

グルカゴン分泌・糖代謝を正常に保つための膵 α 細胞における小胞体機能の重要性

- α 細胞特異的 X-box binding protein 1 (XBP1) 欠損モデルを用いた解析 -

秋山 優

山口大学大学院医学系研究科・医学部 病態制御内科学(第三内科)

要旨

2型糖尿病患者では高血糖状態が存在するにも関わらず、しばしば高グルカゴン血症を認めることが報告されてきた。このメカニズムは不明であるが、2型糖尿病患者では β 細胞のみならず α 細胞機能の障害を有することが示唆される。近年、2型糖尿病患者において小胞体ストレス・小胞体ストレス応答障害が β 細胞機能障害を惹起する因子として関与していることが明らかになってきた。しかし、 α 細胞における小胞体ストレス・小胞体ストレス応答障害の影響については不明である。X-box binding protein 1 (XBP1) は小胞体ストレス応答において重要な役割をもつ転写因子であり、これまでに β 細胞特異的XBP1欠損マウスはインスリン分泌が障害され、耐糖能異常を来することが報告されている。今回、我々は α 細胞における小胞体ストレスの影響を調べるため、 α 細胞特異的XBP1欠損(α XBPKO)マウスを作成した。また細胞レベルでのより詳細なメカニズムについて検討するため膵 α 細胞株である α TC6細胞を用いてXBP1ノックダウン α TC6(α XBPKD)細胞も作成した。興味深いことに α XBPKOマウスは高血糖状況下でのグルカゴン分泌抑制が認められず、その結果、耐糖能異常を来した。また α XBPKOマウスの膵 α 細胞では小胞体の著しい拡張を認め、小胞体ストレスが惹起されていることが示唆された。 α XBPKD細胞を用いたXBP1欠損状態での小胞体ストレス応答シグナルの検討では、XBP1活性化の役割をもつinositol-requiring enzyme 1 (IRE1)の活性化が認められた。その結果、 α XBPKD細胞ではJun NH2-terminal kinase (JNK)の活性化を介したインスリンシグナル障害が惹起され、高血糖状態下でのインスリンによるグルカゴン分泌抑制メカニズム障害が惹起されていた。これは α XBPKOマウスで得られた結果と矛盾しないものである。これらの結果は膵 α 細胞における小胞体ストレス、もしくは小胞体ストレス応答異常がインスリンシグナル障害を介したグルカゴン分泌調節不全の原因となり、結果的に耐糖能異常を来することを示唆するものである。また同時に糖代謝を正常に保つ上で α 細胞の小胞体機能の重要性を示唆するものである。

内容 (背景・方法)

2型糖尿病患者では膵 β 細胞機能障害・細胞量の減少によるインスリン作用不足に加え、グルカゴン分泌が亢進していることも報告されており[1]、過剰なグルカゴン分泌もまた高血糖を助長する一因となっている。これは2型糖尿病患者において β 細胞のみならず α 細胞機能障害も存在することを示唆するものである。 α 細胞からのグルカゴン分泌を調節する因子としてはグルコースに加え α 細胞におけるインスリンシグナルが重要であることが報告されている[2]。同時に α 細胞におけるインスリンシグナル障害はグルカゴン過剰分泌を誘導し、その結果、耐糖能異常をきたす[2]。

近年、2型糖尿病患者において小胞体ストレスが β 細胞機能障害・細胞量減少を誘導する因子として関与していることが明らかになってきたが[3][4]、 α 細胞における小胞体ストレス・小胞体ストレス応答障害の影響については不明であった。小胞体ストレスに対して生体内では小胞体ストレス応答(unfolded protein response: UPR)により対処する。小胞体ストレスを感知する蛋白質の一つであるinositol-requiring enzyme 1 (IRE1)は転写因子であるX-box binding protein 1 (XBP1)を活性化することで分泌蛋白のフォールディングや輸送を担う小胞体シャペロン遺伝子の発現誘導を惹起し、結果的に小胞体ストレスを軽減する。つまりXBP1は小胞体ストレス応答において重要な役割をもつ転写因子であり、これまでに β 細胞特異的XBP1欠損マウスは β 細胞機能障害の結果、インスリン分泌が障害され、耐糖能異常を来することが報告されている[5]。

