

博士論文

膵 β 細胞量調節に関わる
細胞内シグナル伝達系の解析

2015年9月

静岡県立大学大学院薬学研究院

薬食生命科学総合学府

博士後期課程薬科学専攻

佐藤 太治

博士論文

膵 β 細胞量調節に関わる
細胞内シグナル伝達系の解析

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究院薬食生命科学総合学府学位論文である。

2015 年 9 月

静岡県立大学大学院薬学研究院

薬食生命科学総合学府

博士後期課程薬科学専攻

佐藤 太治

**Analysis of intracellular signal transduction
mechanisms involved in regulation of
pancreatic β -cell mass.**

September 2015

Taiji Sato

略語

| | |
|----------------------------------|--|
| AM | acetoxymethyl |
| 2-APB | 2-aminoethoxydiphenylborate |
| APS | ammonium persulfate |
| ATP | adenosine triphosphate |
| BAPTA | 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethylene glycol- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid |
| BrdU | Bromodeoxyuridine |
| BSA | bovine serum albumin |
| [Ca ²⁺] _c | cytoplasmic Ca ²⁺ concentration |
| [Ca ²⁺] _m | mitochondria Ca ²⁺ concentration |
| CDK | cyclin-dependent kinase |
| DAG | diacylglycerol |
| DGK | diacylglycerol kinase |
| DGAT | diacylglycerol acyltransferase |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| ER | endoplasmic reticulum |
| ERK | extracellular-signal-regulated kinase |
| FBS | fetal bovine serum |
| Foxm1 | forkhead box protein M1 |
| GAPDH | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| GK rat | Goto Kakizaki rat |
| GLP-1 | glucagon-like peptide-1 |
| GLUT4 | glucose transporter 4 |
| HKB | HEPES-buffered Krebs |
| IL-1 β | interleukin-1 β |
| IP ₃ | inositol 1,4,5,-trisphosphate |
| IRS2 | insulin receptor substrate-2 |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid |
| HTRF | homogeneous time resolved fluorescence |
| JNK | c-Jun N-terminal kinase |
| KRBH | Krebs-ringer bicarbonate HEPES buffer |
| MAM | mitochondria-associated membranes |
| MARCKS | myristoylated alanine-rich C kinase substrate |

| | |
|-----------------------|--|
| MEK | mitogen-activated protein kinase kinase |
| MCU | mitochondrial calcium uniporter |
| MICU | mitochondrial Ca ²⁺ uptake |
| mRNA | messenger RNA |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| NADH/NAD ⁺ | reduced or oxidized nicotinamide adenine dinucleotide |
| NO | nitric oxide |
| NF-κB | nuclear factor-κB |
| OGTT | oral glucose tolerance test |
| PA | phosphatidic acid |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PDGF | platelet-derived growth factor |
| PDX-1 | pancreatic duodenal homeobox-1 |
| PH domain | pleckstrin homology domain |
| PI-PLC | phosphoinositide phospholipase C |
| RIP | rat insulin II promoter |
| PKC | protein kinase C |
| PMSF | phenylmethylsulfonyl fluoride |
| ROS | reactive oxygen species |
| RT-PCR | reverse transcription-polymerase chain reaction |
| RuR | ruthenium red |
| RVH | recoverin homology |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| S.E.M | standard error of the mean |
| siRNA | small interfering RNA |
| SOCs | store-operated Ca ²⁺ channels |
| TEA buffer | tris-acetate-EDTA buffer |
| TAG | triacylglycerol |
| TBS-T | tris buffered saline with tween 20 |
| TEMED | <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethane |
| VDAC | voltage-dependent anion channel |

目次

| | 頁 |
|--|----|
| 緒論----- | 1 |
| 第1章 膵β細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼδ (DGKδ) の機能解析----- | 3 |
| 1-1. 序論----- | 3 |
| 1-2. 実験材料および実験方法----- | 7 |
| 1-2-1. 膵β細胞株 MIN6B 細胞の培養----- | 7 |
| 1-2-2. MIN6B 細胞への DGKδ siRNA 遺伝子導入----- | 7 |
| 1-2-3. MIN6B 細胞の分画----- | 8 |
| 1-2-4. タンパク質定量----- | 9 |
| 1-2-5. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いたタンパク質分離----- | 9 |
| 1-2-6. Western blotting を用いたタンパク質の発現解析----- | 10 |
| 1-2-7 遺伝子発現解析----- | 11 |
| 1-2-8 マウスからの膵臓摘出と膵島の単離----- | 12 |
| 1-2-9 DGKδノックダウン MIN6B 細胞を用いたインスリン分泌機能の評価----- | 13 |
| 1-2-10 マウス膵島を用いたインスリン分泌機能の評価----- | 13 |
| 1-2-11 インスリン濃度の測定----- | 14 |
| 1-2-12 膵β細胞特異的 DGKδ KO マウスの作出----- | 15 |
| 1-2-13 βDGKδ KO マウスの識別----- | 16 |
| 1-2-14 血糖値の測定----- | 17 |
| 1-2-15 経口糖負荷試験 (Oral glucose tolerance test: OGTT) ----- | 17 |
| 1-2-16 血漿インスリン濃度の測定----- | 18 |
| 1-2-17 免疫染色----- | 18 |
| 1-2-18 DGKδノックダウン MIN6B 細胞を用いた細胞増殖能評価----- | 19 |

| | | |
|---------|--|----|
| 1-2-19 | マウス膵組織薄切切片を用いた膵β細胞増殖および膵島数の評価----- | 20 |
| 1-2-20 | 統計学的手法----- | 21 |
| 1-2-21 | 使用試薬----- | 21 |
| 1-3. | 実験結果 ----- | 24 |
| 1-3-1. | マウス膵組織薄切切片を用いた免疫染色----- | 24 |
| 1-3-2. | MIN6B細胞を用いた免疫染色----- | 24 |
| 1-3-3. | MIN6B細胞の分画とDGKδの局在検討----- | 25 |
| 1-3-4. | MIN6B細胞へのDGKδ siRNA 遺伝子導入----- | 26 |
| 1-3-5. | DGKδノックダウンMIN6B細胞を用いたインスリン分泌機能の評価----- | 27 |
| 1-3-6. | DGKδノックダウンMIN6B細胞を用いた細胞増殖能の評価----- | 28 |
| 1-3-7. | βDGKδ KOマウスの識別----- | 29 |
| 1-3-8. | 随時血糖値の測定----- | 30 |
| 1-3-9. | 耐糖能の評価----- | 31 |
| 1-3-10. | 血漿インスリン濃度の測定----- | 32 |
| 1-3-11. | マウス膵島を用いたインスリン分泌機能の評価----- | 33 |
| 1-3-12. | マウス膵組織薄切切片を用いた膵β細胞増殖評価----- | 34 |
| 1-3-13. | βDGKδ KOマウスの遺伝子発現解析----- | 36 |
| 1-4. | 考察 ----- | 38 |
| 第2章 | 過酸化水素によって誘導される膵β細胞アポトーシスにおける初期Ca ²⁺ 応答 の重要性----- | 44 |
| 2-1. | 序論 ----- | 44 |
| 2-2. | 実験材料および実験方法 ----- | 46 |
| 2-2-1. | 膵β細胞株INS-1D細胞の培養----- | 46 |
| 2-2-2. | ミトコンドリア内Ca ²⁺ 濃度 ([Ca ²⁺] _m) の測定----- | 46 |
| 2-2-3. | SDS-PAGEを用いたタンパク質分離----- | 47 |

| | |
|---|----|
| 2-2-4. Western blottingによるシトクロム <i>c</i> 解析----- | 48 |
| 2-2-5. 生細胞数の測定----- | 49 |
| 2-2-6. 使用試薬----- | 49 |
| 2-2-7. 統計学的解析----- | 50 |
| | |
| 2-3. 実験結果 ----- | 51 |
| 2-3-1. H ₂ O ₂ 誘導[Ca ²⁺] _m 上昇反応に対する 2-APB の時間依存的効果----- | 51 |
| 2-3-2. H ₂ O ₂ 誘導シトクロム <i>c</i> 漏出に対する 2-APB の時間依存的効果----- | 52 |
| 2-3-3. H ₂ O ₂ 誘導[Ca ²⁺] _m 上昇反応およびアポトーシスに対する Ru360 の効果---- | 53 |
| | |
| 2-4. 考察 ----- | 56 |
| | |
| 総括 ----- | 60 |
| | |
| 謝辞 ----- | 63 |
| | |
| 参考文献 ----- | 64 |

緒論

糖尿病は、インスリン作用不足によって引き起こされる慢性の高血糖状態を主特徴とする代謝性疾患であり、ライフスタイルの変化などにより糖尿病患者数は、世界的に増加している。国際糖尿病連合の報告によると世界の糖尿病患者数は、2014年現在で3億8670万人であるが、2035年までに5億9190万人にまで増加すると推定されている¹⁾。糖尿病による高血糖状態の持続は、膵臓以外の臓器にも障害をもたらす微小血管の破壊を伴って、腎症、網膜症、神経障害などの合併症を引き起こす。このように、糖尿病は生活の質の低下、生命予後の悪化をもたらすため、糖尿病の発症・進行の予防は、医療経済的な視点でも世界中で重要な課題となっている。

糖尿病は、その病態、成因により1型と2型に分類される。1型糖尿病は、主に自己免疫の異常により膵臓のβ細胞（膵β細胞）が破壊され、絶対的なインスリン不足になる病態である。一方、2型糖尿病は、インスリン分泌不全およびインスリン抵抗性が特徴である。患者数は2型糖尿病が圧倒的に多く、欧米では糖尿病の80%以上、日本では95%以上を占めるとされている。2型糖尿病発症の原因は完全に明らかではないが、遺伝的素因を持った人が、糖尿病になりやすいような生活習慣を送ることによって2型糖尿病になると考えられている。

2型糖尿病は、遺伝的素因に加え、不規則なライフスタイル、過剰な栄養摂取などの環境因子が加わって発症するとされている。通常、食事などによる血糖値上昇時にはインスリンが膵β細胞から分泌され、インスリンの標的臓器である肝臓における糖新生の抑制や、骨格筋、脂肪組織での糖取り込みの促進が引き起こされることで、血糖値が精密にコントロールされている。肥満などにより、これらインスリン標的臓器においてインスリンに対する感受性が低下するインスリン抵抗性の状態になると、まず膵β細胞からのインスリン分泌機能の亢進や膵β細胞の増殖による代償性過形成を

介してインスリン分泌量が増加し、血糖を正常な値に保持しようとする代償期になる。さらに病態が進行すると、さらにインスリン抵抗性が増悪し、膵β細胞による代償機構が破綻し2型糖尿病を発症する。この2型糖尿病の進行は4つのステージによる分類が提唱されている²⁾。第1期はインスリン抵抗性が出現するものの、膵β細胞量の増加によりインスリン抵抗性を代償する時期であり、膵β細胞の機能低下は認められない。第2期はわずかな膵β細胞の代償不全が出現する時期で、インスリン合成は維持されるが、グルコース応答性インスリン分泌の第一相の低下が認められる。第3期は、膵β細胞の代償的機能の不全が顕著になり、主要な転写因子や代謝関連遺伝子の発現調節が乱れ、インスリン生合成・分泌が低下する結果、2型糖尿病を発症する。第4期では代償的機能の不全がさらに悪化し、膵β細胞形態の破壊が進行し、膵β細胞の neogenesis や replication はほとんど認められず、おそらく apoptosis が増加している時期である。このような2型糖尿病の病態進展に対し、膵β細胞機能を維持、回復することは、2型糖尿病の根本治療に繋がると考えられる。

そこで、本研究の第1章では、膵β細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼδ (DGKδ) の機能を解明するために、*in vitro* および *in vivo* の両面において DGKδ の発現抑制系を用いて機能解析を行い、DGKδ の新規糖尿病治療薬ターゲットの可能性について考察した。さらに、本研究の第2章では、H₂O₂ 誘導アポトーシスにおける初期の Ca²⁺シグナルの関与を解明するために、膵β細胞株を用いて H₂O₂ による初期の [Ca²⁺]_i 上昇応答とアポトーシスの関係を検討し、Ca²⁺放出抑制が新規糖尿病治療のターゲットとなりうる可能性について考察した。

第 1 章 膵 β 細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼ δ (DGK δ) の機能解析

1-1 序論

グルコースは生体において最も重要なインスリン分泌刺激因子であるが、一方で、過剰なグルコースは、膵 β 細胞の機能を障害することが報告されている。膵 β 細胞が慢性的な高血糖状態に曝露されると、インスリンの生合成・分泌が減少し、膵 β 細胞機能が顕著に低下する。特に、膵島では抗酸化酵素群の発現が少ないため³⁾、他の組織、臓器に比べて酸化ストレスに対し脆弱な組織であると考えられている。また高血糖状態ではタンパク質の糖化反応が亢進し、その過程で活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が生成される⁴⁾。さらに高血糖状態によりミトコンドリアにおける ATP 産生がさらに増大するため、ATP 産生に伴い発生する ROS の増加が引き起こされる⁵⁾。このように高血糖は、ROS 産生を惹起し酸化ストレスに対する処理能力の低い膵 β 細胞機能を障害する。慢性的な酸化ストレスは、pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) や v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MafA) などの膵 β 細胞の分化に不可欠な転写因子の活性を抑制する⁶⁾。これらの転写因子は、インスリン遺伝子の発現だけでなく、膵 β 細胞の機能維持に重要な種々の遺伝子の発現を制御している^{7), 8)}。そのため、膵 β 細胞機能障害における転写活性への影響が注目されている。しかし、転写因子の関与が明らかになる一方で、高血糖による膵 β 細胞機能障害には、セラミドやジアシルグリセロール (diacylglycerol: DAG) などの脂質の蓄積⁹⁾ や小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) ストレス¹⁰⁾、一酸化窒素 (nitric oxide: NO)¹¹⁾ など複数のシグナルの関与が報告されているが、これらのシグナルの関与については検討が不十分のままである。これらのシグナルには重複する部分も多数存在し

ており、包括的な理解は難しく、一つ一つの経路の詳細な説明が望まれる。DAG はセカンドメッセンジャーとして機能し、細胞内シグナルの根幹を支える分子であるが、膵β細胞における DAG 代謝は未解明な点が多い。そこで本研究では、膵β細胞における DAG の代謝調節に着目した。

糖尿病では細胞膜および核膜において DAG の産生が亢進し、細胞内に蓄積する。通常、膵β細胞において細胞内に取り込まれたグルコースは、解糖系によりピルビン酸まで代謝されるが、高血糖などにより酸化ストレスが増加すると、ROS が解糖系酵素の一種である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の活性を抑制する¹²⁾。そのため、解糖系側路が活性化し、さらに、高血糖に由来するグルコース流入が増大し、解糖系の中間体であるグリセロアルデヒド-3-リン酸からの *de novo* DAG 産生が亢進する (*de novo* 経路)¹³⁾。また、高血糖におけるグルコース流入の増大は、グルコースからソルビトール、ソルビトールからフルクトースへと変換するポリオール経路も亢進させる。ポリオール経路の亢進は、NADH/NAD⁺比を上昇させることにより *de novo* 経路を促進し、DAG 産生をさらに増大させる¹⁴⁾。これらの反応により膵β細胞膜に DAG が蓄積する^{15), 16)}。

糖尿病病態における DAG の細胞膜内蓄積により膵β細胞の機能が障害される。その機能障害に至るメカニズムとして、DAG の細胞膜内蓄積による protein kinase C (PKC) の過剰な活性化が考えられている。他の組織においては、こうした DAG-PKC 経路の過剰な活性化は、種々の炎症性サイトカインの遺伝子発現や NO 産生などを引き起こすことが示唆されており、糖尿病性網膜症、腎症、神経障害といった糖尿病性合併症や、さらには心筋症や動脈硬化などの発症要因と考えられている¹³⁾。膵β細胞においても同様に、DAG の細胞膜内蓄積は、PKC の活性化などによりインスリン分泌減少や細胞障害を引き起こすことが示唆されている¹⁷⁻¹⁹⁾。すなわち、DAG の過剰な細胞膜内蓄積は、種々の組織において有害な作用をもたらすようである。

