

課題番号 : 29指1021

研究課題名 : 膵β細胞の維持におけるMek/Erkシグナルの役割の解明と2型糖尿病の根治治療開発に向けた応用

主任研究者名 : 生島 芳子

分担研究者名 : 小林 直樹

キーワード : Mek/Erk シグナル、膵β細胞、インスリン、2型糖尿病

研究成果 :

【研究目的】2型糖尿病は、インスリン標的臓器におけるインスリン抵抗性を背景として膵β細胞における代償的なインスリン分泌増加の不全が必発することから、膵β細胞の維持/破綻に関するシグナル研究は重要である。我々は、膵β細胞特異的インスリン受容体 (IR)/Insulin-like growth factor-1受容体(IGF-1R)欠損マウスにおいて、膵β細胞が重度に障害され、生後早期に重篤な糖尿病を発症することを見出し、糖尿病における膵β細胞でのインスリン作用の低下が、インスリン分泌の低下に寄与していることを示してきた (Ueki et al. Nat Genet 2006)。さらに、インスリン受容体下流の主なシグナル伝達経路である PI3K/Akt 経路を膵β細胞で特異的に欠損したマウスの解析では、前出のマウスに比べて糖尿病発症の表現型は穏やかで、膵島における Erk1/2 のリン酸化レベルが亢進していたことから、膵β細胞では、PI3K/Akt 経路が欠損した状態でも、代償的に Mek/Erk 経路が活性化してある程度膵β細胞が維持される可能性を見出した (Kaneko et al. Cell Metab 2010)。以上を踏まえ、本研究では、膵β細胞特異的 Mek1/2 欠損マウス (MIPCreERT+/Mek1f/f/Mek2KO/KO マウス) を用いて膵β細胞における Mek/Erk 経路の役割を解明すること、そして、Mek/Erk シグナルあるいは膵β細胞特異的 Mek1/2 欠損マウスの解析によって見出される重要な Mek/Erk の下流分子を制御する薬剤の投与によって膵β細胞の機能回復を目指す新たな2型糖尿病の治療戦略を提案していくことを目的としている。

#### 【実施内容】

平成29年度は、膵β細胞特異的 Mek1/2 遺伝子欠損マウスを通常食及び脂肪食負荷の条件で飼育し、経時的に耐糖能試験、インスリン抵抗性試験 (ipGTT, ITT) を行なった。通常食ではコントロール群に比べて、明らかな耐糖能異常は観察されなかった。一方で、タモキシフェン投与による Mek1 欠損誘導後2週間後より高脂肪食を負荷した場合には、随時血糖値の上昇が認められ、随時インスリン値も膵β細胞特異的 Mek1/2 遺伝子欠損マウスで低下傾向を示した。また、高脂肪食負荷19週で行なった ipGTT では、耐糖能異常が観察された。一方、膵β細胞特異的 Mek1/2 遺伝子欠損マウスに3回以上の妊娠負荷をかけた上で ipGTT, ITT を行なったが、同様に妊娠負荷をかけたコントロール群に比べて明らかな差異を認めなかった。続いて、通常食・高脂肪食負荷のマウスから膵臓を摘出し、膵島面積を比較した。通常食条件のマウスでは明らかな耐糖能異常が認められなかったにもかかわらず、通常食22週で解剖したマウスの膵臓では、膵β細胞特異的 Mek1/2 遺伝子欠損マウスにおいて膵島面積が低下していた。TUNEL 染色では明らかな違いを認めなかった一方で、Ki67 染色による増殖能評価では、通常食15週齢で解剖した膵β細胞特異的 Mek1/2 遺伝子欠損マウスで Ki67 陽性 Insulin 陽性細胞が優位に減少しており、これが膵島面積低下の一因であることが考えられた。現在は、高脂肪食負荷マウスの膵臓切片における同様の評価を進めている。また、高脂肪食負荷したマウスの膵β細胞における Mek/Erk 下流分子について探索するために、RNA シークエンス解析を計画しており、このために高脂肪食3週負荷した膵β細胞特異的 Mek1/2 遺伝子欠損マウスより膵島のサンプリングを行った。