今回、我々は α 細胞における小胞体ストレスの影響を調べるため、 α 細胞特異的XBP1欠損(α XBPKO)マウス、またin vitroモデルとしてXBP1ノックダウン α 細胞株を作成した。 α XBPKOマウスはXbp1floxマウス[5]とグルカゴン-Creマウス[2]を交配することで作成した。XBP1ノックダウン α 細胞株はマウスXBP1 short hairpin RNA (shRNA)をレンチウイルスベクター(Open Biosystemsから購入)を用いて α TC6細胞株に導入することで作成した。in vivo実験として α XBPKOマウスの耐糖能検査、グルカゴン分泌を測定し、 α 細胞でのXBP1欠損が糖代謝に与える影響について検討した。また組織学的検査、電子顕微鏡を用いた解析にてXBP1欠損が α 細胞の生存に与える影響、また小胞体を含めた細胞内小器官の変化について検討した。in vitro実験としてはUPR、インスリンシグナルに関わる蛋白質の発現についてSDS-PAGE、ウェスタンブロッティングにより検討した。

結果

α 細胞特異的なXBP1欠損はグルカゴン分泌調節不全による耐糖能異常、インスリン抵抗性の原因となる。 α XBPKOマウスの体重、随時血糖値・インスリン・グルカゴン値は野生型マウスと比較し差は認めなかった(Fig. 1A-D)。しかし、 α XBPKOマウスは耐糖能異常(Fig. 1E)、インスリン抵抗性(Fig. 1F)を示した。この時、腹腔内グルコース負荷により野生型マウスでは有意なグルカゴン分泌抑制が認められたのに対し、 α XBPKOマウスではグルカゴン分泌抑制が認められなかった(Fig. 1G)。インスリン分泌に関しては違いを認めなかった(Fig. 1H)。次に、単離ラ氏島を用いてグルカゴン・インスリン分泌について検討した。in vivo実験の結果と同様に野生型マウスの単離ラ氏島では高グルコース濃度の状況下(16.7 mmol/L)にてグルカゴン分泌は抑制されたが、 α XBPKOマウスの単離ラ氏島ではグルカゴン分泌は抑制されなかった(Fig. 1I)。尚、インスリン分泌や単離ラ氏島のインスリン・グルカゴン含量については両者に差は認められなかった(Fig. 1J-L)。これらの結果は、 α 細胞でのXBP1欠損はグルカゴン分泌調節不全によりグルコースホメオスタシスの異常につながることを示唆するものである。

膵 α 細胞でのXBP1欠損は小胞体ストレスの原因となるがラ氏島の構造には影響を与えない。 α XBPKOマウスの膵ラ氏島を組織学的に検討したが、野生型マウスのラ氏島構造と変化はなく、正常な構造であった(Fig. 2A, B)。 α 細胞のアポトーシスについて検討するため、TUNEL染色も施行したが α XBPKOマウスと野生型マウスに差は認めなかった(data not shown)。次に α 細胞で

Fig. 1.