しかし、一般的には DAG は細胞毒性を示す分子ではなく、細胞内シグナルのセカンドメッセンジャーとして機能すると考えられている。正常細胞において、DAG は PKC や protein kinase D、Munc-13 など様々なタンパク質の活性を調節し、細胞生存や細胞増殖を含む多くの細胞機能に関与する重要な生理活性脂質である²⁰⁾。膵β細胞においても、DAG がインスリン分泌や細胞生存など様々な機能に関与することが報告されている^{21), 22)}。つまり、DAG は膵β細胞の機能維持に不可欠である一方で、その細胞膜内蓄積は膵β細胞機能を障害するという二面性を有すると考えられている。これらの報告から、DAG の細胞膜内における量的調節は、膵β細胞の機能維持や細胞生存を決定する重要なメカニズムであると考えられる。そこで、本研究では DAG の主要な代謝酵素であり、DAG をリン酸化することでホスファチジン酸 (phosphatidic acid: PA) に変換するジアシルグリセロールキナーゼ (DAG kinase: DGK) に着目した。

現在、哺乳類 DGK ファミリーには 10 種類のアイソフォームの存在が報告されており、これらのアイソフォームは、5 つのサブファミリーに大別される。全てのアイソフォームは、C 末端に相同性の高い触媒領域を有しており、また N 末端には PKC の脂質結合ドメインと相同性のあるシステインリッチドメイン (C1 ドメイン) と各アイソフォームに特徴的な調節領域がある²⁰⁾。I 型 (α , β , γ) は、 Ca^{2+} 結合ドメインである EF-hand と、カルシウムセンサーとして働く recoverin family に相同な領域 (RVH) が存在する。II 型 (δ , η , κ) は、pleckstrin homology (PH) ドメインを持っている。III 型 (ϵ) は、特有の調節部位を持たない。IV 型 (ζ , ι) は、myristoylated alanine rich C-kinase substrate (MARCKS) ホモロジードメインを有する。V 型 (θ) は、3 つの C1 ドメインおよび Ras-associating ドメインを含む PH domain-like ドメインを有している²³⁾。各 DGK アイソフォームは発現組織や活性化機構が異なるため、DGK はアイソフォーム特異的な機能を有していると想定される。

このうち、DGK δ に関しては糖尿病病態との関連性が強く示唆されている。糖尿病

患者の骨格筋では、DGK δ のタンパク質レベルでの発現低下が報告されている²⁴⁾。さらに骨格筋細胞を用いた研究から、慢性的な高濃度グルコース処置により DGK δ の発現が減少すること、DGK δ ヘテロ KO マウスでは、主に骨格筋での DGK δ の発現低下により、インスリン抵抗性を惹起することが報告されている²⁴⁾。また短期的な高濃度グルコース処置により DGK δ の細胞質内での局在が変化し、PKC の活性化を調節することで糖取り込みが促進されるという報告もある²⁵⁾。これらの報告から、骨格筋における DGK δ の発現、細胞内局在の変化が糖尿病病態に大きく影響することが考えられた。しかし、骨格筋細胞における DGK δ とインスリン抵抗性との関係は示唆されているもの、血糖調節の中心的役割を担う膵 β 細胞における報告は未だなく、膵 β 細胞における DGK δ の発現、細胞内局在はもとより、糖尿病病態に及ぼす影響も不明である。

そこで本研究では、膵 β 細胞における DGK δ の機能を解明するために、*in vitro* および *in vivo* の両面において DGK δ の発現抑制系を用いて機能解析を行った。まずマウス膵 β 細胞株 MIN6B 細胞を用いて DGK δ のノックダウンを行い、DGK δ のインスリン分泌能および細胞増殖能における役割を検討した。また膵 β 細胞特異的 DGK δ KO (β DGK δ KO) マウスを作出し、糖代謝パラメーターや膵島の遺伝子発現の変化を検討した。最後に、DGK δ の新規糖尿病治療薬ターゲットの可能性について考察した。

1-2 実験材料および実験方法

1-2-1. 膵 β 細胞株 MIN6B 細胞の培養

グルコース濃度依存的にインスリン分泌を惹起する MIN6 細胞よりサブクローニングした MIN6B 細胞を用いた。この細胞は、大阪大学医学系研究科の宮崎純一教授から供与して頂いた。培養は 15% fetal bovine serum (FBS)、penicillin (100 units/mL)、streptomycin (100 μ g/mL) を添加した 25 mM glucose 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地を用い、37°C、5% CO₂ インキュベーターで行った。FBS は、56°C に設定した恒温槽中で 30 分間、非働化処理を行ったものを使用した。培地交換は 2-3 日毎に行い、5-8 日毎に継代を行った。継代方法は、トリプシン処理 (0.025% trypsin/ 0.0045% EDTA-2Na 溶液を用いて細胞をディッシュより剥離) し、遠心 (200 x g, 5 分間, 室温) 後、上清を除き、3 mL の培地で再懸濁後 0.8-1 mL/ 90 mm dish になるよう播種した。実験には 45 から 60 代目の細胞を使用した。

1-2-2. MIN6B 細胞への DGK δ siRNA 遺伝子導入

MIN6B 細胞における DGK δ のノックダウンは、CLB-Transfection System (LONZA, Köln, Germany) によるエレクトロポレーション法を採用し、DGK δ siRNA を MIN6B 細胞に遺伝子導入することで行った。エレクトロポレーションの方法は、メーカーのプロトコールに従って実施した。

まず、MIN6B 細胞をトリプシン処理し、DMEM 培地にて細胞を回収した。遠心 (200 x g, 5 分間, 室温) 後、上清をアスピレーターで除去し、siRNA の最終濃度が 100 nM

となるように siRNA を添加した CLB transfection buffer を用い、細胞密度が 2.5×10^6 cells/600 μ L になるように懸濁した。細胞懸濁液をトランスフェクション用キュベットに移し、Optimal CLB-Transfection Pulse のメーカープロトールに従って実行した。エレクトロポレーション後、速やかに 500 μ L RPMI 1640 (10% FBS, antibiotics free) 培地を入れ、スポイトを用いて全量をエッペンチューブに移し、37°C の恒温槽で 10 分間インキュベートした。インキュベーション後に、DMEM 培地を入れた 6 well plate に細胞を移し、37°C、5% CO₂ インキュベーターで 3 日間培養した。negative control の siRNA は、Stealth RNAi siRNA Negative Control Med GC Duplex #2 (12935-112, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いた。一方、DGK δ siRNA は、Stealth RNAi siRNA mouse DGK δ (5'-GAA UGU GAU GCU GGA UCU UAC UAA A -3', antisense, 5'-UUU AGU AAG AUC CAG CAU CAC AUU C-3', NM 177646.3 stealth 3338, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いた。

1-2-3. MIN6B 細胞の分画

MIN6B 細胞を、Cell fractionation kit (ab109719, abcam, Cambridge, UK) を用いて分画した。トリプシン処理により細胞を回収し、遠心 (200 x g, 4 分間, 室温) 後、細胞密度が 6.6×10^6 cells/mL となるように Cell fractionation kit の Buffer A で懸濁し、Cell fractionation kit の Detergent I を含む Buffer B を等量加え、60 分間処置し、遠心 (5,000 x g, 1 分間, 4°C) により上清 1 を回収し、さらにペレットを Buffer A で懸濁し、遠心 (10,000 x g, 1 分間, 4°C) により上清 2 を回収し、上清 1 および上清 2 を混合したものを細胞質画分とした。ペレットを Buffer A で懸濁後、Cell Fractionation kit の Detergent II を含む Buffer C を等量加え、60 分間処置し、遠心 (5,000 x g, 1 分間, 4°C) により上

清3を回収し、さらにペレットを Buffer A で懸濁し、遠心 (10,000 x g, 1 分間, 4°C) により上清4を回収し、上清3および上清4を混合したものをミトコンドリア画分とした。ペレットを Buffer A で懸濁し、1 分間ソニケーションしたものを核画分とした。

1-2-4. タンパク質定量

タンパク質定量は、ビスンコニン酸 (bicinchoninic acid: BCA) 法の BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて行った。Kit のプロトコールに従い、BSA 溶液 (2.0 mg/mL) を希釈用 buffer [20 mM Tris (pH 7.4)、2 mM EDTA、250 mM Sucrose] で 2、4、8、16 倍に希釈し、回収した試料は 10 倍に希釈し、それぞれ 10 μ L ずつエッペンドルフチューブに分注した。分注したチューブに BCA Protein Assay Kit の A 液、B 液の混合液 (A:B = 50:1) を 200 μ L ずつ添加し、37°C の恒温槽で 30 分間インキュベートした。室温に戻した後、96 well plate に 150 μ L ずつ分注し、マイクロプレートリーダーを用い、550 nm で吸光度を測定し、試料中のタンパク質濃度を求めた。

1-2-5. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いたタンパク質分離

未分画の MIN6B 細胞の場合、phosphate buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄) で 2 回洗浄後、セルスクレーパーを用いて回収し、遠心 (200 x g, 15 分間, 4°C) を行った。その後、上清を除き、homogenization

buffer [20 mM Tris (pH 7.4) , 2 mM EDTA, 50 µg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) , 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 250 mM sucrose] を加え、ソニケーションしたものを SDS-PAGE 用試料として用いた。一方、上述の方法 (1-2-3) に従って MIN6B 細胞を分画した場合は、細胞質、ミトコンドリア、核に分画した各画分を SDS-PAGE 用試料として用いた。試料を loading buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8) , 4% SDS, 20% Glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue) で 2 倍希釈後、5 分間煮沸し、電気泳動を行うまで -20°C で保存した。

試料を泳動前にさらに 5 分間煮沸し、タンパク質定量の結果に基づき、タンパク質含量が等しくなるように試料をポリアクリルアミドゲル [stacking gel: 3% acrylamide, 0.08% *N,N*-bis-methyleneacrylamide, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.05% *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) , 0.05% ammonium persulfate (APS), running gel : 8% acrylamide, 0.21% *N,N*-bis-methyleneacrylamide, 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.05% TEMED, 0.05% APS] にアプライし、泳動 buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) 中で、電気泳動用精密安定電源 (Power PAC 3000、BIO-RAD または Crosspower 1000、ATTO) を用いて 20 mA で約 90–150 分間泳動した。

1-2-6. Western blotting を用いたタンパク質の発現解析

電気泳動が終了したゲルにポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride: PVDF) 膜を接着させ、転写 buffer (192 mM Tris, 25 mM glycine, 20% methanol) 中で、60 V で 2 時間転写した。転写終了後、PVDF 膜を Ponceau S 液で染色した。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

5% skim milk 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、イムノスター試薬または Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) により生じた化学発光を western blot scanner C-digit (LI-COR, Lincoln, NE, USA) を用いて検出、定量した。各操作の間は TBS-T で 3 回洗浄した。以下に一次抗体及び二次抗体と希釈率を示した。なお、DGK δ (WB-1) 抗体は、千葉大学大学院理学研究科生体機能化学研究室の坂根郁夫教授より供与していただいた。1 次抗体として用いた抗体は以下の通り (括弧内は、品番および希釈倍率)。Rabbit anti-human DGK δ (WB-1, 10000 倍)、Mouse anti- β -actin (AC-15, 10000 倍)、Mouse anti-Cytochrome c (37BA11, 1000 倍)、Rabbit- anti-Lamin B1 (PM064, MBL, 1000 倍)。2 次抗体として用いた抗体は、以下の通り (括弧内は希釈倍率)。Goat anti-rabbit IgG, peroxidase conjugated (2000 倍)、Goat anti-mouse IgG, peroxidase conjugated (2000 倍)。

1-2-7. 遺伝子発現解析

RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて、単離したマウス腭島から total RNA を抽出した。RNA 抽出方法は、RNeasy Mini Kit のプロトコールに従った。抽出した RNA は、極微量分光光度計 (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) にて定量した。Real-time PCR 法を用いて、DGK δ mRNA の発現量を測定した。Real-time PCR の測定機器は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, MA, USA) を用いた。各測定には以下の試薬を用いた。2 \times QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix (QIAGEN, Hilden, Germany) 5.0 μ L、QuantiTect Probe RT-MIX (QIAGEN, Hilden, Germany) 0.1 μ L、Target gene probe (Thermo Fisher Scientific, MA,

USA) 0.5 μ L、Distilled water 2.4 μ L を添加し、合計 8.0 μ L とした。さらに、RNA 濃度 1 ng/ μ L に調製した total RNA を 2 μ L 添加し、Real-time PCR を実施した。内部標準として β -actin を選択した。TaqMan probe (Thermo Fisher Scientific の製品番号を示した) は、DGK δ (Mm00617404_m1)、 β -actin (4352663)、Ccnb1 (Mm03053893_m1)、Ccnb2 (Mm01171453_m1)、Ccna2 (Mm00438063_m1)、Foxm1 (Mm00514924_m1)、Irs2 (Mm03038438_m1)、Ins2 (Mm00731585_m1) を用いた。また Real-time PCR の条件は以下の通り。Step 1 は 50°C, 30 分間, 1 cycle。Step 2 は 95°C, 15 分間, 1 cycle。Step 3 は 94°C, 15 秒間, 40 cycles。Step 4 は 60°C, 1 分間とした。

1-2-8. マウスからの膵臓摘出と膵島の単離

マウスを pentobarbital sodium (75 mg/kg, i.p.) で麻酔した後、開腹し、頸動脈の切開または門脈からの全血採血により脱血死させ、摘出した膵臓を免疫染色用の試料として用いた。膵島の単離及び選別は、Kaneko らの方法²⁶⁾および Kawasaki らの方法²⁷⁾に従った。膵臓摘出時と同様にマウスを麻酔後、開腹し、総胆管にポリエチレンチューブ製カニューレを挿入し、頸動脈の切開または門脈からの全血採血により脱血死させた。次に、総胆管の肝臓側をクレンメで止め、0.1% BSA と 2.8 mM glucose を含む HEPES-buffered Krebs (HKB) 溶液 [129 mM NaCl, 4.74 mM KCl, 2.54 mM CaCl₂·2H₂O, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O, 1.18 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES (pH7.4)] に collagenase (Sigma-Aldrich, MO, USA) を溶解した溶液をカニューレから注入した。collagenase の濃度は 2.0 mg/mL とした。collagenase 溶液を注入後、膵臓を摘出し、37°C の恒温槽を用いてインキュベーションし、消化した。消化は試験管中で 5~6 分間行った。その後、HKB 溶液の添加により消化を止めた。この懸濁液をピペットで攪拌

後、1分30秒間静置し、上清を除去し、さらに HKB 溶液を添加して再懸濁した。上清除去-再懸濁の操作を 2 回繰り返したのち、シャーレに移した。その後、実体顕微鏡下で消化液中から膵島をマイクロピペットで採取した。動物実験は、「静岡県立大学における動物実験に関する指針」に従い、運営委員会の承認を得て行った。

1-2-9. DGK δ ノックダウン MIN6B 細胞を用いたインスリン分泌機能の評価

上項 (1-2-2) のように siRNA を遺伝子導入した MIN6B 細胞を 24 well plate に 1.1×10^5 /well (50 μ L/well) で播種し、3 日間培養した後、インスリン分泌能を評価した。インスリン分泌能評価に使用した buffer の組成は、0.1% BSA を含む 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) -buffered Krebs (HKB) 溶液 [129 mM NaCl, 4.74 mM KCl, 2.54 mM CaCl₂·2H₂O, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O, 1.18 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES (pH7.4)] とし、必要に応じて glucose を添加した。プレインキュベーション (2.8 mM glucose/HKB 1mL, 37°C, 1 時間) を行った後、プレインキュベーション溶液を試験用溶液 (2.8mM, 11.1mM, 16.7mM glucose/HKB 1mL) に交換して 1 時間インキュベーションし、上清を採取して上清に含まれるインスリン量を後述する方法 (1-2-11) により測定した。

