

学位論文の要旨

Identification of the matricellular protein Fibulin-5 as a target molecule of glucokinase-mediated calcineurin/NFAT signaling in pancreatic islets

(膵島における新規グルコキナーゼ標的分子である Fibulin-5
の同定と発現制御機構の解析)

Tomoko Okuyama

奥山 朋子

Endocrinology and Metabolism
Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻

分子内分泌・糖尿病内科学

(Doctoral Supervisor : Yasuo Terauchi, Professor)

(指導教員 : 寺内 康夫 教授)

学位論文の要旨

Identification of the matricellular protein Fibulin-5 as a target molecule of glucokinase-mediated calcineurin/NFAT signaling in pancreatic islets

(膵島におけるグルコキナーゼを介するカルシニューリン/NFAT シグナルの標的分子としての細胞外マトリックス蛋白 **Fibulin-5** の同定)

【背景・目的】

グルコキナーゼは主に膵 β 細胞および肝に発現する解糖系の律速段階酵素であり、生体内の糖恒常性維持に重要な役割を果たしている。膵 β 細胞においてグルコキナーゼを介したグルコースシグナルはインスリン分泌、膵 β 細胞増殖およびアポトーシスをもたらす (Otonkoski, et al., 1988; Bonner-Weir, et al., 1989)。しかしこの過程の詳細な分子機構は明らかとなっていない。我々はマウス単離膵島において、グルコキナーゼ活性化薬 (GKA) により細胞外マトリックス蛋白である **Fibulin-5** (**Fbln5**) の発現が上昇することをマイクロアレイ解析により同定した。**Fbln5** は弾性線維形成に必須の分泌蛋白であり (Yanagisawa, et al., 2002)、細胞外-細胞内シグナルに関与し、細胞増殖や細胞浸潤に関する機能が報告されている (Schluterman, et al., 2010)。一方、**Fbln5** と糖代謝との関連についてはこれまでに報告がない。本研究では膵島におけるグルコキナーゼを介した **Fbln5** の発現制御機構を解明し、**Fbln5** の糖代謝における役割を明らかにすることを目的とした。

【実験材料と方法】

生後 8 週齢の C57BL/6J マウスより膵島を単離し、GKA および高グルコースで刺激した際の **Fbln5** の遺伝子発現変化をリアルタイム PCR を用いて解析した。ウエスタンブロットにより野生型マウス膵島における **Fbln5** の蛋白発現を検討した。また、ラットインスリノーマ細胞株である INS-1 細胞を用い、高グルコースおよび GKA 刺激による **Fbln5** の蛋白発現変化を検討した。次に糖尿病モデルマウスである高脂肪食負荷マウス、グルコキナーゼヘテロ欠損マウス、*Irs-2* 欠損マウスの単離膵島における GKA 刺激下・非刺激下における **Fbln5** の遺伝子発現変化を解析した。**Fbln5** の発現は胎生期に上昇することが知られており、若齢～

成人期の野生型マウス単離膵島における *Fbln5* 遺伝子発現の変化についても検討を加えた。さらにグルコース-グルコキナーゼシグナル下流の各種阻害薬および *DYRK1A* 阻害薬を用いて、膵島における *Fbln5* の発現制御機構を解析した。*Fbln5* 欠損マウスを入手し、野生型マウスおよび *Fbln5* 欠損マウス膵組織の免疫染色により膵島内における *Fbln5* の局在を確認した。さらに胎生 15 日の *C57BL/6J* マウス膵および *INS-1* 細胞における *Fbln5* の免疫染色を施行した。次に我々は生体内における *Fbln5* の糖代謝への役割の評価として、*Fbln5* 欠損マウスおよびその野生型を用い生後 8 週齢における耐糖能、グルコース応答性インスリン分泌能、膵 β 細胞量、膵 β 細胞増殖能を解析した。加えて、*Fbln5* の膵 β 細胞機能への作用を検討するため、*Fbln5* 発現アデノウイルスベクターおよび対照として *GFP* 発現アデノウイルスベクターを用い、*INS-1* 細胞における *Fbln5* 過剰発現実験を行った。*INS-1* 細胞におけるアデノウイルス感染 48 時間後におけるグルコース応答性インスリン分泌能および細胞増殖能を解析した。

【結果と考察】

マウス単離膵島において、*Fbln5* の遺伝子発現は高グルコースおよび *GKA* 刺激により上昇した。また *GKA* による膵島における *Fbln5* の発現誘導は高脂肪食負荷により増幅し、グルコキナーゼヘテロ欠損では低下した。*Irs-2* 欠損では *GKA* 非刺激下の状態において *Fbln5* の発現が上昇し *GKA* への反応性には乏しかった。これらの結果より、膵島における *Fbln5* は生体レベルで耐糖能に重要であることが示唆された。また、単離膵島におけるグルコースシグナルを介した *Fbln5* の発現誘導は、グルコキナーゼ阻害薬・ K_{ATP} チャンネル阻害薬・ Ca チャンネル拮抗薬、カルシニューリン阻害薬により阻害され、*DYRK1A* 阻害薬により増幅したことから、膵島における *Fbln5* の発現は、膵 β 細胞機能に重要な役割を果たしているグルコキナーゼ/カルシニューリン/NFAT シグナル (Heit, et al., 2006; Goodyer, et al., 2012) により制御されていることが示唆された。免疫染色において、胎生期・成人期ともに膵島内に *Fbln5* の発現を認めた。グルコキナーゼは膵島において主に β 細胞に発現しており、*INS-1* 細胞の免疫染色でも *Fbln5* の発現を認めたことから、*Fbln5* が膵 β 細胞に発現していることが示唆された。