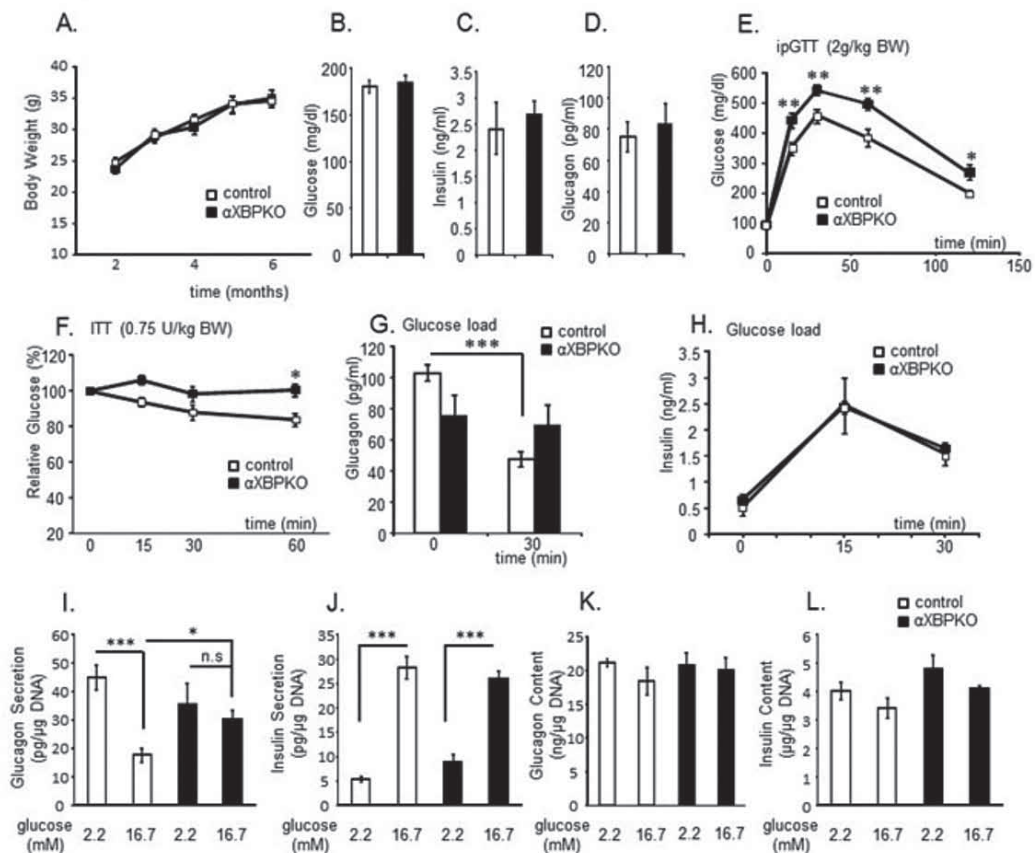


Figure 1. α 細胞特異的XBP1欠損は耐糖能異常、インスリン抵抗性、高グルカゴン血症を惹起する
(A) Body weights. $n = 6-10$ in each group. (B) Non-fasting blood glucose, (C) Non-fasting insulin, and (D) non-fasting glucagon in 6-month-old male mice. $n = 6$ in each group. (E) Intraperitoneal glucose tolerance (glucose 2 g/kg bw) in 6-month-old male mice. $n = 6$ in each group. (F) Whole-body insulin sensitivity (insulin 0.75 U/kg bw) in 6-month-old male mice. $n = 7-11$ in each group. (G) Plasma glucagon levels before and after intraperitoneal glucose injection (glucose 2 g/kg bw) in 6-month-old male mice. $n = 7$ in each group. (H) Plasma insulin levels before and after intraperitoneal glucose injection (glucose 2 g/kg bw) in 6-month-old male mice. $n = 7$ in each group. (I) Glucagon, and (J) Insulin secretion from islets were expressed per μ g of total DNA. $n = 3-4$ in each group. (K) Total glucagon, and (L) total insulin content of islets expressed per μ g of total DNA, $n = 3-4$ in each group.
Control, empty box; α XBPKO, filled box. Data are expressed as means $\pm$ SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and n.s., not significant; control versus α XBPKO.

のXBP1欠損が小胞体ストレスの原因となっている可能性について検討するため、電子顕微鏡を用いて細胞内小器官の構造を調べた。その結果、 α XBPKOマウスでは約70%の α 細胞において野生型マウスと比較し、小胞体は著しく拡張・膨化していた (Fig. 2C, D)。これらの結果は α XBPKOマウスの α 細胞では小胞体ストレスが誘導されていることを示唆するものである。

XBP1欠損はIRE1 α リン酸化(活性化)とJNKの活性化を誘導する。

α 細胞におけるXBP1欠損がグルカゴン分泌調節不全を誘導するメカニズムについて検討するため、XBP1ノックダウン α TC6細胞株(α XBP1KD細胞)を作成した。ノックダウンの効率はウエスタンブロッティングにより検討した。 α XBPKD細胞では小胞体ストレスを誘導するタブシガルジン処理した後の活性型XBP1であるspliced XBP1 (XBP1s)の発現はコントロールと比較し85%減少していた (Fig. 3A)。

Fig. 2.