1-2-10. マウス膵島を用いたインスリン分泌機能の評価

前項 (1-2-8) のように、マウスから単離した膵島を、大きさが均等になるよう 5 個

ずつチューブに移し、プレインキュベーション (2.8 mM glucose/KHB 1 mL, 37°C, 1 時間) を行った。その後、プレインキュベーション溶液を試験用溶液 (2.8 mM, 11.1 mM, 16.7 mM glucose/KHB 1mL) に交換して 1 時間インキュベーションし、上清を回収した。上清 1 mL 中に含まれるインスリン (分泌インスリン量) を後述する方法 (1-2-11) により測定した。さらに、残った膵島を酸エタノール液 (11N HCl 7.5 mL, 95% ethanol 370 mL) 500 μ L 中でホモジナイズし、一晩 4°C でインスリンを抽出した。その後遠心 (10000 \times g, 5 分間, 4°C) し、上清を回収した。酸エタノール液 500 μ L に含まれるインスリン (抽出インスリン量) を測定した。分泌インスリン量と抽出インスリン量の和を総インスリン量としてインスリン分泌量の補正に用いた。

1-2-11. インスリン濃度の測定

採取した試料中のインスリン濃度は、時間分解蛍光 (Time-Resolved Fluorescence: TRF) と蛍光共鳴エネルギー転移 (Fluorescence resonance energy transfer: FRET) を組み合わせた HTRF insulin kit (SCETI MEDICAL LABO, Tokyo) により測定した。384 well plate に 10 μ L の insulin standard もしくはサンプルを添加し、5 μ L の anti-insulin Ab-cryptate および 5 μ L の anti-insulin Ab-XL665 を添加し、plate mixer で 1 分間混和し、室温、遮光にて 2 時間静置した後、マルチプレートリーダー (Envision 2014, PerkinElmer, MA, USA) を用いて、励起波長 620 nm、発光波長 665 nm にて蛍光を測定した。インスリン濃度の換算は、HTRF insulin kit のプロトコールに従った。換算式を以下に示した。

$$1. \text{Ratio} = \frac{A_{665\text{nm}}}{B_{620\text{nm}}} \times 10^4$$

$$2. \text{Mean Ratio} = \frac{\sum \text{ratios}}{2}$$

$$3. \text{CV} = \frac{\text{Std deviation}}{\text{Mean ratio}} \times 100$$

$$4. \text{Delta F} = \frac{\text{Calibrator or sample Ratio} - \text{Ratio}_{\text{neg}}}{\text{Ratio}_{\text{neg}}} \times 100$$

(Ratio_{neg} = negative control)

1-2-12. 膵 β 細胞特異的 DGKδ KO マウスの作出

膵 β 細胞特異的 DGKδ KO (βDGKδ KO) マウスの作出は、Cre-loxP system により行い、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 (The Jackson Laboratory, ME, USA) と標的配列 loxP で DGKδ を挟んだ DGKδ^{flox/flox} マウスを用いた。DGKδ^{flox/flox} マウスは、千葉大学大学院理学研究科生体機能化学研究室の坂根郁夫教授より供与していただいた。RIP-Cre マウスは繁殖能力が低いため、RIP-Cre マウスと wild type のマウスの仔である RIP-Cre hetero マウス同士を交配し、さらにその仔マウスについて homo、hetero、wild type の識別を行った。まず、各マウスの尾および耳を試料とし、QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて試料から total DNA を抽出した。抽出した試料を用いて SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time, Takara bio, Otsu) により Real-time PCR を行い、Apob を内部標準として Cre の定量を行った。

Real-time PCR のプライマーに関して、RIP-Cre の Forward は、5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC、Reverse は、5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTAC とした。Apob の Forward は、5'-CACGTGGGCTCCAGCATT、Reverse は 5'-TCACCAGTCATTTCTGCCTTTG とした。Real-time PCR の条件については、Step 1 は 50°C, 2 分間、Step 2 は 95°C, 10 分間、Step

3 は 95°C, 15 秒間、Step 4 は 60°C, 1 分間 で行った。反応後定量を行い、RIP-Cre homo マウスと比較して同程度 Cre を発現しているものを RIP-Cre homo マウス、半分程度の発現のものを RIP-Cre hetero マウス、Cre が全く存在しないものを wild type とした。ここで産まれた RIP-Cre homo マウスを DGK δ -loxP マウスと交配し、産まれた仔 (β DGK δ hetero KO マウス) をさらに DGK δ -loxP マウスと交配して産まれた仔の中から RIP-Cre/DGK δ ^{flox/flox} マウス (β DGK δ KO マウス) を識別した。

1-2-13. β DGK δ KO マウスの識別

使用したマウスは離乳時に耳および指を切断することで、同ケージ内での識別を行った。遺伝子型の識別は、PCR 法を用いた genotyping により行った。まず、各マウスの尾および耳を試料とし、QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて試料から total DNA を抽出した。抽出した試料を用いて Tks Gflex DNA Polymerase (Takara bio, Otsu) により PCR を行った。PCR の条件については、Step 1 は 94°C, 1 分間、Step 2 は 98°C, 10 秒間、Step 3 は 60°C, 15 秒間、Step 4 は 68°C, 40 cycles, 30 秒間 (for RIP-Cre), 1 分間 (for DGK δ -loxP)、Step 5 は 68°C, 5 分間とした。RIP-Cre のプライマーについては、Forward を 5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC、Reverse 5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTAC とした。DGK δ -loxP については、Forward を 5'-TCCTACCTCTCTCTCCATTCCC、Reverse を 5'-AAGGTGTTGAATAATACTCTGTGAC とした。PCR 溶液のうち 10 μ L をアガロースゲル電気泳動し、増幅の有無を確認した。試料に対し 0.2 倍量の gel loading buffer を加え、gel red を含む 2% アガロースゲルにアプライし、Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer [40 mM Tris, 20 mM acetate, 2 mM EDTA-2Na (pH8.0)] 中で 100 V にて電気泳動を行っ

た。電気泳動後のゲルは UV で照射し、泳動パターンを確認した。RIP-Cre および DGK δ -loxP 配列が組み込まれているか否かを確認し、RIP-Cre/DGK $\delta^{\text{flox/flox}}$ マウスを β DGK δ KO マウス、RIP-Cre/DGK $\delta^{\text{flox/+}}$ マウスを β DGK δ hetero KO マウス、RIP-Cre/DGK $\delta^{+/+}$ マウスを control マウスとして識別を行った。

1-2-14. 血糖値の測定

グルコース脱水素酵素を用いた酵素電極法による血糖測定システムを用いて、マウスの血糖値を測定した。尾の先端約 1 mm を外科バサミで切断し、流出した血液を血糖測定システムに反応させた。血糖測定システムには ライフチェック (GUNZE, Kyoto) を用い、採血後は傷口を乾綿で押さえ止血した。

1-2-15. 経口糖負荷試験 (Oral glucose tolerance test: OGTT)

マウスを 20 時間絶食した後、glucose (2.0 g/kg, p.o.) を体重 10 g あたり 0.1 mL となるように経口投与した。上述 (1-2-14)の方法により、glucose 投与前 (0 分)、30 分、60 分、120 分後の血糖値を測定した。なお、糖負荷直後の血糖値測定には、ライフチェック (GUNZE, Kyoto) を用いた。

1-2-16. 血漿インスリン濃度の測定

動物は、20 時間絶食した 30 週齢のマウス、もしくは自由摂食下の 31 週齢のマウスを用いた。マウスの尾の先端を切断してヘマトクリット管を用いて血液を 60 μL 回収し、遠心 (1000 x g, 15 分間, 4°C) した。上清を血漿サンプルとして回収した。回収した各サンプルのインスリン濃度は、ELISA 法を用いた超高感度マウスインスリン測定キット (Morinaga, Kanagawa) を用いて測定した。一次反応として、検体希釈液を 95 $\mu\text{L}/\text{well}$ で分注し、あらかじめ用意した標準曲線用インスリン溶液または検体を 5 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。4°Cで2時間静置して反応した後、洗浄として 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ の洗浄液で5回洗浄した。二次反応として、酵素標識抗インスリン抗体溶液を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で分注し、常温で30分静置して反応した後に、洗浄として 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ の洗浄液で7回洗浄した。酵素反応として、酵素基質溶液を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で分注し、遮光下常温で40分間静置して反応した。反応停止のために、反応停止液を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。反応停止後30分以内にプレートリーダーで各 well の 450/630 nm の吸光波長を測定した。濃度算出は、得られた吸光度より検体中のマウスインスリン濃度を算出した。

1-2-17. 免疫染色

Poly-L-lysine で予めコートした 35 mm glass base dish に $7-10 \times 10^4$ cells/dish となるように MIN6B 細胞を播種し、2 日後に PBS で 3 回洗浄し、2% paraformaldehyde/PBS で室温下、30 分間固定した。その後、0.1% Triton X-100/PBS で 60 分間処理した。

マウス摘出膵臓の免疫染色では、採取した膵臓を 4% paraformaldehyde/PBS で 2 時間固定し、10%、15%、20% sucrose/PBS 溶液中でそれぞれ 4 時間ずつ浸漬し、クリオモルドを型にして optimal cutting temperature (O.C.T.) compound (PBS:O.C.T. compound = 1:2) を用いて 1 時間室温にて包埋した。O.C.T. compound で包埋した膵臓を、クリ

オモルドごと液体窒素で冷やしたステンレス皿の上で凍結し、 -80°C で保存した。凍結臓をクリオモルドから取り出し、クライオスタットを用いて約 $5\ \mu\text{m}$ の厚さで薄切し、予め poly-L-lysine でコートしたスライドガラス上に切片を付着させ、30 分間乾燥させた。

固定後の MIN6B あるいは凍結薄切切片を、3% BSA/PBS で室温下、30 分間ブロッキングした後、各抗体を用いた免疫染色を行った。一次抗体は 1% BSA/PBS で希釈したものを、 4°C で一晩または室温で 1 時間反応させた。次に、二次抗体は 1% BSA/PBS で希釈したものを、室温で 1 時間反応させた。核染色については、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 含有封入剤のフルオロキーパー (Nacalai tesque, Kyoto) を使用することで、もしくは二次抗体の希釈液に Hoechst33342 を 200 倍希釈になるように添加することで、核染色を行った。観察は、薄切切片では蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus, Tokyo) を、MIN6B 細胞では共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて行った。以下に一次抗体及び二次抗体とそれぞれの希釈率を括弧内に示した。一次抗体は、Rabbit anti-human DGK δ (250 倍)、Guinea pig anti-PDX-1 (200 倍)、Guinea pig anti-insulin (DAKO corporation, 100 倍)、Rabbit anti-Ki-67 (D3B5, #12202, Cell signaling, 250 倍)を用いた。また二次抗体は、Donkey anti-rabbit, Alexa 488 conjugated (100 倍)、Goat anti-guinea pig, Alexa 546 conjugated (100 倍) を用いた。

1-2-18. DGK δ ノックダウン MIN6B 細胞を用いた細胞増殖能評価

あらかじめ DMEM 培地 $90\ \mu\text{L}/\text{well}$ を添加した 96 well plate に、上述 (1-2-2) の siRNA

遺伝子導入 MIN6B 細胞を 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ で播種した。培養 2 日目に培地交換し、培養 3 日目に細胞増殖能を評価した。細胞増殖の評価には、 $[^3\text{H}]$ -チミジン取込みアッセイの代替法で、DNA 合成期に取込まれた BrdU の測定を原理とする細胞増殖 ELISA BrdU 化学発光キット (669915, Roche, Basel, Switzerland) を使用した。実験操作は、キットのプロトコールに従って実施した。BrdU 濃度が 10 μM になるように BrdU 標準液 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ を添加し、2 時間処置した。処置後、上清を完全に除去し、細胞増殖 ELISA BrdU 化学発光キットの固定液 Fix Denat を 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し 30 分間処置した。処置後、上清を完全に除去し、100 倍希釈した細胞増殖 ELISA BrdU 化学発光キットのペルオキシダーゼ標識抗 BrdU 抗体を添加し、90 分間処置した。洗浄液 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ で 3 回洗浄後、100 倍希釈した基質液を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加後 10 分以内に、秒間における化学発光量をマルチプレートリーダー (ARVO, PerkinElmer, Massachusetts, USA) にて測定した。

1-2-19. マウス膵組織薄切切片を用いた膵 β 細胞増殖および膵島数の評価

上述 (1-2-17) の通り作製したマウス膵組織薄切切片の免疫染色標本 (各個体につき 20–23 切片) を用いて、膵 β 細胞増殖および膵島の面積および数について評価した。蛍光染色測定には、Cellomics Array Scan VTI system (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いた。Cellomics Array Scan にて画像を取得し、Cellomics View あるいは iView にて画像解析を行った。Ki-67、insulin および DAPI 染色陽性領域の認識には、Cellomics Array Scan の画像解析プロトコールの neural profile を使用した。また膵 β 細胞増殖の指標は、Ki-67 陽性細胞数をインスリン陽性細胞数で除した数値を

用いた。さらに Insulin 陽性領域を睥島として、その面積および数を計測した。

1-2-20. 統計学的手法

本文及び図中の結果は、平均値 (mean) ± 標準誤差 (SEM) (n = 例数) で示した。

2 群比較には *t* 検定を用い、3 群以上の比較には Tukey-Kramer 検定、あるいは Dunnett 検定を適用し、危険率 5 %未満 ($p < 0.05$) を有意差ありと判定した。

1-2-21. 使用試薬

- Acetic acid
- Acrylamide-HG
- Ammonium persulfate (APS)
- Albumin, from bovine serum, fatty acid free (BSA)
- Bromophenol blue (BPB)
- Calcium chloride dihydrate
- Disodium hydrogenphosphate 12-water
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)
- Glycerol
- Glycine
- Magnesium sulfate heptahydrate
- Methanol
- *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED)

- Paraformaldehyde
- Potassium chloride
- Potassium dihydrogen phosphate
- Sodium chloride
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- Sucrose
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane
- 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]thanesulfonic acid (HEPES)
- Polyoxyethylene (10) octylphenyl ether (Triton X-100) (以上 WAKO, Osaka)
- 2-Mercaptoethanol
- Aprotinin
- Collagenase
- Ethidium bromide
- HEPES
- Leupeptin
- Poly-L-lysine
- Ponceau S
- Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
- Sodium palmitate (以上 Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Penicillin G potassium (ペニシリン G カリウム)
- Streptomycin sulfate (硫酸ストレプトマイシン) (以上明治製菓, Tokyo)
- Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt, dihydrate (EDTA·2Na)
- Hoechst 33342 (以上 Dojindo Laboratories, Kumamoto)

- ・Agarose S (Nippon gene, Tokyo)
- ・Pentobarbital sodium (ソムノペンチル注射液) (共立製薬, Tokyo)
- ・Sodium hydrogen carbonate (関東化学株式会社, Tokyo)
- ・Bovine serum albumin fraction V (BSA) (Roche Dignostics, Mannheim, Germany)
- ・Fatal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- ・Trypan blue (Nacalai tesque, inc, Kyoto)

その他に使用した試薬は全て特級規格品とした。

1-3 実験結果

1-3-1. マウス膵組織薄切切片を用いた免疫染色

マウス膵β細胞でのDGKδの局在を調べる目的で、C57BL/6Jマウスから摘出した膵臓の凍結薄切切片を作成し、抗DGKδ抗体と抗インスリン抗体で二重染色を行った。その結果、マウス膵島において、インスリン陽性細胞である膵β細胞は、DGKδを発現していることが確認された (Fig. 1. A–C)。さらにDGKδは細胞質と核の両方に発現していたが、特に、核において高発現している可能性が考えられた (Fig. 1D)。

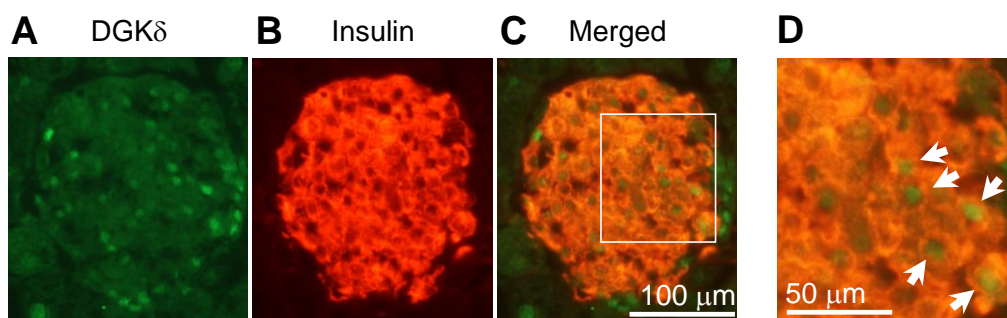


Figure 1. Immunohistochemical localization of DGKδ and insulin in mice pancreatic islets.