また、本研究の最終的な目標は、Mek/Erk シグナルあるいは Mek/Erk の下流分子を制御する薬剤の投与によって膵β細胞の機能回復を目指す新たな2型糖尿病の治療戦略を提案していくことであるが、Mek/Erk シグナルあるいはその下流分子を制御する薬剤の個体への投与は、膵β細胞ばかりでなく、インスリン標的臓器をはじめとする他臓器にも影響を与える可能性があるため、分担研究課題として、Mek2 遺伝子全身欠損マウスを用い、膵β細胞以外のインスリン標的臓器における Mek 分子の役割について検討している。今年度は高脂肪食を長期に負荷して、経時的に ipGTT, ITT を行なった。この結果、長期(12週あるいは18週)に高脂肪食負荷した Mek2 遺伝子全身欠損マウスでは、インスリン抵抗性がやや高まっている傾向が認められた。

Subject No. : 29 指 1021

Title : Significance of MEK/ERK signaling in pancreatic  $\beta$  cell physiology – to develop a novel treatment strategy for type 2 diabetes –

Researchers : Yoshiko Matsumoto Ikushima, Naoki Kobayashi

Key word : MEK/ERK signaling, pancreatic beta cell, insulin, type 2 diabetes

Abstract : **[Background]** In the pathogenesis of type 2 diabetes, an insufficiency of insulin secretion often coincides with peripheral insulin resistance. It is therefore important to understand how pancreatic  $\beta$  cells maintain their mass and functions, in order to develop new diabetes treatment strategies. We have previously characterized the mice with simultaneous abrogation of insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor-1 receptor (IGFR) in  $\beta$  cells, which show a severe diabetes phenotype with hypo-insulinemia due to a marked  $\beta$  cell loss and impaired insulin secretion (Ueki et al. Nat Genet 2006). Consistently, inhibition of class 1A phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), one of the main downstream molecules of insulin receptor signaling, also results in glucose intolerance and reduced insulin secretion in response to glucose, the magnitude of which is, however, milder compared to that of  $\beta$  cell-specific IR / IGFR double knockout mouse (Kaneko et al. Cell Metab 2010). Interestingly, immunoblot of islets isolated from the  $\beta$  cell-specific class 1A PI3K deficient mouse showed higher phosphorylation of ERK, another major downstream molecule of insulin receptor signaling cascade. These data prompted us to investigate the potential roles of MEK/ERK signaling in pancreatic  $\beta$  cells. Our goal is to develop a novel treatment strategy for type 2 diabetes through understanding of the physiological significance of MEK/ERK signaling in  $\beta$  cells.

**[Outline of Results]** To investigate the significance of MEK/ERK signaling in  $\beta$  cells, we generated tamoxifen-inducible  $\beta$  cell-specific *Mek1/2* KO mice (MIPCreERT/*Mek1f/f*/*Mek2ko/ko* mice; DKO mice), in which *Mek1* deletion was induced by tamoxifen injection at 6 weeks after birth. These mice showed normoglycemia on normal chow diet (NCD). In contrast, when fed on high fat diet (HFD), DKO mice developed hyperglycemia with lower insulin level tendency compared to the controls under random-fed conditions, with significant glucose intolerance compared to the controls observed after 19 weeks of HFD feeding. On the other hand, glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) showed no difference in glucose levels between multiparous DKO females (defined as having carried at least three pregnancies) compared to their controls. Islet areas in NCD-fed DKO mouse were smaller compared to those in controls at 22 weeks of age. While TUNEL staining showed no difference in the positive cell rates, the ratio of Ki67+Insulin+ cells was lower in the islets from NCD-fed DKO mice compared to those of controls at 15 weeks of age. Currently we are performing RNA-seq analyses using islets from DKO mice and control mice fed with HFD for 3 weeks to explore the possible target genes of MEK/ERK signaling in  $\beta$  cells. Besides, we have been also studying a systemic *Mek2* deficient mouse model to understand the role of *Mek2* in insulin target organs. ITT and GTT indicated a tendency of higher level of insulin resistance in *Mek2* deficient mice compared to the controls fed with HFD for 12 weeks or 18 weeks.

