 shRNA-MIN6 細胞の実験から、膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 の欠損が膵β細胞の分化・増殖を抑制することが示された。つまり、膵β細胞内在性 NUCB2/nesfatin-1 は膵β細胞の分化・増殖を維持する機能があると考えられる。膵β細胞におけるインスリンシグナルの役割は不明であったが、1999 年に膵β細胞特異的インスリン受容体ノックアウトマウスが作成されて以来[24]、膵β細胞におけるインスリンシグナルが膵β細胞機能や膵β細胞増殖に関わっていることが明らかとなってきた[40]。膵β細胞インスリンシグナルは、IRS-2 の基質タンパクのリン酸化を促し、PI3 キナーゼ(PI3K)/Akt 経

路を経て、細胞増殖を活性化する。

本研究では、NUCB2 shRNA-MIN6 細胞の増殖の低下の機序に関して **IRS-2 mRNA** の発現と **Akt** リン酸化の減弱を見出した。したがって、膵β細胞内在性 **NUCB2/Nesfatin-1** は **PI3K-Akt** シグナルを介して細胞の増殖能を維持することが示唆される。

一方、**IRS-2** の欠失により膵β細胞 **UCP-2 mRNA** の発現が増強されたとの報告がある[41]。本研究の **NUCB2 shRNA-MIN6** 細胞においても、**IRS-2** 欠失により **UCP-2 mRNA** の発現が上昇し、**ATP** 産生が低下し、インスリン分泌および膵β細胞の増殖が障害された可能性も考えられる。

5.4 今後の課題と臨床応用への可能性

本研究は、膵β細胞内在性 **NUCB2/Nesfatin-1** の欠損は、耐糖能悪化を起こすことを明らかとした。この表現系の少なくとも一部は **Nesfatin-1** の欠損により説明できる。しかしながら、**NUCB2/Nesfatin-1** ノックアウトマウスにおいては、**Nesfatin-1** と **Nesfatin-2** と **Nesfatin-3** の全てがノックアウトされている。現在までに、**Nesfatin-2** と **Nesfatin-3** については生物学的作用を報告されていないが、この点は今後さらに検討する必要がある。また、膵β細胞内在性 **NUCB2/Nesfatin-1** は、膵β細胞内グルコース代謝過程の中の **GLUT 2** やグルコキナーゼなど解糖系酵素に関与することも考えられ、今後検討する必要がある。一方、高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性により引き起こされる代償的な膵β細胞の増殖においては、グルコキナーゼ並びにインスリンシグナルの **IRS-2** が重要な役割を果たしていることが明らかにされた[42,43]。さらに、高脂肪食マウ

スの血中 Nesfatin-1 がコントロール食負荷マウスと比べて高いことが報告された[44]。これらを総合すると、膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 は、高脂肪食で誘導される膵β細胞分化・増殖において病態的役割を担う可能性が考えられ、今後さらに検討する必要がある。

NUCB2/Nesfatin-1 はグルコース代謝の調節において必要な役割を果たしている。末梢 Nesfatin-1 の投与は、膵臓インスリン分泌を促進し[31,45]、肝臓糖新生を抑制[20,32]することが報告されている。NUCB2 の発現と Nesfatin-1 レベルは糖尿病状態により変化することが知られている。糖尿病は、生活習慣により誘導されるが、加えて、複雑な多遺伝子疾患[49,50,51]でもある。NUCB2 遺伝子の 1012C>G 多型がヒトにおけるメタボリック・シンドロームの発生と相関するとの報告がある[46]。これらの所見に基づいて、膵β細胞内在性 NUCB2/Nesfatin-1 をターゲットとした抗糖尿病薬の開発につながる可能性がある。

6.おわりに

本研究により、膵β細胞内在性 NUCB2/nesfatin-1 はインスリン分泌促進および細胞増殖作用を有することが示唆された。膵β細胞内在性 NUCB2/nesfatin-1 欠損マウスから単離した膵島およびβ細胞の解析から、膵β細胞 NUCB2/nesfatin-1 は、膵島のグルコース刺激インスリン分泌およびβ細胞 $[Ca^{2+}]_i$ のグルコース応答の維持に関与することが示唆された。さらに、NUCB2 発現ノックダウン MIN6 細胞の解析から、膵β細胞 NUCB2/nesfatin-1 はインスリンシグナルを維持し、細胞増殖能に関与することが示唆された。膵β細胞の内在性 NUCB2/nesfatin-1 は、インスリン分泌維持や膵β細胞保護・増殖による新しい糖尿病治療の標的となる可能性がある

膵β細胞内在性 NUCB2/nesfatin-1 欠損マウスにおける膵β細胞機能異常の責任分子は未だ同定できていない。また、内在性 NUCB2/nesfatin-1 発現の増加が膵β細胞増殖に必要であるかどうか不明である。これらを検証することは、今後の重要な研究課題である。