(A-D) Cryosections of mouse pancreas were immunostained with anti-DGKδ (A in green) and anti-insulin (B in red) antibodies. A coincidence of both fluorescences results in the appearance of yellow (C). (D) Enlarged frame from panel C. DGKδ in nuclei were indicated by arrows (D).

1-3-2. MIN6B 細胞を用いた免疫染色

さらに、マウス由来膵β細胞株である MIN6B 細胞における DGKδ の局在を調べるため、抗 DGKδ 抗体、抗 PDX-1 抗体および核染色試薬 Hoechst 33342 を用いた三重染色で検討した。その結果、DGKδ は、主に核に局在することが知られている PDX-1 と類似した局在を示した。さらに Hoechst 33342 による核染色により、DGKδ の多くは核に局在していることが確認された。つまり、MIN6B 細胞においても、マウス膵島と同様に DGKδ は核において高発現していることが確認された。

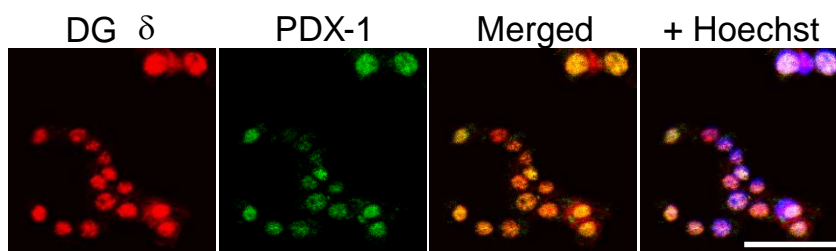


Figure. 2 Immunocytochemical localization of PDX-1 and DGKδ in MIN6B cells

MIN6B cells were immunostained with anti-DGKδ (in red) and anti-PDX-1 (in green) antibodies, and stained with Hoechst 33342 (in blue). The third column from left shows the merged image of DGKδ and PDX-1 images. The right column (+Hoechst) shows overlay images of merged images and Hoechst 33342 staining images. Hoechst 33342 was used for detection of the nuclei. Bar = 50 μm.

1-3-3. MIN6B 細胞の分画と DGKδ の局在検討

さらに MIN6B 細胞における DGKδ の局在を明確に示すために、Cell fractionation kit を用いて細胞質画分、ミトコンドリア画分、核画分に分画し、抗 DGKδ 抗体を用いて Western blotting を実施した。核画分には Lamin B1 を、ミトコンドリア画分には cytochrome *c* を、細胞質画分には β-actin をそれぞれ陽性対照とした。その結果、免疫

染色の結果と一致して、DGK δ は主に核に局在することが確認された。

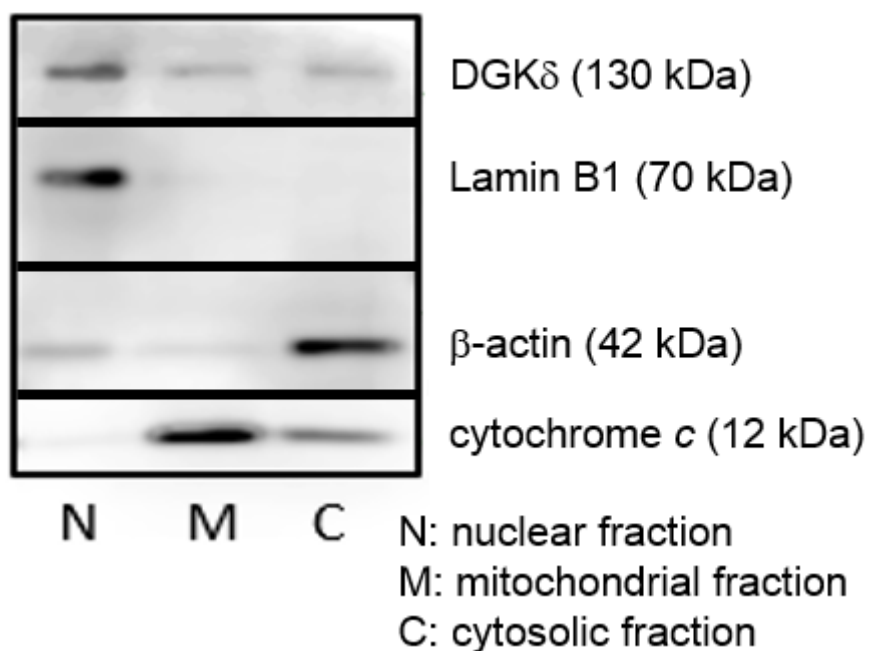


Figure 3. Expression of DGK δ in fractionated MIN6B cells.

Expression of DGK δ protein in nuclear, mitochondrial, and cytosolic fractions of MIN6B cells was detected with anti-DGK δ , anti-Lamin B1 (for nucleus), anti- β -actin (for cytoplasm), and anti-cytochrome *c* antibodies (for mitochondria). The same amount of each protein extract was applied for western blotting (10 μ g/lane).

1-3-4. MIN6B 細胞への DGK δ siRNA 遺伝子導入

DGK δ の発現抑制による膵 β 細胞での機能を評価するために、MIN6B 細胞に DGK δ siRNA を遺伝子導入し、mRNA およびタンパク質レベルでの DGK δ のノックダウン効率を確認した。その結果、DGK δ siRNA 導入により DGK δ mRNA 発現量は、約 90% 低下した (Fig. 4)。さらに、DGK δ タンパク質量も、mRNA と同様に発現が低下していることが確認された (Fig. 5)。以上の結果から、タンパク質レベルでの DGK δ 発現

抑制が確認できたため、機能評価は可能と判断した。

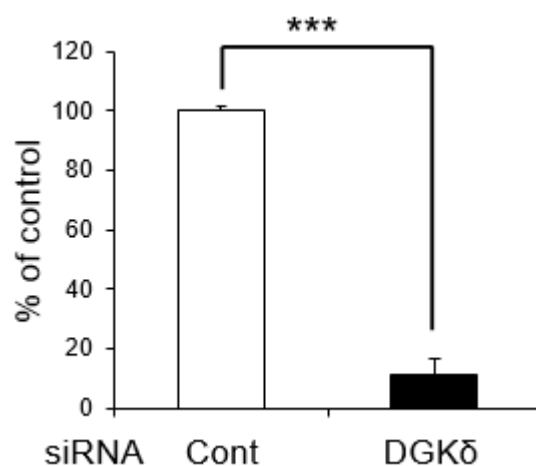


Figure 4. Expression of DGKδ mRNA in siRNA transfected MIN6B cells.

DGKδ mRNA expression in siRNA transfected MIN6B was assessed by real-time PCR.

β-Actin was used as an internal control. Values are mean ± SEM. *** $P < 0.001$, $n = 3$

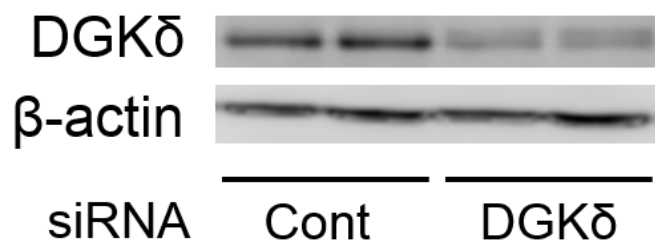


Figure 5. Expression of DGKδ protein in siRNA-transfected MIN6B cells.

Knockdown of DGKδ was confirmed by Western blotting. The blot was probed with either anti-DGKδ (upper panel) or anti-β-actin (lower panel) antibodies.

1-3-5. DGKδ ノックダウン MIN6B 細胞を用いたインスリン分泌機能の評価

DGK δ を発現抑制した膵 β 細胞におけるインスリン分泌能を解析する目的で、DGK δ ノックダウン MIN6B 細胞のグルコース応答性インスリン分泌 (glucose-stimulated insulin secretion) の機能を評価した。その結果、2.8 mM および 16.7 mM グルコースのいずれの条件においても、DGK δ ノックダウンによるインスリン分泌量の変化は認めなかった (Fig. 6)。そのため、DGK δ 発現抑制はグルコース応答性インスリン分泌能に影響を与えないことが示唆された。

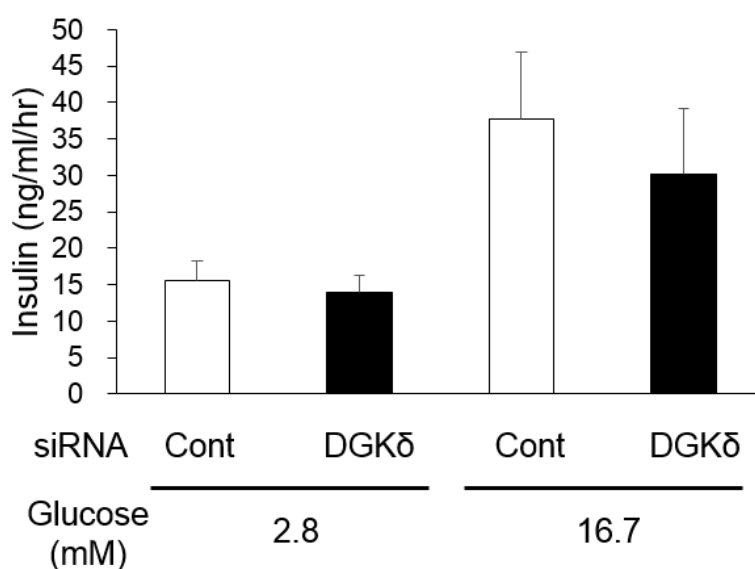


Figure 6. Effects of knockdown of DGK δ on glucose-stimulated insulin secretion in MIN6B cells.

Insulin secretion from control siRNA- (Cont) or DGK δ siRNA-transfected MIN6B cells (DGK δ) at 2.8 or 16.7 mM glucose was measured. Each column represents the mean \pm SEM of 10–12 experiments.

1-3-6. DGK δ ノックダウン MIN6B 細胞を用いた細胞増殖能の評

価

DGK δ が主に核に局在することから、DGK δ が核内の DAG 代謝を通じて細胞周期を調節することが考えられたため、DGK δ の発現が低下した膵 β 細胞における細胞増殖能を解析する目的で、DGK δ ノックダウン MIN6B 細胞の BrdU の取り込み量を評価した。その結果、DGK δ ノックダウンは、Control に比較して、有意な BrdU 取り込み量の増加を認め、その増加量は約 20%であった (Fig. 7)。そのため、DGK δ の発現抑制は、膵 β 細胞の増殖を亢進することが示唆された。

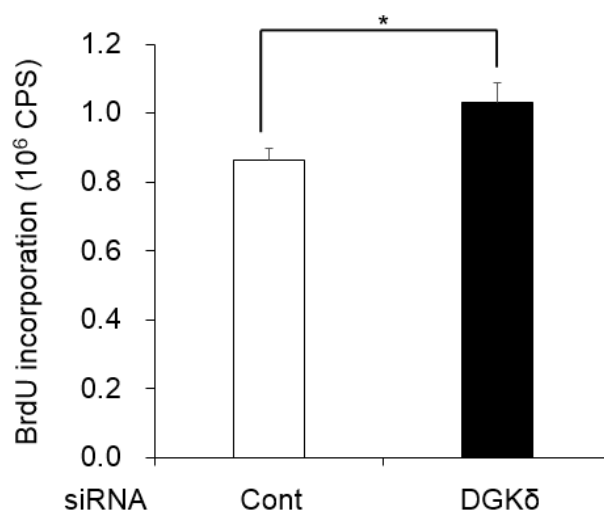


Figure 7. Proliferation in DGK δ siRNA-transfected MIN6B cells.

The proliferation in control siRNA- (Cont) or DGK δ siRNA-transfected MIN6B cells (DGK δ) was assessed by BrdU incorporation. Cells were cultured for 3 days in complete medium after siRNA transfection. BrdU was added during the final 2 h of the 3 day-incubation period. Each column represents the mean \pm SEM. * $P < 0.05$, $n = 5$

1-3-7. β DGK δ KO マウスの識別

Control マウス、 β DGK δ hetero KO マウスおよび β DGK δ KO マウスを識別するため、各マウスからの抽出 DNA を用いて PCR 法による genotyping を行った。RIP-Cre 配列、DGK δ -loxP 配列の確認により、 β DGK δ KO マウス、 β DGK δ hetero KO マウスを識別した (Fig. 8)。

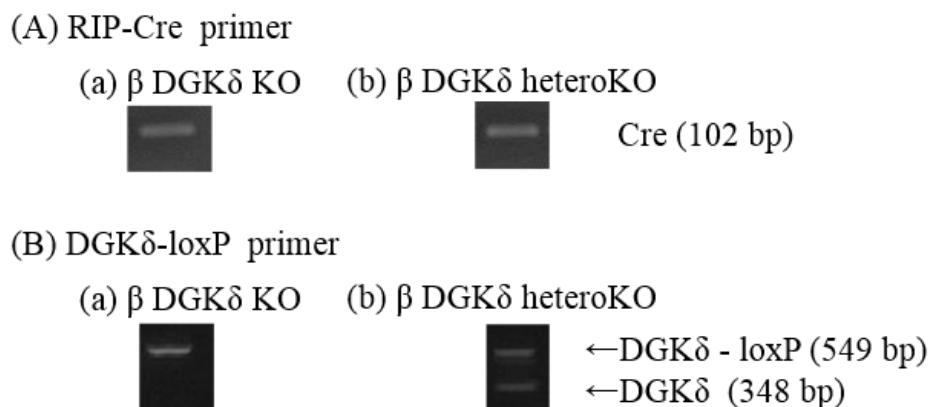


Figure 8. Expression of RIP-Cre and DGK δ -loxP in mouse.

Expression of RIP-Cre (A) and DGK δ -loxP (B) DNA in mouse was assessed by PCR.

1-3-8. 随時血糖値の測定

膵 β 細胞特異的 DGK δ の欠損が随時血糖値に及ぼす影響を調べた。Control マウス、 β DGK δ hetero KO マウス、 β DGK δ KO マウスについて、それぞれ 9-21 週齢にわたって、隔週で血糖値を測定した。その結果、 β DGK δ KO マウスの血糖値は低値を推移することが示された (Fig. 9)。

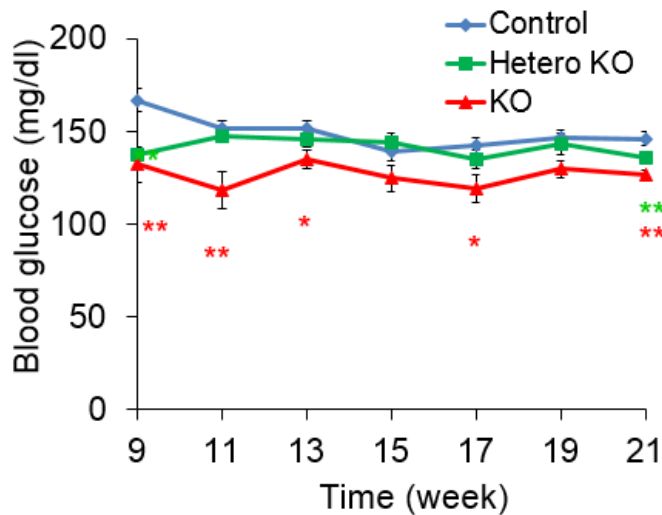


Figure 9. Changes in blood glucose level in control, β DGK δ hetero KO and β DGK δ KO mice.