Researchers には、分担研究者を記載する。

課題番号 : 29指1021

研究課題名 : 膵β細胞の維持におけるMek/Erkシグナルの役割の解明と2型糖尿病の根治治療開発に向けた応用

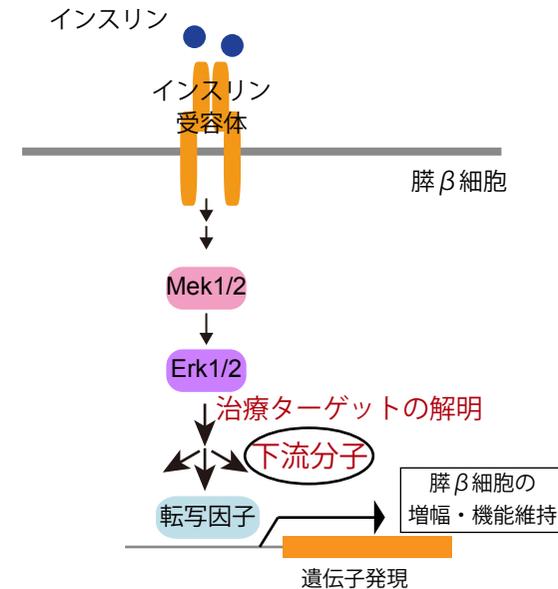
主任研究者名 : 生島 芳子

分担研究者名 : 小林 直樹

## 研究概要と目的

- 目的:
- 膵β細胞におけるMek/Erk経路の役割を解明する
  - Mek/Erkシグナルをターゲットとし、膵β細胞の数・機能を維持・回復させて2型糖尿病根治を目指す新たな治療戦略の基盤を確立する

- 方法:
- 膵β細胞特異的Mek1/2遺伝子欠損マウス (MIPCreERT+/Mek1f/f/Mek2ko/koマウスに6週齢にてTmx投与しMek1欠損誘導)の解析
  - Mek2遺伝子全身欠損マウスの解析
  - Mek/Erkおよびその下流分子の薬剤制御による、膵β細胞維持・回復についての検討 (*in vitro*, *in vivo*)

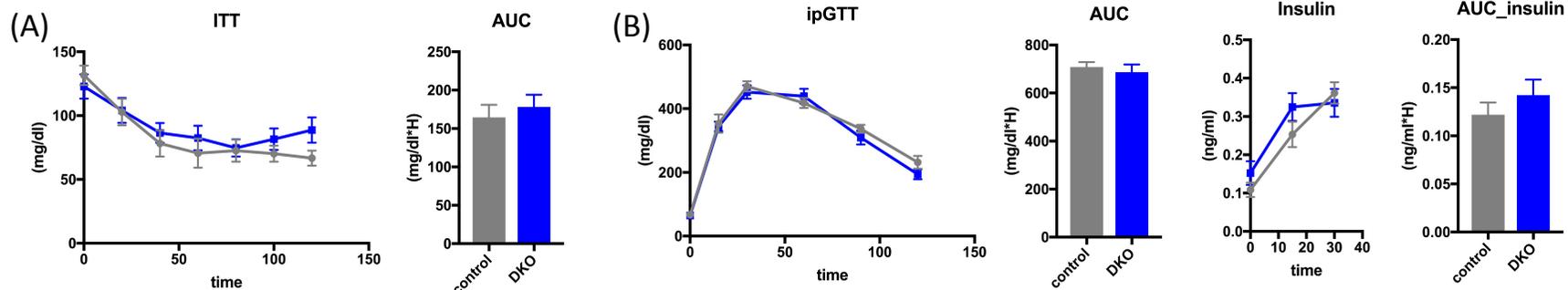


研究成果①通常食において、膵β細胞特異的Mek1/2遺伝子欠損マウスでは耐糖能異常を認めなかった

(A) 11週齢におけるインスリン抵抗性試験 (インスリン: 1U/g-BW)