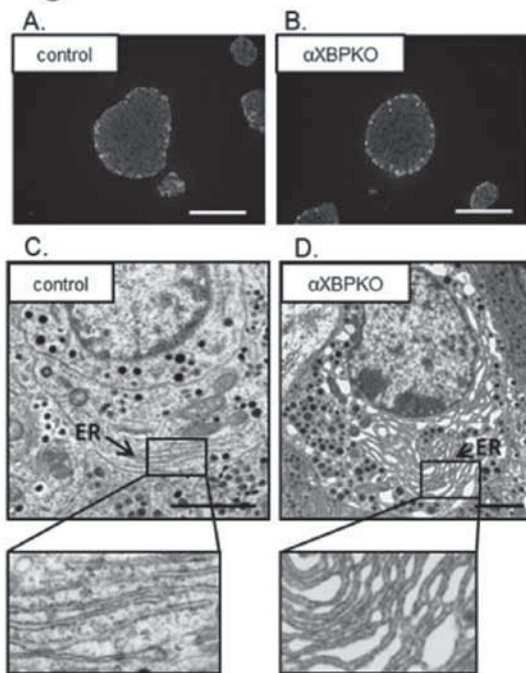


Figure 2. α 細胞特異的XBP1欠損は小胞体ストレスを誘導するが細胞死にはつながらない
Immunofluorescence staining (shown by gray scale) for insulin, glucagon and somatostatin of pancreatic sections from control mice (A) and α XBPKO mice (B) at 6 months of age, scale bar 200 μ m.
Ultrastructural analysis of pancreatic α -cells using electron microscopy was performed on islets from control (C) and α XBPKO (D) mice at 6 months of age, scale bar 2 μ m.

次にUPRに関連する蛋白の発現についてウェスタンブロッティングにより検討した。その結果、XBP1sの下流のターゲットであるBiPの発現は α XBPKO細胞で減少していた (Fig. 3B, C)。しかし、XBP1の上流にありXBP1の活性化の役割を担うpIRE1 α の発現は亢進していた (Fig. 3B, C)。これらの結果は α 細胞においても、これまでに報告されている β 細胞同様に[5]、XBP1とIRE1 α の間にフィードバックメカニズムによる調節機構が存在することを示すものである。その他のUPRのマーカーとしては α XBPKO細胞ではATF6の活性化は亢進し、pPERKは減少していた (Fig. 3A-C)。これまでに小胞体ストレスがJNKの活性化を誘導することが報告されているため[6]、 α XBPKO細胞におけるpJNKの発現について検討した。その結果、 α XBPKO細胞ではコントロールと比較し、pJNKの発現は亢進していた (Fig. 3B, C)。従って、これらの結果より α 細胞においても、他の細胞同様にXBP1欠損はIRE1 α の活性化とJNKの活性化を誘導することが示された。

XBP1欠損はインスリンシグナル障害・インスリンによるグルカゴン分泌抑制の障害を来す。次にJNKの活性化がインスリンシグナルに与える影響について検討した。IRS1のセリンリン酸化はIRS1シグナルに抑制的に働くことが報告されているが[7]、 α XBPKO細胞ではIRS1のセリンリン酸化がコントロール細胞と比較して亢進していた (Fig. 4A, B)。対照的にIRS1シグナルに促進的に働くIRS1チロシンリン酸化は α XBPKO細胞で減少していた。最終的に α XBPKO細胞におけるAktのスレオニン・セリンリン酸化は共に顕著に減少していた (Fig. 4A, B)。

α 細胞におけるインスリンシグナル障害はグルカゴン分泌促進的に働くことから[2]、ここで α XBPKO細胞ではインスリンによるグルカゴン分泌抑制が障害されていると考えた。この仮説を証明するため α XBPKO細胞からのグルカゴン分泌について検討した。まずコントロール細胞からのグルカゴン分泌は0.5もしくは25 mmol/Lグルコース濃度と比較し、5.5 mmol/Lのグルコース濃度で最も低値であった (Fig. 4C)。また25 mmol/Lの高グルコース濃度の状況下ではインスリンによりグルカゴン分泌が抑制された (Fig. 4C)。これらの結果は過去の報告と同様であった[8] [9]。しかしながら α XBPKO細胞では高グルコース状況下でのインスリンによるグルカゴン分泌抑制は認められなかった (Fig. 4C)。

α XBPKOマウスでの結果と併せて、これらの結果は α 細胞でのXBP1欠損はインスリンシグ

Fig. 3.