Blood glucose level of control (n = 8–19), β DGK δ hetero KO (n = 17–28) and β DGK δ KO mice (n = 8–11) was measured once every two weeks. Values are mean \pm SEM from experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. control.

1-3-9. 耐糖能の評価

膵 β 細胞特異的 DGK δ の欠損による形質変化を確認する目的で、耐糖能の指標として経口糖負荷試験 (Oral glucose tolerance test: OGTT) を行った。その結果、 β DGK δ KO マウスは糖負荷による血糖上昇が抑制されることが示された (Fig. 10)。

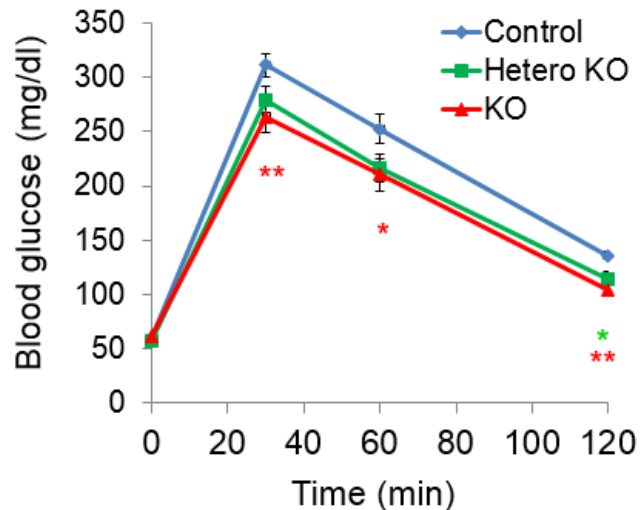


Figure 10. Changes in blood glucose level during oral glucose tolerance test (OGTT) in control, β DGK δ hetero KO, and β DGK δ KO mice.

OGTT was performed after fasting for 20 hours in control, β DGK δ KO, and β DGK δ hetero KO mice at 20 week olds. Values are mean \pm SEM from 9–12 experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. corresponding control.

1-3-10. 血漿インスリン濃度の測定

膵 β 細胞の重要な機能の一つとして、血糖降下ホルモンであるインスリンの分泌が挙げられる。膵 β 細胞の機能が障害されると、インスリン分泌量が減少し、血糖値が低下しにくくなる。そこで膵 β 細胞機能の指標として、マウスの尾より採血した血漿中のインスリン濃度を ELISA により測定した。その結果、 β DGK δ KO マウスおよび β DGK δ hetero KO マウスにおいて、control マウスに比較して、絶食負荷時における血漿インスリン濃度には違いが認められなかったが、自由摂食時における血漿インスリン濃度は有意に高値であった (Fig. 11)。

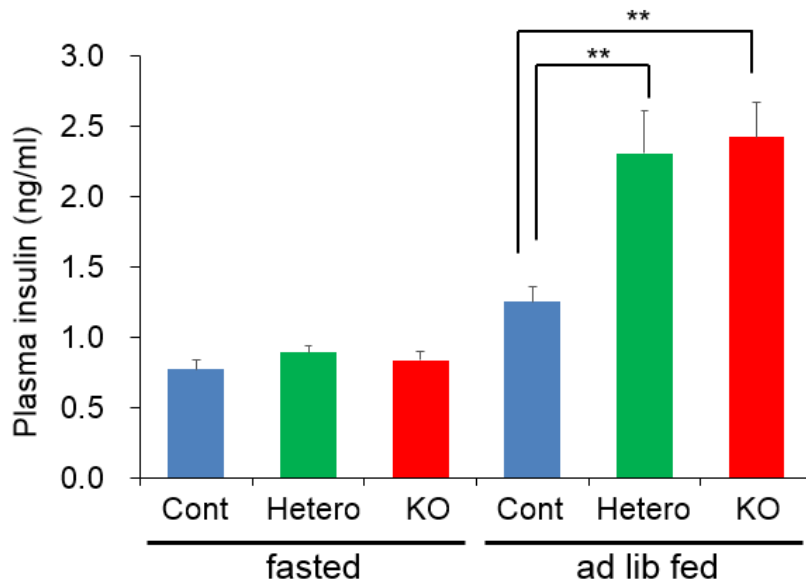


Figure 11. Changes in plasma insulin concentration in control, β DGK δ hetero KO, and β DGK δ KO mice.

Plasma insulin concentration were measured in control (Cont; n = 17), β DGK δ hetero KO (Hetero; n = 8), and β DGK δ KO mice (KO; n = 10) at 30 (ad lib fed) and 31 (fasted) weeks. Values are mean \pm SEM from 3–5 experiments. ** $P < 0.01$

1-3-11. マウス膵島を用いたインスリン分泌機能の評価

β DGK δ KO マウスにおいて、血中インスリン濃度の上昇が確認されたため、次に膵島のインスリン分泌能への影響を確認するために、batch incubation 法を用いてグルコース応答性インスリン分泌機能の評価した。1時間のインキュベーション中に分泌したインスリン量（分泌インスリン量）とインキュベーション後の膵島から抽出したインスリン量（抽出インスリン量）を測定した。またインスリン分泌量と抽出

インスリン量の和を総インスリン量として算出した。インスリン分泌能の指標は、分泌インスリン量を総インスリン量で除した数値 (%)を用いた。グルコース応答性を評価するために、グルコース濃度 2.8、11.1 および 16.7 mM の 3 条件で検討した。その結果、いずれの条件においても β DGK δ KO マウス膵島におけるグルコース応答性インスリン分泌能は、control との違いが認められなかった (Fig. 12)。

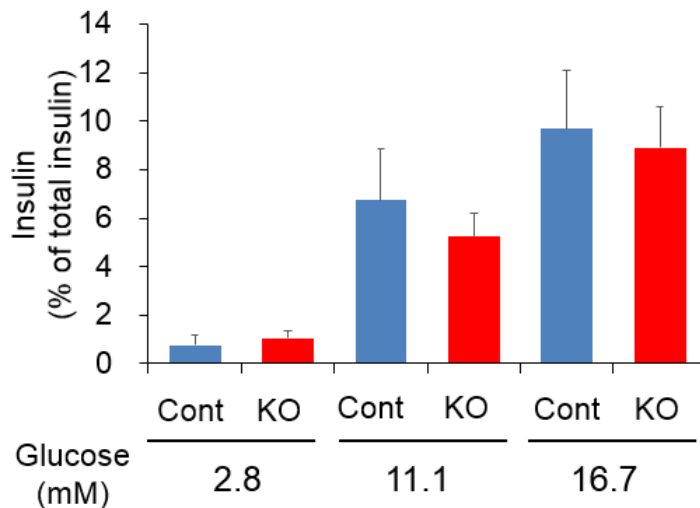


Figure 12. Glucose-stimulated insulin secretion from isolated islets of control and β DGK δ KO mice.

Insulin secretion from isolated islets of control (Cont) or β DGK δ KO mice (KO) at 2.8, 11.1, 16.7 mM glucose for 1 hr was measured. Insulin secretion rate is corrected as a percentage of the total cellular insulin contents of islets. Values are mean \pm SEM from 3–5 experiments.

1-3-12. マウス膵組織薄切切片を用いた膵 β 細胞増殖評価

膵 β 細胞特異的 DGK δ の欠損による膵 β 細胞増殖への影響を評価する目的で、 β DGK δ KO マウスの膵薄切切片を作成し、細胞増殖マーカーの Ki-67 およびインスリ

ンの特異的抗体で染色した。また核染色は DAPI により実施した。インスリン陽性領域にある核の数を膵 β 細胞数とした。細胞増殖の指標は、膵 β 細胞の Ki-67 陽性細胞の割合を用いた。膵 β 細胞の Ki-67 陽性細胞の割合は、インスリン陽性かつ Ki-67 陽性の細胞数を膵 β 細胞数で除することで算出した。さらに、膵臓の単位面積あたりの膵島の数を算出した。また膵島の大きさを反映する指標として、各クライオセクションに存在するインスリン陽性領域中の核の数を計測した。その結果、 β DKK δ KO マウスの膵 β 細胞では、Ki-67 陽性細胞の割合が control に比較して有意ではないものの増加傾向を示した (Fig. 13)。一方、 β DKK δ KO マウスの膵臓では、膵島の有意な増加が認められた (Fig. 14A)。特に、薄切切片上での核の数が 20 未満の小型の膵島数の増加が顕著であり、クライオセクションにおいて核の数が 20 個以下の膵島の数は β DKK δ KO マウスで有意に多かった (Fig. 14B)。これらの結果から、 β DKK δ KO マウスでは、膵 β 細胞の増殖亢進により小型の膵島の数が増加することが示された。

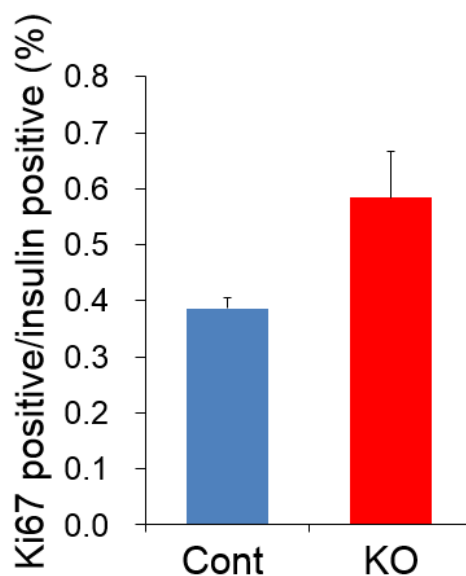


Figure 13. Proliferation rates of pancreatic β cells in control and β DKK δ KO mice.

The proliferation rate of β cells was estimated as the percentage of insulin and Ki-67 double-positive cells in total insulin cells in pancreas cryosections of control (Cont) and β DKK δ KO mice (KO). Values are mean \pm SEM from 3 experiments.

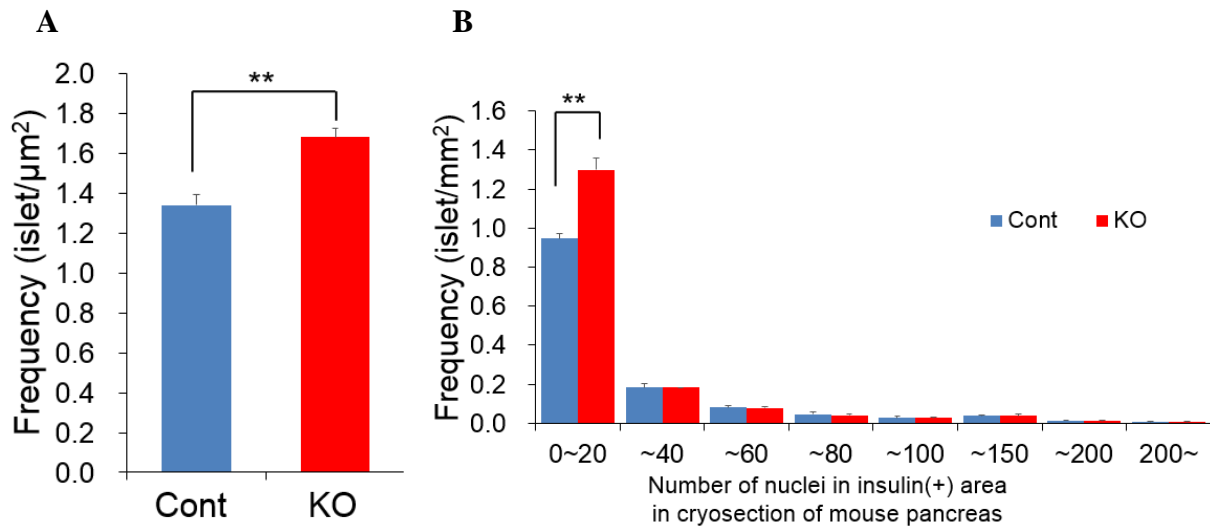


Figure 14. Numbers and size of pancreatic islets in control and $\beta\text{DGK}\delta$ KO mice.

A: the number of islets (insulin positive) per unit area in pancreas cryosections of control (Cont) and $\beta\text{DGK}\delta$ KO mice (KO) was calculated. B: A histogram was created for the number of nuclei in insulin positive area in pancreas cryosections of control (Cont) and $\beta\text{DGK}\delta$ KO mice (KO). Values are mean \pm SEM from 3 experiments. $**P < 0.01$

1-3-13. $\beta\text{DGK}\delta$ KO マウスの遺伝子発現解析

膵 β 細胞特異的 $\text{DGK}\delta$ の欠損による膵島数の増加および膵 β 細胞増殖傾向が確認されたため、膵島での遺伝子発現変化を確認する目的で、Real-time PCR 法を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、 $\beta\text{DGK}\delta$ KO マウスの膵 β 細胞では、細胞周期促進因子 cyclin B1 の発現上昇傾向が確認された (Fig. 15)。一方、cyclin B2 を含む他の細

胞周期関連遺伝子の発現に変化は認められなかった。また、insulin receptor substrate 2 (IRS2) の発現変化も認められなかった。これらのことから、 β DKK δ KO マウスの膵 β 細胞では、細胞周期促進因子の発現誘導を介した細胞増殖が亢進していると考えられた。

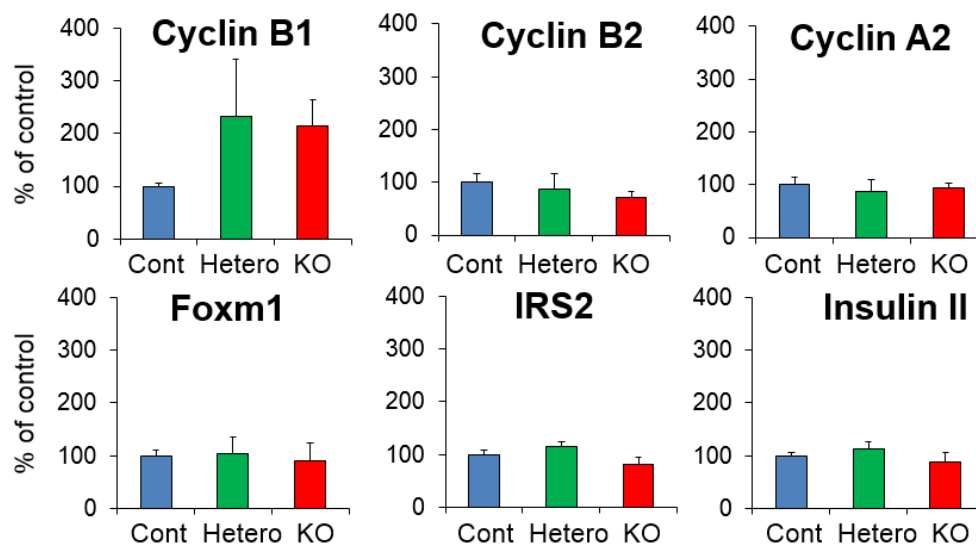


Figure 15. Gene expression profile in β DKK δ KO mice

Relative expression level of genes in islets of control (Cont; n = 5), β DKK δ hetero KO (Hetero; n = 3) and β DKK δ KO mice (KO; n = 3) were measured by real-time PCR. β -Actin was used as an internal control. Values are mean \pm SEM from 3-5 experiments.