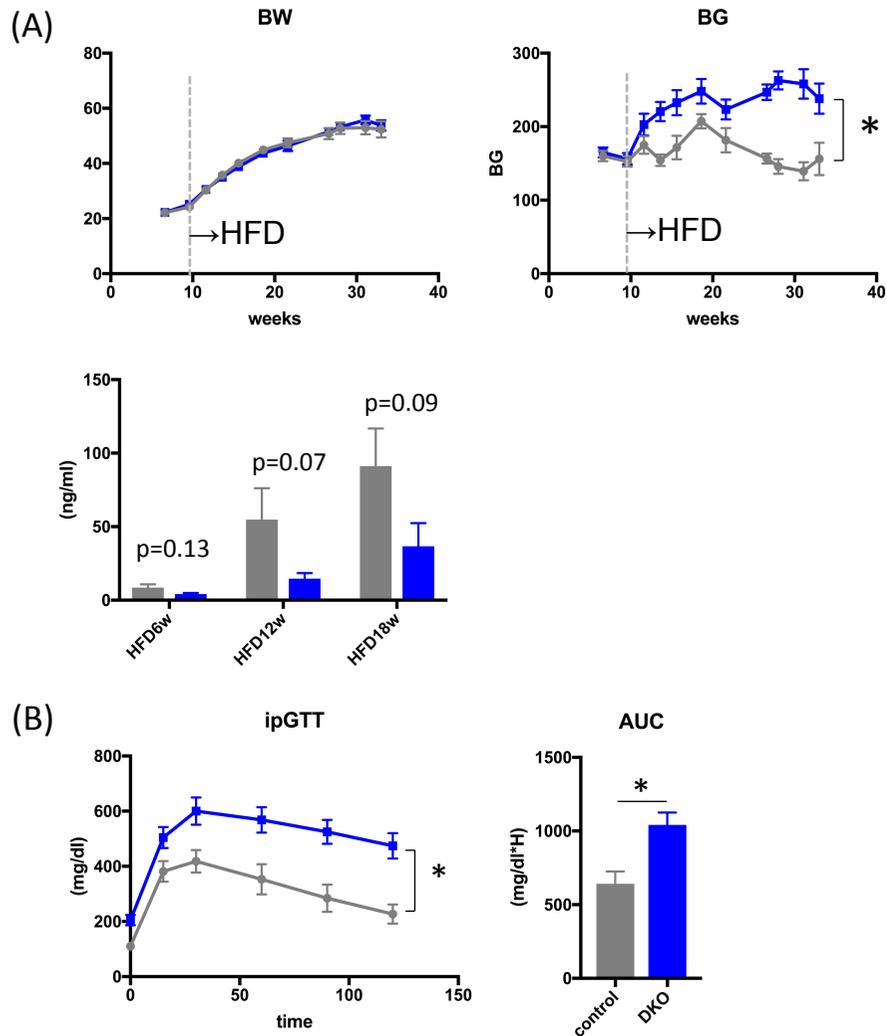
(B) 12週齢における耐糖能試験 (ipGTT) (グルコース: 2g/g-BW)

■ Control  
■ DKO



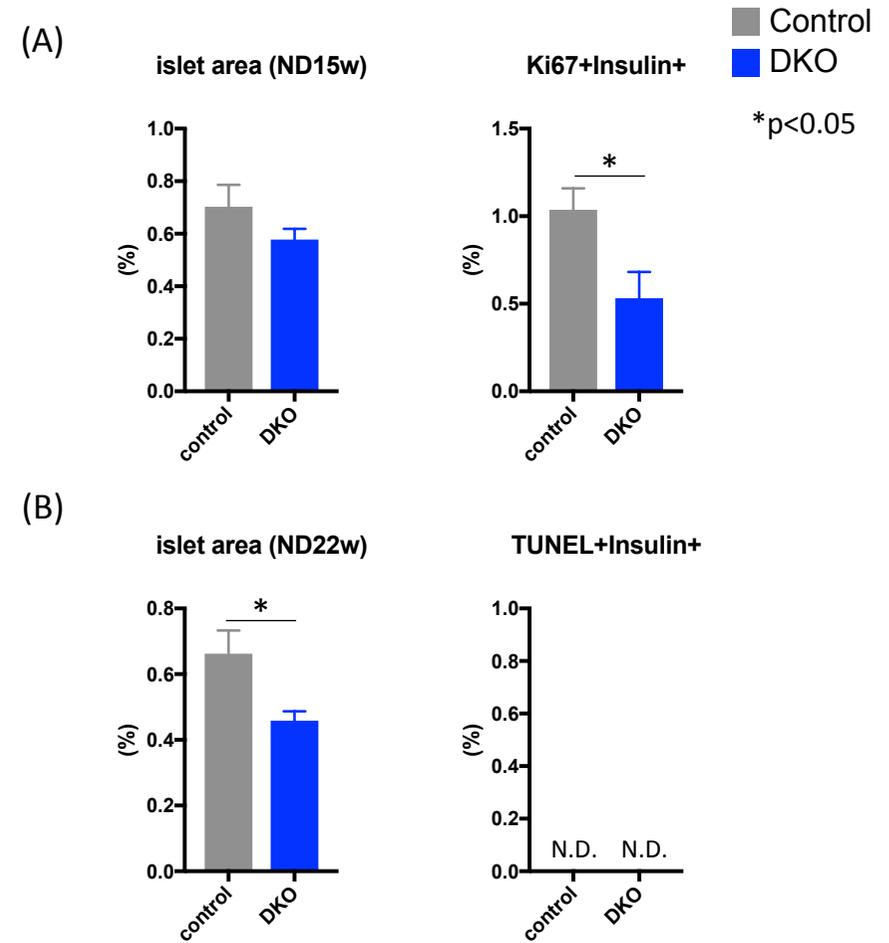
研究成果②高脂肪食 (HFD) 負荷時、膵β細胞特異的Mek1/2遺伝子欠損マウスでは随時血糖値の上昇・随時インスリン値の低下傾向・耐糖能異常を呈した