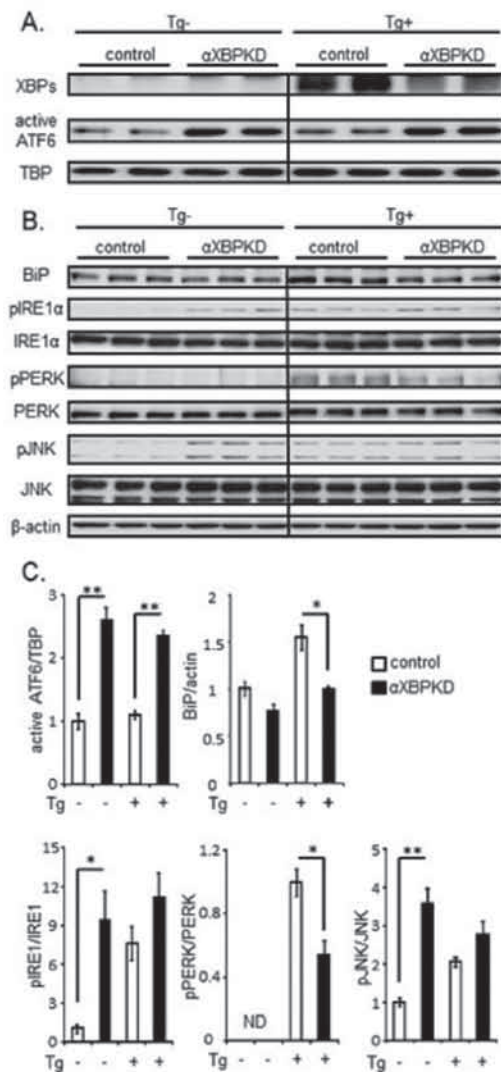


Figure 3. XBP1欠損によるIRE1の活性化はJNKの活性化を惹起する

(A) Western blotting for spliced XBP1, active ATF6 and TBP (loading control) in control or αXBPKD cell lines before and after Thapsigargin treatment for 4 hr (Tg, 100 nM) using nuclear fractions. (B) Western blotting for BiP, pIRE1, IRE1, pPERK, PERK, pJNK, JNK and β-actin (loading control) in control or αXBPKD cell lines before and after Thapsigargin treatment for 4 hr (Tg, 100 nM). (C) Quantification of active ATF6/TBP, BiP/actin, pIRE1/IRE1, pPERK/PERK and pJNK/JNK in control or αXBPKD cell lines.

Data are expressed as means ± SEM; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001; ND, not detected.

Figure 1-4. は
Akiyama M, et al.
Diabetes 2013;62:2439-2449より改変

Fig. 4.