1-4 考察

これまで膵β細胞におけるDGKδに関する報告はなく、DGKδの局在、機能は不明であった。本研究では、まずマウス膵β細胞およびMIN6B細胞における検討により、DGKδが主に膵β細胞の核に存在していることを示した。そこで次に、膵β細胞におけるDGKδの機能を解明するために、マウス膵β細胞株MIN6B細胞を用いてDGKδのノックダウンを行った。DGKδのノックダウンは、インスリン分泌能には影響を与えなかったが、細胞増殖を亢進した。さらに、βDGKδ KOマウスを作出し、糖代謝パラメーターに対する影響を確認した結果、随時血糖が低値を推移し、血中インスリン値が高値を示すことを見出した。しかし、摘出膵島のインスリン分泌能には変化が認められなかったが、膵臓の免疫染色の画像解析により、膵β細胞の増殖傾向および小型の膵島数の増加を確認した。さらに膵島における遺伝子発現変化を検討した結果、細胞周期促進因子のcylin B1の増加傾向が示された。これらの結果から、DGKδは、膵β細胞において細胞増殖を抑制する因子であることが示唆された。

DGKは、DAGをPAに代謝する酵素であるが、生体における機能は多様であり、細胞成長、神経伝達、細胞骨格に関連している²⁰⁾。また癌や心不全、糖尿病などの病態との関連も報告されているが、その機能は余り解明されていない²⁸⁾。DGKはアイソフォームによって発現組織が異なり、例えばDGKαは胸腺・脾臓など免疫系の組織に多く²⁹⁾、DGKβ, γ, η, θ, ζは脳に多いこと^{30), 31)}が報告されている。

DGKのアイソフォームの1つであるDGKδは、糖尿病との関連性の深いアイソフォームであり、DGKδと糖尿病病態に関する興味深い報告がなされている。まず、ラット筋芽細胞株であるL6細胞を高濃度グルコースで短期処置すると、DGKδは細胞質から細胞膜へ移行し、グルコース誘発GLUT4トランスロケーションを阻害するPKCαの活性を抑制することが報告されている²⁵⁾。一方で、初代培養ヒト筋管細胞を

高濃度グルコースで長期処置すると、DGK δ 発現量が低下することが示唆されている。さらに、DGK δ ハプロ不全マウスではインスリン抵抗性が惹起され、糖尿病モデル Goto Kakizaki (GK) ラットや2型糖尿病患者の骨格筋では DGK δ の発現量の低下が認められていることから、DGK δ の発現低下の原因として慢性的な高濃度グルコース曝露が示唆されている²⁴⁾。また、インスリン抵抗性を示す齧歯類やヒトの骨格筋において、細胞内 DAG レベルの上昇が報告されており^{32),33)}、高濃度グルコース曝露による DGK δ の発現減少が DAG 蓄積を亢進させる可能性がある。蓄積した DAG は、PKC の過剰な活性化やその他の因子を介してインスリン分泌減少や細胞機能障害を引き起こすと考えられており^{8,30,34)}、糖尿病病態における細胞質での DGK δ の発現減少は、DAG 蓄積をさらに亢進させ、細胞障害に関与する可能性がある。しかし、これらの報告は細胞質に存在する DGK δ の機能に関する報告であり、核内の DGK δ の機能については報告がない。

ヒトの DGK δ には、DGK δ 1、DGK δ 2 の2つのスプライシングバリエントが報告されている。このうち DGK δ 2 は脳や心臓、膵臓、骨格筋を含む全身の組織に発現が認められ、特に精巣や末梢血白血球において発現が高い³⁵⁾。DGK δ 1 は、子宮とわずかに脾臓に発現が認められるだけである³⁵⁾。ヒト膵臓において DGK δ の発現が確認されているが、膵島あるいは膵 β 細胞レベルでの発現は報告されていない。本研究において、マウス膵 β 細胞および MIN6B 細胞において DGK δ の mRNA レベルおよびタンパク質レベルでの発現が確認された。また、免疫染色による検討および MIN6B 細胞の分画を用いた western blotting の検討から、膵 β 細胞において DGK δ は細胞質と核に存在するが、特に核に高発現していることが明らかとなった。DGK の細胞内局在はアイソフォームにより異なり、核内に存在するアイソフォームとしては DGK α , ζ , θ が報告されている^{36),37)}。DGK α に関しては、siRNA を用いたノックダウンの検討により、内皮細胞において血管内皮増殖因子-A 誘発の増殖応答に Src 依存性の DGK α 活性化

が重要であることが報告されている³⁸⁾。また、DGK ζ に関しても、DGK ζ の過剰発現により細胞周期の進行が抑制されること、また、DGK ζ の kinase-dead 変異体や核移行シグナル変異体の導入により G₀/G₁ 期の細胞が蓄積することが報告されている³⁹⁾。こうした DGK ファミリーの報告から、膵 β 細胞の核に局在する DGK δ が膵 β 細胞の増殖に関与する可能性を考えた。

膵 β 細胞の増殖は、高脂肪食負荷や妊娠期の metabolic demand に応じた代償性過形成時や膵切除後に起こることが知られている。正常マウスに高脂肪食を負荷すると膵 β 細胞の代償性過形成が起こるが、IRS2 KO マウスでは、高脂肪食負荷による膵 β 細胞の代償性過形成が起こらない⁴⁰⁾。そのため、膵 β 細胞の増殖メカニズムとしては、代償性過形成にみられる IRS2 を介した経路が広く知られてきた⁴¹⁾。高脂肪食負荷により末梢組織においてインスリン抵抗性が惹起されることで、インスリン需要が増大し、代償的な膵 β 細胞の機能亢進が誘導され、インスリン分泌能の増大および細胞増殖が促進されると考えられている。しかし、最近、IRS2 KO マウスにおいても、膵部分切除により膵 β 細胞が増殖することが報告された⁴²⁾。すなわち、膵 β 細胞増殖には、古典的な IRS2 依存的なメカニズムだけでなく、新たな経路として IRS2 非依存的なメカニズムの存在が示され、膵 β 細胞増殖を作用機序とする新たな糖尿病治療ターゲットとしての可能性が考えられた。

膵 β 細胞の増殖の分子メカニズムについては不明な点が多いが、いくつか報告されている。細胞周期調節因子の cyclin D1/D2 および CDK4 は β 細胞増殖を促進する⁴³⁻⁴⁵⁾。また E2F1/2 のような細胞周期関連転写因子は、膵 β 細胞の増殖に必須である^{44), 46)}。一方、p15Ink4b、p18Ink4c、p27Kip1 といった細胞周期阻害因子は、膵 β 細胞の増殖を抑制する⁴⁷⁻⁴⁹⁾。また、膵 β 細胞の増殖を調節する遺伝子として NFAT、Menin、p53、Rb、Irs2 などが報告されている^{40, 50-53)}。最近、膵部分切除した IRS2 KO マウスにおいて膵 β 細胞が増殖することが報告され、遺伝子発現解析により cyclin B1 を含む細胞

周期促進因子群の発現上昇が明らかとなり、新たな膵β細胞の増殖メカニズムに注目が集まっている⁴²⁾。なかでも cyclin B1 は、Cdk1 と複合体を形成し M 期に核移行することが知られている⁵⁴⁾。cyclin B1 の核移行のメカニズムはリン酸化によって調節されており、PKC などのキナーゼとの相互作用が想定される。本研究において、βDGKδ KO マウスの免疫染色の検討により膵β細胞が増殖傾向にあり、小型の膵島の数が増加していることが確認された。さらに βDGKδ KO マウス膵島では、cyclin B1 の発現が上昇傾向を示したことから、βDGKδ KO マウスの膵β細胞では、細胞周期促進因子の発現上昇を介して細胞増殖が亢進していることが示唆された。

一方、核内 DAG と細胞増殖の関係については、盛んに研究されている。platelet-derived growth factor (PDGF)、insulin-like growth factor-1 (IGF-1) のような細胞増殖因子の刺激により、mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) - extracellular-signal-regulated kinase (ERK) 経路を介して核内の phosphoinositide phospholipase C (PI-PLC) β1 が活性化されると、核における DAG 産生が亢進し、PKCβII などの PKC が核移行し、核膜の分解が誘導され、細胞増殖が促進すると考えられている⁵⁵⁾。また核内 DAG と細胞周期との関係については、G2/M 期において核内 PI-PLCβ1 の活性化と PKC の核移行が観察されるが、同時に核内 DAG 濃度が上昇することが知られている⁵⁵⁾。最近、核内 DAG と PKCα 核移行を介した新たな増殖メカニズムが提唱された。この報告で用いられた細胞は膵β細胞ではないが、細胞増殖シグナルにより核内 DAG が上昇し、PKCα の核移行と cyclin B1 発現上昇を介して、mitosis が促進することで細胞周期が進行することが示された⁵⁶⁾。膵β細胞においても、同様な機序により核内 DAG 増加が細胞増殖を誘導するのかもしれない。本研究により DGKδ は膵β細胞の核に局在することが示されたことから、DGKδ は核内 DAG の代謝に関与することが考えられる。さらに、*in vitro* および *in vivo* における DGKδ の発現抑制により、膵β細胞が増殖することが示されたことから、DGKδ は核内 DAG

を代謝することで細胞増殖を抑制的に調節していると考えられた。

膵 β 細胞の増殖は、既存の膵 β 細胞から複製される replication、未分化細胞から分化誘導によって引き起こされる neogenesis、あるいは α 細胞など膵 β 細胞以外の細胞からの transdifferentiation によって引き起こされると考えられるが、一般にマウス膵 β 細胞の増殖は、replication が主体であることが報告されている⁵⁷⁻⁵⁹。しかし、胎生期以降の膵 β 細胞の replication は非常に少なく、齧歯類では分裂細胞の割合は 0.5% 以下と報告されており⁶⁰、ヒトでも同様に少ない⁵⁹。一方、妊娠期のように metabolic demand が高まると膵 β 細胞の replication が起こる^{61,62}。こうした代償性過形成では、大型の膵島が増加する。一方、 β DGK δ KO マウスの膵臓では、小型の膵島数が増加していた。さらに、 β DGK δ KO マウスの膵臓では、IRS2 の発現に変化が認められなかった。以上より、 β DGK δ KO マウスの膵 β 細胞の増殖は neogenesis による可能性が考えられた。

β DGK δ KO マウスでは、小型の膵島が有意に増加していることが確認された。一方、摘出膵島を用いたインスリン分泌能の評価では β DGK δ KO マウスは control マウスと比較して明確な差は認めないことから、 β DGK δ KO マウスでは、膵島が増加することにより、血中インスリン値が高値を示すと考えられた。

本研究では、DAG の代謝経路として DGK に焦点を当てて検討を行ったが、生体内において DAG は DGK だけでなく、DAG acyltransferase (DGAT) や DAG lipase によっても代謝され、量的な調節を受けている。DGAT に関しては、以前から、糖脂肪毒性条件下の膵 β 細胞において、DGAT が DAG を triacylglycerol (TAG) に変換することで細胞内に TAG を蓄積させ、毒性を示すのではないかという報告がなされてきた⁶³⁻⁶⁵。しかし近年では、DGAT が DAG を TAG に変換することで、むしろ膵 β 細胞保護的に機能しているのではないかという報告もあり⁶⁶、その機能については議論の余地があ

るが、細胞増殖に関する報告はない。一方、DAG lipase については、膵 β 細胞機能障害や細胞増殖についての報告はほとんどなく、今後の検討が待たれる。

2 型糖尿病は、インスリン抵抗性とインスリン分泌不全により、インスリン作用不足が生じ、食後高血糖から慢性的な高血糖へと進展していく病態である。インスリン分泌不全の原因としては、インスリン分泌の低下と膵 β 細胞量の減少が考えられる。現行の 2 型糖尿病治療体系は、3 種類に大別され、1) インスリン抵抗性改善薬 (Biguanides, Thiazolidinedione)、2) インスリン分泌促進薬 (Sulfonylureas, Glinides, DPP-4 inhibitors, GLP-1 analogs)、3) グルコース (再) 吸収阻害薬 (α -glucosidase inhibitors, SGLT2 inhibitors) があるが、膵 β 細胞を標的とした薬剤はインスリン分泌促進薬だけであり、膵 β 細胞量の減少を抑制する薬剤はない。本研究により、 β DGK δ KO マウスでは膵 β 細胞の増殖促進が示唆されたことから、新たな治療ターゲットの可能性が示唆された。

第 2 章 過酸化水素によって誘導される膵β細胞アポトーシスにおける初期 Ca^{2+} 応答の重要性

2-1 序論

1 型・2 型糖尿病は、病態の発症原因は異なるが、進行的な膵β細胞の機能障害を共通の特徴としている⁶⁷⁾。この膵β細胞の機能障害の原因の一つとして、膵β細胞のアポトーシスが挙げられる^{67, 68)}。膵β細胞のアポトーシスは、1 型糖尿病においては、膵島へ浸潤したリンパ球やマクロファージにより産生される炎症性サイトカインや活性酸素種 (ROS) により誘導される⁶⁹⁾。一方、2 型糖尿病における膵β細胞のアポトーシスは、早期よりインスリン分泌能に影響する要因の一つと考えられており^{67, 68)}、その誘導には ROS が中心的な役割を担っている。2 型糖尿病病態下では膵β細胞において ROS の産生が認められることや⁷⁰⁾、膵β細胞株である INS-1 細胞⁷¹⁾、MIN6N8a 細胞⁷²⁾および RINm5F 細胞³⁴⁾において ROS がアポトーシスを誘導することが報告されている。これらの報告より、膵β細胞における酸化ストレスは、アポトーシスの誘導を介して機能低下を引き起こすと考えられ、その作用機序を解明することは、膵β細胞機能保護による糖尿病治療や予防方法の開発に繋がることが期待される。

膵β細胞の特徴として、他の細胞に比べ酸化ストレスに対して脆弱であることが知られている^{3), 73)}。糖尿病病態下で膵β細胞のアポトーシスを誘導する主な因子として酸化ストレスと ER ストレスが挙げられ⁶⁷⁾、酸化ストレスにおいては、ROS (過酸化水素 H_2O_2 , スーパーオキシドアニオン O_2^- , ヒドロキシラジカル $\text{OH}\cdot$) が中心的な役割を担っている。この ROS の中でも反応性の高い O_2^- は、スーパーオキシドジスムターゼにより反応性の低い H_2O_2 に変えられ、 H_2O_2 分解酵素であるカタラーゼやグルタチオンペルオキシターゼによってさらに酸素と水に分解される。ラット膵β細胞で

は、 H_2O_2 分解酵素であるカタラーゼやグルタチオンペルオキシターゼの発現が肝細胞よりも 20 倍低いことが示されており³⁾、他の細胞に比べ酸化ストレスに対する感受性が高いと考えられている。本研究で用いたラット膵 β 細胞株である INS-1D 細胞は、初代培養膵島とカタラーゼの発現が同程度であり、他細胞よりも H_2O_2 分解酵素の発現が低い⁷³⁾。このことから、INS-1D 細胞における酸化ストレスに関する研究成果はインタクトな膵 β 細胞にも応用できる可能性が高いと考えられる。さらに、蓄積した H_2O_2 は、nuclear factor- κ B (NF- κ B)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) などのストレス応答因子を活性化し、ストレス応答シグナル経路を介して細胞死を引き起こすことが示唆されている⁷⁴⁾。

これまでの当研究室での検討により、膵 β 細胞株である INS-1D 細胞における H_2O_2 誘導アポトーシスには 30 分以内の初期の Ca^{2+} 応答が重要であることが示唆された⁷⁵⁾。この結論は以下の結果から導かれた。1) 細胞内 Ca^{2+} キレーターである 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester (BAPTA/AM)、inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) 受容体およびストア作動性チャネル (store-operated channels: SOCs) を含むカチオンチャネルを阻害する 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB)、 IP_3 受容体阻害剤の xestospongine D は、 H_2O_2 により誘導されるアポトーシスを完全に抑制した。2) 2-APB および SOCs を含むカチオンチャネルを阻害する Gd^{3+} は H_2O_2 による 2 相性の細胞内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇反応を抑制した。3) 2-APB 処置のタイミングを H_2O_2 添加 30 分後にすると、 H_2O_2 による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応に対する 2-APB の抑制効果は消失し、また H_2O_2 誘導アポトーシスに対する 2-APB の抑制効果は著しく減弱した。本報告では、 H_2O_2 によるこの初期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇応答とアポトーシス誘導との関係をさらに詳細に検討することを目的とした。