Fbln5 欠損マウスの耐糖能およびインスリン分泌能は生後 8 週齢の時点では野生型マウスと同等であり、また膵 β 細胞量および細胞増殖能についても野生型との間に明らかな差を認めなかった。これらの結果より、非糖尿病状態において *Fbln5* は耐糖能および膵 β 細胞機能に影響を与えていないと考えられた。一方で、*INS-1* 細胞における *Fbln5* 過剰発現により、インスリン分泌は上昇し細胞増殖は低下する傾向を認めた。*Fbln5* の膵 β 細胞における機能

性を示唆する結果であり、細胞外マトリックス蛋白である Fbln5 による膵 β 細胞機能の制御について、今後さらなる解明が望まれる。

【結語】

マウス膵島におけるグルコキナーゼ活性化薬の標的分子として細胞外マトリックス蛋白である Fbln5 を同定し、Fbln5 による膵 β 細胞への機能性が示唆された。

引用文献

Bonner-Weir, S., Deery, D., Leahy, J. L. and Weir, G. C. (1989), Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion, *Diabetes*, 38, 49-53

Goodyer, W. R., Gu, X., Liu, Y., Bottino, R., Crabtree, G. R. and Kim, S. K. (2012), Neonatal beta cell development in mice and humans is regulated by calcineurin/NFAT, *Dev Cell*, 23, 21-34

doi : 10.1016/j.devcel.2012.05.014.

Heit, J. J., Apelqvist, A. A., Gu, X., Winslow, M. M., Neilson, J. R., Crabtree, G. R. and Kim, S. K. (2006), Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function, *Nature*, 443, 345-349

Otonkoski, T., Andersson, S., Knip, M. and Simell, O. (1988), Maturation of insulin response to glucose during human fetal and neonatal development. Studies with perfusion of pancreatic isletlike cell clusters, *Diabetes*, 37, 286-291

Schluterman, M. K., Chapman, S. L., Korpanty, G., Ozumi, K., Fukai, T., Yanagisawa, H. and Brekken, R. A. (2010), Loss of fibulin-5 binding to beta1 integrins inhibits tumor growth by increasing the level of ROS, *Dis Model Mech*, 3, 333-342

doi : 10.1242/dmm.003707

Yanagisawa, H., Davis, E. C., Starcher, B. C., Ouchi, T., Yanagisawa, M., Richardson, J. A. and Olson, E. N. (2002), Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo, *Nature*, 415, 168-171

論文目録

I 主論文 (本人を筆頭とする原著論文)

Identification of the matricellular protein Fibulin-5 as a target molecule of glucokinase-mediated calcineurin/NFAT signaling in pancreatic islets.

Okuyama, T., Shirakawa, J., Yanagisawa, H., Kyohara, M., Yamazaki, S., Tajima, K., Togashi, Y., Terauchi, Y. : *Sci Rep.* 7:2364, 2017.

doi : 10.1038/s41598-017-02535-0.

II 副論文 (原著論文の内容と関係のある論文)

奥山朋子, 寺内康夫 : 「GPR40 作動薬, グルコキナーゼ活性化薬, 11 β -HSD1 阻害薬」; 診断と治療, 診断と治療社, 糖尿病治療 2014, 1341-1345, 2014.

III 参考論文 (原著論文の内容以外の論文)

1. DPP-4 inhibition improves early mortality, β cell function, and adipose tissue inflammation in db/db mice fed a diet containing sucrose and linoleic acid.

Shirakawa, J., Okuyama, T., Kyohara, M., Yoshida, E., Togashi, Y., Tajima, K., Yamazaki, S., Kaji, M., Koganei, M., Sasaki, H., Terauchi, Y. : *Diabetol Metab Syndr.* 8:16, 2016.

doi : 10.1186/s13098-016-0138-4

2. Evaluation of the appropriateness of using glucometers for measuring the blood glucose levels in mice.

Togashi, Y., Shirakawa, J., Okuyama, T., Yamazaki, S., Kyohara, M., Miyazawa, A., Suzuki, T., Hamada, M., Terauchi, Y. : *Sci Rep.* 6:25465, 2016.

doi : 10.1038/srep25465

3. Using miglitol at 30 min before meal is effective in hyperinsulinemic hypoglycemia after a total gastrectomy.

Shirakawa, J., Murohashi, Y., Okazaki, N., Yamazaki, S., Tamura, T., Okuyama, T., Togashi, Y., Terauchi, Y. : *Endocr J.* 61(11):1115-23, 2014

4. Effects of the antitumor drug OSI-906, a dual inhibitor of IGF-1 receptor and insulin receptor, on the glycemic control, β cell functions, and β cell proliferation in male mice.

Shirakawa, J., Okuyama, T., Yoshida, E., Shimizu, M., Horigome, Y., Tuno, T., Hayasaka, M., Abe, S., Fuse, M., Togashi, Y., Terauchi, Y. : *Endocrinology.* 155(6):2102-1120, 2014.