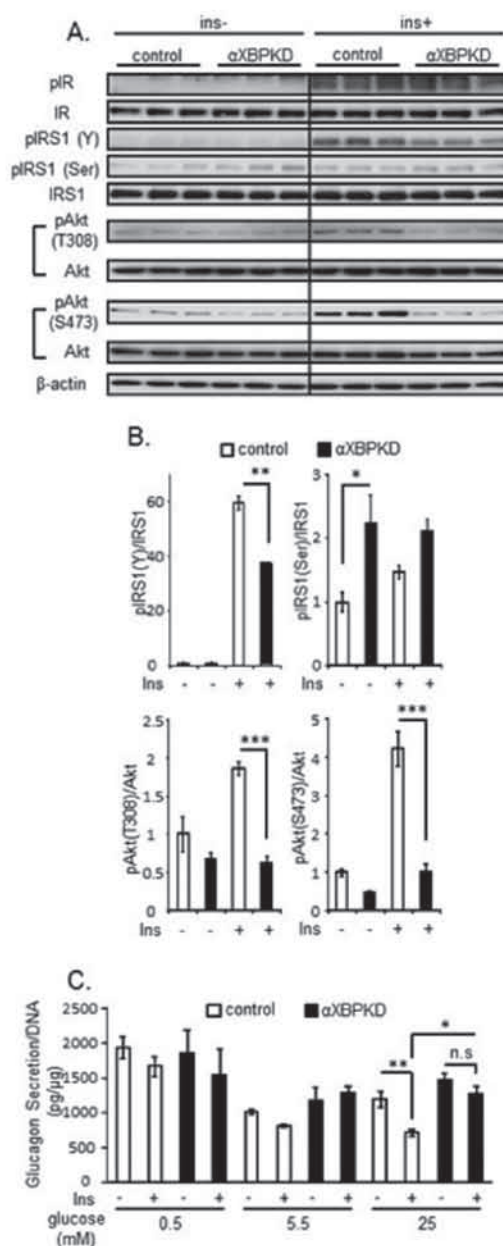


Figure 4. XBP1欠損はインスリンシグナルを障害する

(A) Western blotting for insulin Receptor tyrosine⁹⁷² (Y) phosphorylation (pIR), insulin receptor (IR), IRS1 tyrosine⁸⁹⁶ (Y) phosphorylation, IRS1 Ser³⁰⁷ (Ser) phosphorylation, total IRS1, Akt Thr³⁰⁸ phosphorylation, Akt Ser⁴⁷³ phosphorylation, total Akt and β-actin (loading control) in control or αXBPKD cell lines before and after insulin treatment for 10 min (ins, 100 nM). (B) Quantification of pIRS1(Y)/IRS1, pIRS1(Ser)/IRS1, pAkt(T308)/Akt and pAkt(S473)/Akt in control or αXBPKD cell lines. Data are expressed as means ± SEM; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. (C) Glucagon secretion from control or αXBPKD cell lines was assessed by static incubation for 60 min under various glucose concentration without or with 100 nM insulin and expressed per μg of total DNA. n = 3-6 in each group. Data are expressed as means ± SEM; *P < 0.05, **P < 0.01; n.s., not significant.

ナル障害・インスリンによるグルカゴン分泌抑制の障害を来すことを示すものである。

まとめ

XBP1は α 細胞においてグルカゴン分泌を調節するためインスリンシグナル経路に関連する蛋白と相互に作用していることを見出した。また α 細胞における小胞体ストレスは2型糖尿病における高グルカゴン血症、またグルコースホメオスターシス異常の一因であると考えられた。 α 細胞機能を正常に保ち、グルコースホメオスターシスを維持するためには α 細胞での小胞体機能制御が重要であるという概念が新しい2型糖尿病の治療創薬につながる可能性が示された。

参考文献

1. Unger, R.H., et al., Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. J Clin Invest, 1970. 49(4): p. 837-48.
2. Kawamori, D., et al., Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo. Cell Metab, 2009. 9(4): p. 350-61.
3. Marchetti, P., et al., The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. Diabetologia, 2007. 50(12): p. 2486-94.
4. Eizirik, D.L., A.K. Cardozo, and M. Cnop, The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. Endocr Rev, 2008. 29(1): p. 42-61.
5. Lee, A.H., et al., Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1alpha and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(21): p. 8885-90.
6. Urano, F., et al., Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science, 2000. 287(5453): p. 664-6.
7. Hirosumi, J., et al., A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature, 2002. 420(6913): p. 333-6.
8. Salehi, A., E. Vieira, and E. Gylfe, Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations. Diabetes, 2006. 55(8): p. 2318-23.
9. Kisanuki, K., et al., Expression of insulin receptor on clonal pancreatic alpha cells and its possible role for insulin-stimulated negative regulation of glucagon secretion. Diabetologia, 1995. 38(4): p. 422-9.

発表業績一覧

論文

X-box binding protein 1 is essential for insulin regulation of pancreatic α -cell function.

Akiyama M, Liew CW, Lu S, Hu J, Martinez R, Hambro B, Kennedy RT, Kulkarni RN.
Diabetes. 2013 Jul;62(7):2439-49.

Altered insulin receptor signalling and β -cell cycle dynamics in type 2 diabetes mellitus.

Folli F, Okada T, Perego C, Gunton J, Liew CW, **Akiyama M**, D'Amico A, La Rosa S, Placidi C, Lupi R, Marchetti P, Sesti G, Hellerstein M, Perego L, Kulkarni RN.
PLoS One. 2011;6(11):e28050.

Growth factor signalling in the regulation of α -cell fate.

Kawamori D, **Akiyama M**, Hu J, Hambro B, Kulkarni RN.
Diabetes Obes Metab. 2011 Oct;13 Suppl 1:21-30.

学会発表

American Diabetes Association Meeting : 71st Scientific Sessions (2011)

Beneficial Effects of Pioglitazone/Alogliptin Combination Therapy on Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes Mellitus

Abstract Number : 1028-P

Authors : **Masaru Akiyama**, Dan Kawamori, Ben Hambro, Mardelle Rosales, Rohit N. Kulkarni

Category : Clinical Therapeutics/New Technology - Pharmacologic Treatment of Diabetes or its Complications

American Diabetes Association Meeting: 72nd Scientific Sessions (2012)

The Role of XBP1 in Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic beta-cell

Speaker: **Masaru Akiyama**

Session: Glucagon and Glucagon-Like Peptides—Animals