2-2 実験材料および実験方法

2-2-1. 膵 β 細胞株 INS-1D 細胞の培養

ラット由来膵 β 細胞株である INS-1D 細胞は、大分大学大学院医学系研究科薬理学教室の仁木一郎先生から、分株して頂いたものを用いた。実験には、18–36 代目の細胞株を使用した。INS-1D 細胞は INS-1 complete medium [10 mM HEPES, 10% FBS, 100 U/mL penicillin G, 100 μ g/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 50 μ M 2-mercaptoethanol を添加した RPMI 1640 medium] を用いて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。使用した FBS は、事前に 56°C、30 分間インキュベートすることで非働化処理を行った。培地交換は 2–3 日毎に行い、継代は 5–7 日毎に行った。継代は 0.025% trypsin/EDTA 溶液を 37°C、4 分間作用させることで細胞をディッシュから剥離し、5–6 倍希釈になるよう 90 mm dish に播種することで行った。

2-2-2. ミトコンドリア内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_m)の測定

[Ca²⁺]_m の測定には、Ca²⁺ 蛍光指示薬である rhod 2 を使用した画像解析により行った。ミトコンドリアへの集積性を高めるため、細胞へ負荷する直前に rhod 2/acetoxymethyl (AM) を NaBH₄ の添加により還元して dihydro-rhod 2/AM とした。緩衝液には、HEPES-buffered Krebs (HKB: 129 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 2.54 mM CaCl₂, 1.18 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, 5 mM NaHCO₃, 2.8 mM glucose, 0.1% bovine serum albumin (BSA) ; NaOH で pH 7.4 に調整) を用いた。カバーガラス上に播

種した INS-1D 細胞を 2 μM dihydro-rhod 2/AM および界面活性剤である 0.03% cremophor EL を含む HKB 溶液中に浸漬し、37°C で 2 時間インキュベーションした。その後、カバーガラスを倒立顕微鏡 (Diaphoto TMD300, Nikon, Tokyo) のステージ上にセットした温度制御付き恒温チャンバー (SC-20&TC-11, JASCO, Tokyo) に装着した。そして、37°C に保温されたチャンバー内を、ペリスタポンプを利用して流速 1 mL/min で予め 37°C に温めた HKB 溶液で灌流した。

$[\text{Ca}^{2+}]_m$ の画像解析には、AQUACOSMOS システム (Hamamatsu photonics, Shizuoka) を用いた。100 W のキセノンランプを光源として、rhod 2 を導入した INS-1D 細胞に 540 nm の励起光を 8 秒間隔で 20 倍の蛍光対物レンズ (XPS-100, Nikon, Tokyo) を通して照射し、580 nm で蛍光画像を取得した。また、蛍光強度による擬似カラーイメージをコンピュータに記録した。この蛍光強度を $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の変化の指標として用いた。蛍光強度が安定した時点で測定を開始した (0 time)、120 分間以内に測定を終了した。試薬は灌流用の HKB 溶液に添加された。

2-2-3. SDS-PAGE を用いたタンパク質分離

100 μM H_2O_2 を 18 時間処置した INS-1D 細胞を、0.25% トリプシン溶液を用いて回収し、遠心 (200 x g, 4°C, 15 分間) を行った。その後、Cell fractionation kit standard (ab109719, abcam, Cambridge, UK) を用いて、細胞質画分とミトコンドリア画分に分画した。分画方法は、メーカープロトコールに従った。サンプル用の試料は、さらに loading buffer で 2 倍希釈し、5 分間煮沸した後、-20°C で保存した。

タンパク質濃度測定は、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) を用いた。BCA Protein Assay Kit の BSA 溶液 (2.0 mg/mL) は Cell fractionation kit の

Buffer A で 1, 2, 4, 8, 16 倍に希釈し用いた。回収した試料は、試料、標準液ともに 10 μ L ずつエッペンドルフチューブに分注した。それに BCA Protein Assay Kit の A 液と B 液の混合液 (A:B= 50:1) を 200 μ L ずつ添加し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 30 分間インキュベートした。室温に戻した後、96 well plate に 150 μ L ずつ分注し、マイクロプレートリーダーを用い、550 nm で吸光度を測定し、試料中のタンパク質濃度を求めた。

泳動前に、試料を 5 分間煮沸し、タンパク定量の結果に基づき、タンパク質含量が等しくなるように試料を 4–20% ミニプロティアン TGX プレキャストゲルにアプライし、泳動 buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) 中で、電気泳動用精密安定電源 (パワーパック Universal, BIO-RAD, CA, USA) を用いて 200 V で約 25 分間泳動した。

2-2-4. Western blotting によるシトクロム *c* 解析

電気泳動が終了したゲルに PVDF 膜 (トランスブロット Turbo ミニ PVDF 転写パック, BIO-RAD, CA, USA) を接着させ、セミドライおよび高速ブロッティングシステム (トランスブロット Turbo, BIO-RAD, CA, USA) で、7 分間転写した。以降の操作は全て、SNAPid システム (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いて行った。TBS-T (10 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween) で 20 倍に希釈した Blocking One (Nacalai Tesque, Kyoto) を用い、室温にて 20 秒間ブロッキングを行った。一次抗体、二次抗体ともに室温で 10 分間反応させた。一次抗体には、anti-cytochrome *c* antibody あるいは anti β -tubulin antibody を Can Get Signal solution 1 (NKB-201, TOYOBO, Osaka) により 1000 倍希釈したものを用い、二次抗体には horseradish peroxidase-conjugated goat

anti-mouse IgG あるいは horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG を Can Get Signal solution 2 (NKB-301, Toyobo, Osaka) でそれぞれ 800 倍、1000 倍に希釈したものをを用いた。洗浄は全て TBS-T を用いて行った。シグナルは SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34094, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) と Imaging Quant LAS4000 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) による画像処理を用いて検出した。シグナル強度は MultiGauge software (Fujifilm, Tokyo) を用いて定量化した。シトクロム *c* の漏出をアポトーシスの指標とした。

2-2-5. 生細胞数の測定

INS-1D 細胞に 100 μM H_2O_2 を処置することでアポトーシスを誘導させ、 H_2O_2 添加 18 時間後に生細胞数を測定した。生細胞数の測定には、ミトコンドリア脱水素酵素活性測定を測定原理とする 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイ試薬の Cell Counting Kit-8 溶液 (CK04, Dojindo, Tokyo) を使用し、各 well に 10 μL ずつ添加した。37°C、5% CO_2 インキュベーター内で 2 時間呈色反応を行った後、マイクロプレートリーダー (Envision, PerkinElmer, MA, USA) を用い、450 nm の吸光度を測定した (参照波長 : 615 nm)。

2-2-6. 使用試薬

N-2-Hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)

Poly-L-lysine

| | |
|--|-------------------------------------|
| Fura PE-3/AM | |
| Trypsin | |
| 2-Mercaptoethanol | (以上 Sigma-Aldrich, MO, USA) |
| RPMI-1640 | |
| Sodium pyruvate | |
| 過酸化水素 (H ₂ O ₂) | (以上 WAKO, Osaka) |
| Fatal bovine serum (FBS) | (Gibco, CA, USA) |
| Bovine serum albumin (BSA) | (Roche, Basel, Switzerland) |
| Penicillin G potassium | |
| Streptomycin sulphate | (以上 Meiji Seika, Tokyo) |
| Cremophor EL | (nacalai tesque inc, Kyoto) |
| Ru360 | |
| 2-aminoethoxydiphenoxylborate (2-APB) | (以上 Merck KGaA, Darmstadt, Germany) |

また、上記以外の試薬はすべて特級規格品を使用した。

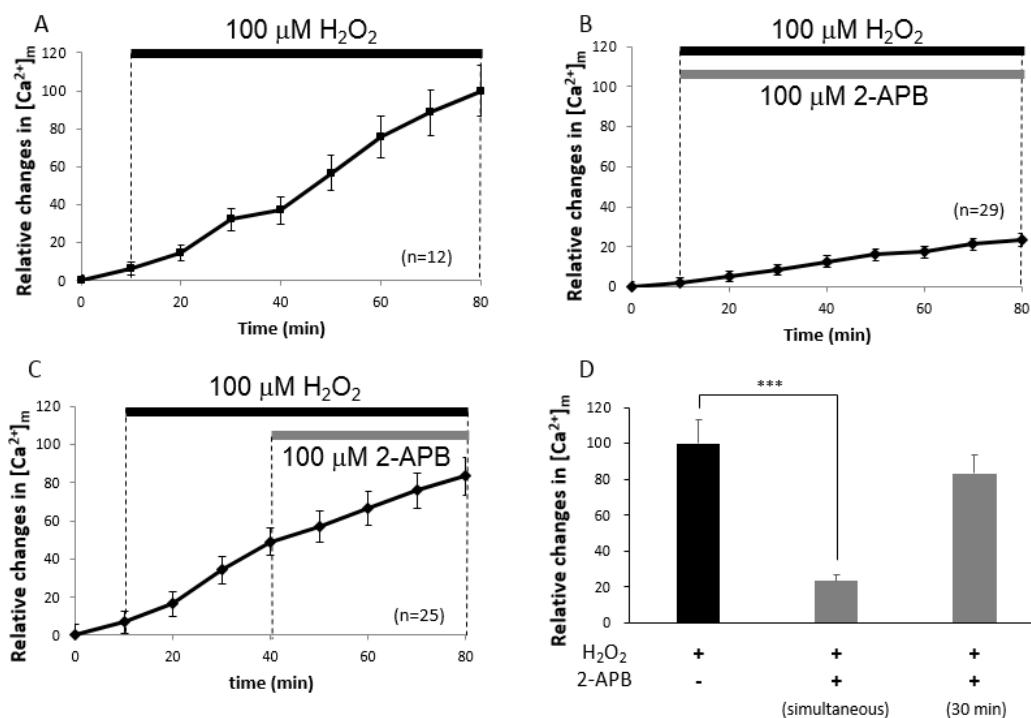
2-2-7. 統計学的解析

データは、平均値 (mean) ± 標準誤差 (SEM)、実験例数は n で示した。2 群の比較には *t* 検定を、3 群以上の比較には Dunnett の検定を適用し、危険率 5 % 未満 ($p < 0.05$) を有意差ありと判定した。

2-3 実験結果

2-3-1. H₂O₂誘導[Ca²⁺]_m上昇反応に対する2-APBの時間依存的効果

当研究室の以前の検討により、INS-1D 細胞における H₂O₂ によるアポトーシス誘導には、刺激 30 分以内の初期の[Ca²⁺]_c 上昇反応が重要であることが示されている。そこで、[Ca²⁺]_c 上昇からアポトーシス誘導に至る過程として考えられる[Ca²⁺]_m に対する H₂O₂ の作用を調べた。H₂O₂ (100 μM) の接触により、持続的な[Ca²⁺]_m 上昇反応が惹起された (Fig. 16A)。2-APB (100 μM) を H₂O₂ と同時に接触すると、H₂O₂ により誘発された[Ca²⁺]_m 上昇反応は有意に抑制された (Figs. 16B, 16D)。しかし、H₂O₂ 接触 30 分後に 2-APB を接触した場合には、[Ca²⁺]_m 上昇の抑制効果は認められなかった (Figs. 16C, 16D)。なお、各実験の終わりに、ミトコンドリア脱共役剤である FCCP および ATP 合成酵素阻害薬である oligomycin の接触により蛍光強度が減少することを観察することで、蛍光強度の変化が[Ca²⁺]_m の変化を反映していることを確認した (Figs. 16E)。



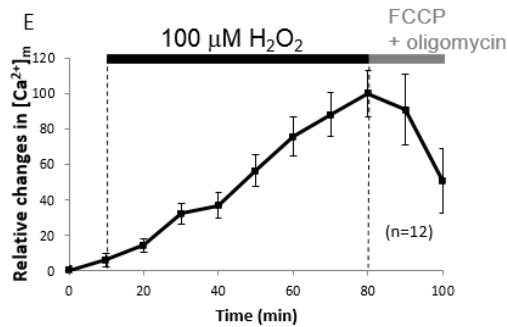


Figure 16. Time-dependent effect of 2-APB on H₂O₂-induced [Ca²⁺]_m elevation.

Changes in [Ca²⁺]_m after the addition of H₂O₂ (100 μM) in INS-1D cells loaded with dihydro-rhod 2 (A–C). 2-APB (10 μM) was added simultaneously with H₂O₂ (B) or 30 min after the addition of H₂O₂ (C). Vertical bars represent the SEM. The effect of 2-APB on the H₂O₂-induced [Ca²⁺]_m elevation was assessed by measuring the relative changes in [Ca²⁺]_m at 80 min (D). Representative data of the FCCP plus oligomycin-exposed fluorescence change in order to confirm a fluorescence change shows an exact [Ca²⁺]_m (E). The values were normalized to the averaged value of [Ca²⁺]_m at 80 min. The bar graphs show the mean ± SEM of 12–29 cells from three experiments. ****P* < 0.001.

2-3-2. H₂O₂ 誘導シトクロム *c* 漏出に対する 2-APB の時間依存的効果

顕微鏡下で INS-1D 細胞を観察したところ、H₂O₂ (100 μM) 接触により 18 時間後の生細胞数は顕著に減少していた。しかし、2-APB (100 μM) の同時接触において生細胞数の減少は抑制された (Fig. 17A)。一方、2-APB の 30 分後接触においては、生細胞数の減少抑制効果はほとんど認められなかった。そこで、2-APB によるアポトーシスの抑制効果について、ミトコンドリアからのシトクロム *c* の漏出を指標として検討し

た。その結果、細胞質分画において H_2O_2 によるシトクロム *c* の漏出は 2-APB 同時接触により抑制された (Fig. 17B)。一方、2-APB の 30 分後接触では、漏出抑制効果は認められず、むしろ漏出増加傾向を示した (Fig. 17B)。

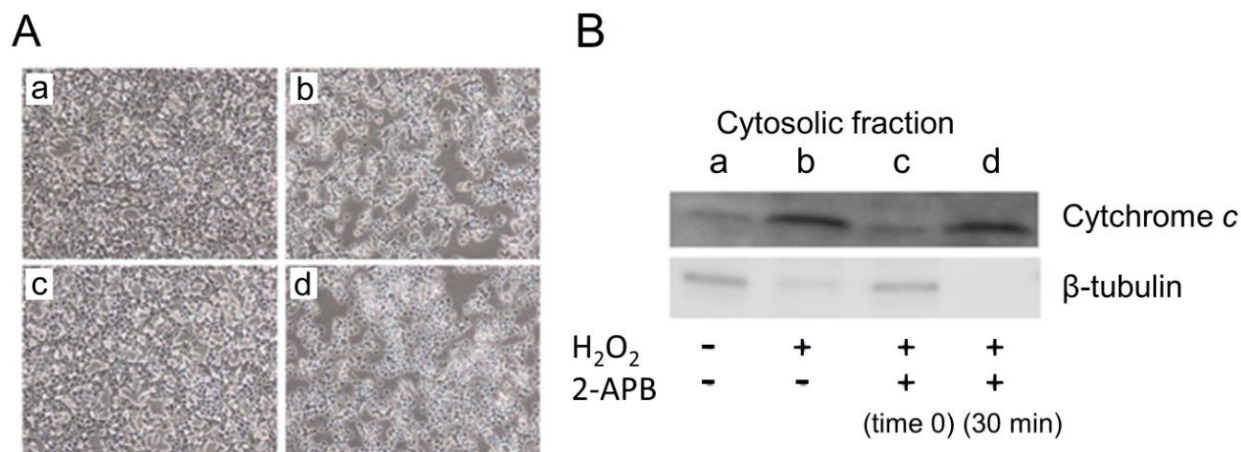


Figure 17. Time-dependent effect of 2-APB on H_2O_2 -induced cytochrome *c* release.