7.謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、ご指導を賜りました自治医科大学名誉教授・関西電力医学研究所統合生理研究センター長矢田俊彦先生に深く感謝致します。また、研究全般にわたり終始丁寧なご助言を頂いた和歌山県立医科大学第2生理教授中田正範先生に深く感謝致します。学位申請の間に終始丁寧なご指導を頂いた自治医科大学統合生理教授中條浩一先生に深く感謝致します。本研究で用いた NUCB^{flox/flox} マウスをご提供くださった群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学名誉教授森昌朋先生に感謝致します。RIP-Cre マウスをご提供くださった国際医療福祉大学基礎医学研究センター教授中江淳先生に感謝致します。最後に、研究過程において有意な討論、実験補助をして頂いた自治医科大学生理学講座統合生理学部門のメンバーの皆様に深く感謝致します。

8.参考文献

1. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*. 443(7112): 709-12. 2006.
2. García-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M. Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol*. Nov,45(5): 281-90. 2010.
3. Stengel A, Tache Y. Role of NUCB2/Nesfatin-1 in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Horm Metab Res*. Dec,45(13): 975-9. 2013.
4. Aydin S. Multi-functional peptide hormone NUCB2/nesfatin-1. *Endocrine*. Oct,44(2): 312-25. 2013.
5. A Stengel, Y Goebel, M Fau-Tache, Y Tache. Nesfatin-1: a novel inhibitory regulator of food intake and body weight. *Obesity Rev*. 12(4): 261-271. 2011.
6. Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Eisuke T, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO, Tanaka S, Dezaki K, Oh-I S, Hashimoto K, Shimizu H, Nakata M, Mori M, Yada T. Nesfatin-1- regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metabolism*. 10(4): 355-365. 2009.

7. Darambazar G, Nakata M, Okada T, Wang L, Li E, Shinozaki A, Motoshima M, Mori M, Yada T. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 is directly targeted by leptin and mediates its anorexigenic effect. *Biochem Biophys Res Commun*, 456(4): 913-8. 2015.
8. Pałasz A, Krzystanek M, Worthington J, Czajkowska B, Kostro K, Wiaderkiewicz R, Bajor G. Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides*. 46(3): 105-112. 2012.
9. Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, Osaki A, Oh-I S, Ariyama Y, Takahashi H, Okada S, Hashimoto K, Satoh T, Kojima M, Mori M. Fasting concentrations of nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non-obese males. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 73(4): 484-90. 2010.
10. Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S, Okada S, Mori M. A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides*. 30(5): 995-8. 2009.
11. Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M. Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocr J*. 56(4): 537-43. 2009.
12. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology*. 150(2): 662-71. 2009.
13. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NW. Identification and characterization of nesfatin-1

immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa.

Endocrinology. 150 (1): 232-238. 2009.

14. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 391(1): 1039-1042. 2010.

15. Abaci A, Catli G, Anik A, Kume T, Bober E. The relation of serum nesfatin-1 level with metabolic and clinical parameters in obese and healthy children. *Pediatr Diabetes*. 14(3): 189-95. 2013.

16. Zhang Z, Li L, Yang M, Liu H, Boden G, Yang G. Increased plasma levels of nesfatin-1 in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 120(2): 91-5. 2012.

17. Anwar GM, Yamamah G, Ibrahim A, El-Lebedy D, Farid TM, Mahmoud R. Nesfatin-1 in childhood and adolescent obesity and its association with food intake, body composition and insulin resistance. *Regul Pept*. 188: 21-4. 2014.

18. Guo Y, Liao Y, Fang G, Dong J, Li Z. Increased nucleobindin-2 (NUCB2) transcriptional activity links the regulation of insulin sensitivity in Type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest*. Nov, 36(10): 883-8. 2013.

19. Yang M, Zhang Z, Wang C, Li K, Li S, Boden G, Li L, Yang G. Nesfatin-1 action in the brain increases insulin sensitivity through Akt/AMPK/TORC2 pathway in diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 61: 1959–1968. 2012.

20. Wu D, Yang M, Chen Y, Jia Y, Ma ZA, Boden G, Li L, Yang G. Hypothalamic nesfatin-1/NUCB2 knockdown augments hepatic gluconeogenesis that is correlated with inhibition of mTOR–STAT3 signaling pathway in rats. *Diabetes*. 63: 1234–1247. 2014.
21. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 1;391(1):1039-42. 2010.
22. Nakata M, Manaka K, Yamamoto S, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca²⁺ influx through L-type channels in mouse islet. *BETA-cells Endocr J*. 58(4): 305-313. 2011.
23. Shimizu H. and A Osaki. Nesfatin/Nucleobindin-2 (NUCB2) and Glucose Homeostasis. *Curr Hypertens Rev*. Jul 1. 2014.
24. Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*. 96: 329-339. 1999.
25. Foo KS, Brauner H, Ostenson CG, Broberger C. Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *J Endocrinol*. 204(3): 255-263. 2010.
26. R Gonzalez, A Tiwari, S Unniappan. Pancreatic beta cells colocalize insulin and nesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun*. 381(4): 643-648. 2009.