- (A) HFD負荷時の体重(BW), 随時血糖値(BG), 随時インスリン値の推移
- (B) HFD19週負荷におけるipGTT (グルコース: 1g/g-BW)



研究成果③通常食の膵β細胞特異的Mek1/2遺伝子欠損マウスでは、膵島面積の低下とKi67+Insulin+細胞(増殖細胞)の低下を認めた

- (A) 通常食15週齢マウスの膵臓断面におけるislet areaとKi67+Insulin+細胞の割合
- (B) 通常食22週齢マウスの膵臓断面におけるislet areaとTUNEL+Insulin+細胞の割合



課題番号 : 29指1021

研究課題名 : Mek2 全身欠損マウスにおいてインスリン感受性が高まる原因の解明と応用

主任研究者名 : 生島 芳子

分担研究者名 : 小林 直樹

キーワード : Mek/Erk シグナル、Mek2、インスリン標的臓器、インスリン抵抗性、2型糖尿病  
研究成果 :

【研究目的】2型糖尿病は、インスリン標的臓器におけるインスリン抵抗性を背景として膵β細胞における代償的なインスリン分泌増加の不全が必発することから、膵β細胞の維持/破綻に関するシグナル研究は重要である。我々は、膵β細胞特異的インスリン受容体 (IR)/Insulin-like growth factor-1受容体(IGF-1R)欠損マウスにおいて、膵β細胞が重度に障害され、生後早期に重篤な糖尿病を発症することを見出し、糖尿病における膵β細胞でのインスリン作用の低下が、インスリン分泌の低下に寄与していることを示してきた (Ueki et al. Nat Genet 2006)。さらに、インスリン受容体下流の主なシグナル伝達経路である PI3K/Akt 経路を膵β細胞で特異的に欠損したマウスの解析では、前出のマウスに比べて糖尿病発症の表現型は穏やかで、膵島における Erk1/2 のリン酸化レベルが亢進していたことから、膵β細胞では、PI3K/Akt 経路が欠損した状態でも、代償的に Mek/Erk 経路が活性化してある程度膵β細胞が維持される可能性を見出した (Kaneko et al. Cell Metab 2010)。以上を踏まえ、本研究班全体の目的は、膵β細胞特異的 Mek1/2 欠損マウスを用いて膵β細胞における Mek/Erk 経路の役割を解明すること、そして、Mek/Erk シグナルあるいは膵β細胞特異的 Mek1/2 欠損マウスの解析によって見出される重要な Mek/Erk の下流分子を制御する薬剤の投与によって膵β細胞の機能回復を目指す新たな2型糖尿病の治療戦略を提案していくことである。この際、Mek/Erk シグナルあるいはその下流分子を制御する薬剤の個体への投与は、膵β細胞ばかりでなく、インスリン標的臓器をはじめとする他臓器にも影響を与える可能性がある。このため、分担研究課題として、Mek2 全身欠損マウスを用い、膵β細胞以外のインスリン標的臓器における Mek 分子の役割について検討を進めている。