27. Riva M, Nitert MD, Voss U, Sathanoori R, Lindqvist A, Ling C, Wierup N. Nesfatin-1 stimulates glucagon and insulin secretion and beta cell NUCB2 is reduced in human type 2 diabetic subjects. *Cell Tissue Res.* 346: 393–405. 2011.
28. Santoso P, Nakata M, Shiizaki K, Boyang Z, Parmila K, Otgon-Uul Z, Hashimoto K, Satoh T, Mori M, Kuro-O M, Yada T. Fibroblast growth factor 21, assisted by elevated glucose, activates paraventricular nucleus NUCB2/Nesfatin-1 neurons to produce satiety under fed states. *Sci Rep.* Apr 4;7:45819. 2017
29. Yada T, Sakurada M, Ihida K, Nakata M, Murata F, Arimura A, Kikuchi M. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is an extraordinarily potent intra-pancreatic regulator of insulin secretion from islet beta-cells. *J Biol Chem.* 269(2):1290-3. 1994.
30. Nakata M, Yada T. Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca²⁺ oscillation in islet beta-cells via CB1 receptors. *Regul Pept.* Jan 10;145(1-3):49-53. 2008.
31. Gonzalez R, Reingold BK, Gao X, Gaidhu MP, Tsushima RG, Unniappan S. Nesfatin-1 exerts a direct, glucose-dependent insulinotropic action on mouse islet β - and MIN6 cells. *J Endocrinol.* 208: R9–R16. 2011.
32. Nakata M, Yada T. Role of NUCB2/nesfatin-1 in glucose control: diverse functions in islets, adipocytes and brain. *Curr Pharm Des.* 19(39): 6960-5. 2013.

33. Inagaki N, Gono T, Clement JP4th, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of KATP: An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*. 270: 1166-1170. 1995.
34. Sanchis D, Fleury C, Chomiki N, Gubern M, Huang Q, Neverova M, Grégoire F, Easlick J, Raimbault S, Lévi-Meyrueis C, Miroux B, Collins S, Seldin M, Richard D, Warden C, Bouillaud F, Ricquier D. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem*. Dec 18;273(51):34611-5. 1998.
35. Y. Hong, B.D. Fink, J.S. Dillon, W.I. Sivitz. Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells. *Endocrinology*. 142: 249-256. 2001.
- 36.S. Krauss, C.Y. Zhang, L. Scorrano, L.T. Dalgaard, J. St-Pierre, S.T. Grey, B.B. Lowell. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest*. 112: 1831-1842. 2003.
- 37.C.Y. Zhang, G. Baffy, P. Perret, S. Krauss, O. Peroni, D. Grujic, T. Hagen, A.J. Vidal-Puig, O. Boss, Y.B. Kim, X.X. Zheng, M.B. Wheeler, G.I. Shulman, C.B. Chan, B.B.Lowell. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*. 105: 745-755. 2001.
- 38.C.B. Chan, D.DeLeo, J.W. Joseph, T.S. McQuaid, X.F. Ha, F. Xu, R.G.

Tsushima, PS, Pennefathner, A.M. Salapatek, M.B. Wheeler. Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion-mechanism of action. *Diabetes*. 50: 1302-1310. 2001.

39. Milne HM, Burns CJ, Squires PE, Evans ND, Pickup J, Jones PM, Persaud SJ. Uncoupling of nutrient metabolism from insulin secretion by overexpression of cytosolic phospholipase A(2). *Diabetes*. Jan;54(1):116-24. 2005.

40. Otani K, Kulkarni RN, Baldwin AC, Krutzfeldt J, Ueki K, Stoffel M, Kahn CR, Polonsky KS. Reduced β -cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in IRKO mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 286: 41-49. 2004.

41. Inoue R, Shirakawa J, Togashi Y, Terauchi Y. Functional Role and Mechanism of UCP2 Upregulation in Pancreatic β Cells. *Diabetes*. Jul: 67. 2018.

42. Christopher, J. R. Type 2 Diabetes-a Matter of β -cell Life and Death? *Science*. 307: 380-384, 2005.

43. Terauchi Y. Takemoto I. Kubota N. Matsui J. Suzuki R. Komeda K. Hara A. Toyoda Y. Miwa I. Aizawa S. Tsutsumi S. Tsubamoto Y. Hashimoto S. Eto, K. Namura A. Noda M. Tobe K. Aburatani H. Nagai R. & Kadowaki, T. Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory β cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 117:

246-257. 2007.

44. Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, Kern W, Hillhouse EW, Lehnert H, Tan BK, Randeve HS. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology*. Jul;151(7):3169-80. 2010

45. Li QC, Wang HY, Chen X, Guan HZ, Jiang ZY. Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrient-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. *Regul Pept*. 159:72–77. 2010.

46. Wang C, Wang Y, Hu W. Association of the polymorphism in NUCB2 gene and the risk of type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr*. 9:39. 2017.