【実施内容】昨年度までに、通常食及び6週間高脂肪食負荷した Mek2 全身欠損マウスでは、インスリン感受性が高まっていることを示すデータが得られていた。このため本年度は、更に長期間高脂肪食負荷したマウスにおける耐糖能とインスリン感受性についても検討をしたところ、長期(12週あるいは18週)に高脂肪食負荷した Mek2 全身欠損マウスでは、インスリン抵抗性の改善は見られず、むしろインスリン抵抗性が高まっている傾向が認められた。これに伴い、耐糖能試験でも、血糖値・インスリン値がコントロール群に比べて上昇している傾向が認められた。そこで、これらのマウスにおけるインスリン作用臓器におけるインスリンへの反応性を確認するために、21週高脂肪食負荷した Mek2 全身欠損マウス及びコントロールマウスについて、16時間の絶食後、麻酔下で下大静脈にインスリン投与し、精上脂肪・筋肉・肝臓のサンプリングを行った。今後は、引き続き Mek2 全身欠損マウスの耐糖能・インスリン感受性についてマウスをフォローアップし確認していく。また、解剖サンプルについて、インスリン刺激への反応性の指標となる Akt のリン酸化状態を評価するとともに、インスリン感受性制御因子の発現状況の検証を進める。通常食・短期高脂肪食負荷マウスについても絶食下でインスリン刺激してインスリン作用臓器のサンプリングを行い、同様の解析を進めて長期高脂肪食負荷マウスからのサンプルと比較評価していきたい。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指1021

研究課題名：膵β細胞の維持におけるMek/Erkシグナルの役割の解明と2型糖尿病の根治治療開発に向けた応用

主任研究者名：生島芳子

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
(投稿中) Hepatic Activin B controls glucose metabolism				
The RNA Methyltransferase Complex of WTAP, METTL3, and METTL14 Regulates Mitotic Clonal Expansion in Adipogenesis.	Kobayashi M, et al.	Mol. Cel. Biol.	in press	2018
Hepatic IRS1 and β-catenin expression is associated with histological progression and overt diabetes emergence in NAFLD patients.	Enooku K, et al.	J Gastroenterol.	in press	2018
Effect of an intensified multifactorial intervention on cardiovascular outcomes and mortality in type 2 diabetes (J-DOIT3): an open-label, randomised controlled trial.	Ueki K, et al.	Lancet Diabetes Endocrinol.	5(12):951-964.	2017
CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors.	Nawaz A, et al.	Nat. Commun.	8(1):286	2017
Dual Regulation of Gluconeogenesis by Insulin and Glucose in the Proximal Tubules of the Kidney.	Sasaki et al.	Diabetes	66(9):2339-2350.	2017

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
インターロイキン27の腸内細菌叢を介した糖尿病発症抑制機序の解明と治療への応用	諏訪内浩紹	第61回 日本糖尿病学会年次学術集会	東京	2018年5月
Activin B - Fstl3 Axis Regulates Glucose Metabolism	小林直樹	第61回 日本糖尿病学会年次学術集会	東京	2018年5月
インターロイキン27の腸内細菌叢を介した糖尿病発症抑制機序の解明と治療への応用	諏訪内浩紹	日本内分泌学会学術総会	宮崎	2018年5月
インターロイキン27の腸内細菌叢を介した糖尿病発症抑制機序の解明と治療への応用	諏訪内浩紹	日本成人病学会	東京	2018年1月
Activin B/FSTL3 axis controls glucose homeostasis	植木浩二郎	第38回日本肥満学会	大阪	2017年10月
Activin Bによる糖・エネルギー代謝制御機構の解明	小林直樹	第6回 Front Runner of Future Diabetes Research (FFDR) 研究発表会	東京	2017年7月
J-DOIT: a multifactorial intervention trial for prevention of macrovascular complications and mortality	植木浩二郎	53rd EASD Annual Meeting	リスボン (ポルトガル)	2017年8月
Activin/Fstl3 による糖代謝制御機構	小林直樹	第31回 糖尿病肥満動物学会	横浜市	2017年2月
Role of Activin B as a novel hepatokine in the regulation of glucose homeostasis.	植木浩二郎	The Max Planck Institute for Metabolism Research	ケルン (ドイツ)	2017年1月
Activin/Fstl3 による糖代謝制御機構	小林直樹	第28回分子糖尿病学シンポジウム	富山	2016年12月
Role of activating B/FSTL3 axis in the control of glucose homeostasis	植木浩二郎	11th IDF-WPR Congress/8th AASD Scientific Meeting	台北 (台湾)	2016年10月

研究発表及び特許取得報告について

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
「糖尿病と糖尿病合併症」	植木浩二郎	夢のメディ神殿 2018	BS日テレ	2018年1月14日

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。