Typical images of INS-1D cells after exposure without (a) and with H_2O_2 (100 μM ; b–d) for 18 h (A). 2-APB (100 μM) was added simultaneously with H_2O_2 (c) or 30 min after the addition of H_2O_2 (d). Cytochrome *c* release in the cells shown in panel A was analyzed by western blotting with an anti-cytochrome *c* antibody (B). Similar results were obtained in three independent experiments.

2-3-3. H_2O_2 誘導 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}}$ 上昇反応およびアポトーシスに対する Ru360 の効果

IP_3 受容体及びSOCsを阻害する 2-APB は H_2O_2 による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}}$ 上昇を抑制し (Fig. 16)、さらにミトコンドリアからのシトクロム *c* 漏出を抑制した (Fig. 17B)。そこで、細胞

質の Ca^{2+} をミトコンドリア内に取り込む分子として知られているミトコンドリア Ca^{2+} ユニporter (mitochondrial Ca^{2+} uniporter: MCU) の関与を、その特異的阻害薬である Ru360 を用いて検討した。

まず、 H_2O_2 による $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇に対する Ru360 の効果について検討した。Ru360 (10 μM) 存在下においても、 H_2O_2 (100 μM) の接触により、コントロール (Fig. 18A) と同様な持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の上昇反応が惹起された (Fig. 18B)。

次に、 H_2O_2 誘導アポトーシスに対する Ru360 の効果について検討した。MTT アッセイにより生細胞数の測定を行ったところ、2-APB (100 μM) は H_2O_2 (100 μM) による生細胞数の減少反応を抑制したのに対し、Ru360 (10 μM) は抑制しなかった (Fig. 18C)。つまり、Ru360 感受性の MCU は H_2O_2 誘導アポトーシスに関与しないことが示唆された。

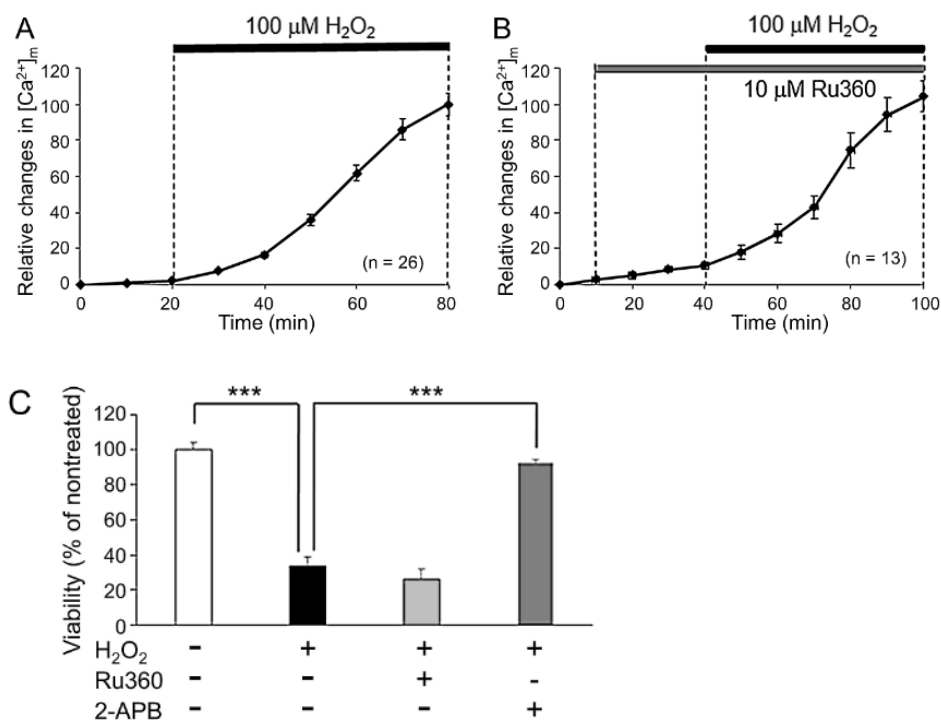


Figure 18. Effects of the MCU inhibitor Ru360 on H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_m$ elevation and cell death.

Typical traces of the changes in $[\text{Ca}^{2+}]_m$ after the addition of H_2O_2 (100 μM) in INS-1D cells

loaded with dihydro-rhod 2 in the absence (A) and presence of Ru360 (10 μM ; B). Ru360 was added 30 min before the addition of H_2O_2 . Vertical bars represent the SEM. H_2O_2 -induced cell death was assessed with the MTT assay 18h after the addition of H_2O_2 . (C). Ru360 (10 μM) or 2-APB (100 μM) was added 30 min before the addition of H_2O_2 (100 μM). The values were normalized to control values from cells without H_2O_2 . The bar graphs show the mean \pm SEM of 13–26 cells from two experiments. *** $P < 0.001$.

2-4 考察

これまでに当研究室では、INS-1D 細胞における H_2O_2 によるアポトーシス誘導には、 IP_3 受容体からの Ca^{2+} 遊離および SOC_s を介した Ca^{2+} 流入により 30 分以内に生じる初期の $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 上昇が重要な役割を担っていることを報告している⁷⁵⁾。本研究では、 H_2O_2 処置により誘導されるアポトーシスにおける初期の $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 上昇の重要性を示す更なるエビデンスを提示した。すなわち、 H_2O_2 により惹起される持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇、および細胞質へのシトクロム *c* の漏出が、 IP_3 受容体と SOC_s を阻害する 2-APB を H_2O_2 と同時に接触することにより抑制されることを示した。以上より、 H_2O_2 処置により誘導される初期の一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 上昇が、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇とミトコンドリアからのシトクロム *c* の漏出に緊密に関係しており、これらによりアポトーシスが誘導されることが示唆された。しかし、MCU 阻害剤である Ru360 は、 H_2O_2 により誘導される $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇や細胞死に影響を与えなかった。このことは、ER とミトコンドリアとの間での Ca^{2+} シグナルカップリングに MCU が関与していないことを示唆している。

以前、当研究室では、INS-1D 細胞を H_2O_2 で処置すると、処置後 30 分位までの小さな一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 上昇と、その後の顕著で持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 上昇という、2 相性の $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 上昇反応が惹起されること、さらに、 IP_3 受容体および SOC_s を含むカチオンチャンネルを阻害する 2-APB により、その第 1 相が完全に抑制され、第 2 相も部分的に抑制されることを示した。また、非選択的カチオンチャンネル阻害薬である Gd^{3+} も初期の一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 上昇反応を抑制したが、その抑制効果は部分的であった。これらの結果は、 H_2O_2 誘導アポトーシスが 2-APB あるいは IP_3 受容体阻害剤の xestospongin D により完全に抑制され、SOC_s を含む非選択的カチオンチャンネル阻害剤の SKF-96365 では部分的にしか抑制されないという以前のアポトーシス解析の結果⁷⁵⁾とよく一致する。これらの知見から、INS-1D 細胞における H_2O_2 誘導アポトーシスには、おそらく

ER 膜上の IP₃ 受容体を介した Ca²⁺ 放出が主に関与し、細胞膜上のカチオンチャネルからの Ca²⁺ 流入も一部関与していると考えられた。ただし、Gd³⁺ よりも 2-APB の方が [Ca²⁺]_c 上昇反応抑制効果が高いこと、さらに 2-APB は第 1 相の [Ca²⁺]_c 上昇反応をほぼ完全に抑制することから、2-APB による初期の [Ca²⁺]_c 上昇反応抑制効果には IP₃ 受容体阻害の寄与が高いことが考えられた。

ミトコンドリアからのシトクロム *c* の漏出は、アポトーシスを誘導する。INS-1D 細胞を H₂O₂ で処置することにより細胞質へのシトクロム *c* の漏出が確認されたが、2-APB を同時処置することでシトクロム *c* の漏出は抑制された。このことから、H₂O₂ 誘導アポトーシスにおけるミトコンドリアからのシトクロム *c* 漏出シグナルの上流に、ER 膜上にある IP₃ 受容体を介した Ca²⁺ 遊離が存在すると考えられた。ミトコンドリアの電子伝達系の構成分子であるシトクロム *c* は、アポトーシス誘導刺激によりミトコンドリアから放出されることが報告されている。放出されたシトクロム *c* は apoptotic protease activating factor-1 と結合し、apoptosome 複合体を形成してアポトーシスを引き起す⁷⁶⁾。また [Ca²⁺]_m 上昇は、ミトコンドリア内膜 (IMM) とミトコンドリア外膜 (OMM) との間にタンパク質複合体を形成し、ミトコンドリア透過性を調節する mitochondrial permeability transition pore (PTP) の形成を誘導する。シトクロム *c* は、PTP を通じてミトコンドリアから放出される⁷⁷⁾。さらに、[Ca²⁺]_m 上昇は IMM 内のリン脂質である cardiolipin からのシトクロム *c* の解離を促進し、その解離はミトコンドリアからのシトクロム *c* 放出の重要な反応と考えられている⁷⁷⁾。シトクロム *c* は、tBax、Bak、tBid のようなアポトーシス促進性タンパク質を含む経路を介した放出も認められる⁷⁷⁾。しかし、INS-1D 細胞における H₂O₂ 誘導アポトーシスでは [Ca²⁺]_m 上昇が認められるため、PTP を介したメカニズムの関与が想定された。

興味深いことに、ER とミトコンドリアは構造的、機能的に相互作用することが知られている。Mitochondria-associated membranes と呼ばれるサブドメインは、ER-ミト

コンドリア間の Ca^{2+} 伝達と脂質合成に関与している⁷⁸⁾。ER とミトコンドリアが接触していることは蛍光標識により可視化された生細胞において確認されている⁷⁹⁾。また、ER-ミトコンドリア間に高濃度の Ca^{2+} のマイクロドメインが存在することが報告されている⁷⁹⁾。こうした ER-ミトコンドリア間の Ca^{2+} カップリングは、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇を介したアポトーシス誘導には大変好都合な機構だと言えよう。本研究においても、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇とシトクロム *c* の漏出が 2-APB により抑制されたことから、ER-ミトコンドリア間の Ca^{2+} カップリングが INS-1D 細胞における H_2O_2 誘導アポトーシスに寄与している可能性が考えられる。

$[\text{Ca}^{2+}]_m$ が上昇するためには、 Ca^{2+} はミトコンドリアにある OMM および IMM を通過しなければならない。OMM では電位依存性アニオンチャネルが、IMM では MCU 複合体が Ca^{2+} 透過性を担っている⁸⁰⁾。さらに MCU 複合体は、チャネルを形成するサブユニットの MCU や MCU の調節因子である mitochondrial Ca^{2+} uptake 1、mitochondrial Ca^{2+} uniporter regulator 1 などから構成される⁸¹⁾。膵 β 細胞において、グルコースによって誘導される $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇には MCU が関与しているという報告がある⁸²⁾。MCU の機能評価においては、従来 MCU 阻害剤として Ruthenium red が用いられてきたが、近年では、膜透過性の良い MCU 選択的な阻害剤として Ru360 が用いられている^{83), 84)}。本研究においては、驚いたことに、 H_2O_2 により誘導される INS-1D 細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇と細胞死において、Ru360 は抑制効果を示さなかった。同じ濃度の Ru360 は、膵 β 細胞株の RINm5F 細胞において、IL-1 β によって誘導される $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇を抑制した報告がある⁸⁵⁾。その論文では、IL-1 β 処置後、8 時間後では $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇は認められず、12、24 時間後に $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇が認められている。すなわち、IL-1 β 処置によるミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入は、時間的なずれ（遅れ）があるようである。以上より、IL-1 β によって誘導されるアポトーシスと H_2O_2 によって誘導されるアポトーシスは、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の時空間的なメカニズムに違いがある可能性が考えられた。

本研究において、 H_2O_2 処置 30 分後に 2-APB を添加した場合、シトクロム *c* の漏出がむしろ増加する傾向が見られた (Fig. 17)。2-APB は、 IP_3 受容体およびカチオンチャンネルの阻害に加え connexin36 (Cx36) や Cx50 のような connexin によって形成されるギャップ結合チャンネルを阻害することが知られている⁸⁶⁾。このうち Cx36 は、膵 β 細胞間でのギャップ結合を形成しており、サイトカインや細胞障害性薬剤が誘導するアポトーシスに対して、膵 β 細胞保護作用を示すことが報告されている⁸⁷⁾。条件によっては、2-APB はギャップ結合を阻害することにより、アポトーシスを増強する可能性が考えられた。

本研究により、 H_2O_2 によって誘導されるアポトーシスにおいて、ER 膜上の IP_3 受容体を介した Ca^{2+} 放出と、引き続き起こるストア作動性 Ca^{2+} が重要であるという仮説を支持する結果が得られた。さらに、こうした H_2O_2 により惹起される初期の一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 上昇が、おそらく MCU 非依存的な経路を介して持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の上昇を誘導し、シトクロム *c* を漏出させ、アポトーシスが誘導されるという機序が示唆された。さらに、 IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出を抑制する薬物には、 H_2O_2 のような酸化ストレスによる膵 β 細胞のアポトーシスを抑制する可能性が考えられ、膵 β 細胞量維持効果をもたらす新規糖尿病治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

総括

2型糖尿病は、インスリン分泌不全やインスリン抵抗性によるインスリンの相対的作用不足によって起こる慢性的な高血糖状態を呈する代謝性疾患である。近年、1型糖尿病のみならず2型糖尿病でも膵β細胞量が低下していることが報告され、2型糖尿病のインスリン分泌不全への膵β細胞量低下の関与が示唆されている。したがって、膵β細胞量の調節は2型糖尿病の新たな治療ターゲットとして注目されているが、膵β細胞の増殖調節や2型糖尿病におけるβ細胞量低下の機序については未だ解明されていない部分が多い。そこで本研究では、膵β細胞量の調節に関わる細胞内情報伝達系を明らかにすることを目的として、第一章では膵β細胞量調節におけるジアシルグリセロールキナーゼδ(DGKδ)の役割について、第二章では酸化ストレス誘発膵β細胞アポトーシス調節におけるCa²⁺シグナルの役割について検討を行った。

ジアシルグリセロール(DAG)は、様々な細胞において細胞生存や細胞増殖など多様な機能を有することが知られており、膵β細胞においてもインスリン分泌調節への関与が示されている。ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)はDAGをリン酸化し、ホスファチジン酸(PA)へと変換する酵素であり、哺乳類では10種類のアイソフォームが確認されている。中でもDGKδは、2型糖尿病患者の骨格筋における発現低下がインスリン抵抗性に関与することが報告されており、DGKδは糖尿病病態に関連の深いアイソフォームである。しかし、膵β細胞におけるDGKδの役割については、発現を含め全くわかっていない。そこで、第一章では膵β細胞におけるDGKδの機能解析を行い、DGKδが膵β細胞増殖調節に関与することを示唆する知見が得られた。

まず、マウス膵β細胞株MIN6B細胞およびC57BL/6Jマウス膵薄切切片における

免疫染色により、DGK δ が膵 β 細胞の核に局在していることを確認した。siRNA により DGK δ をノックダウンした MIN6B 細胞を用いて機能解析を行ったところ、DGK δ ノックダウンによりインスリン分泌能に変化は認められなかったが、細胞増殖の指標である BrdU の取り込み量の増大が認められた。そこで、膵 β 細胞特異的 DGK δ 欠損 (β DGK δ KO) マウスを作出し、発現形質について解析した。 β DGK δ KO マウスでは、コントロールマウスに比べて随時血糖値が低値を示し、血漿インスリン値は有意に高値であった。また、糖負荷試験による血糖上昇も有意に小さかった。しかし、単離膵島におけるインスリン分泌能には変化は認められなかった。一方、膵 β 細胞の増殖亢進傾向および小型の膵島数の増加が認められた。さらに、膵島では細胞周期促進因子である cyclin B1 の mRNA 発現が増加傾向を示した。以上の結果から、DGK δ は核内 DAG を代謝することで膵 β 細胞増殖を抑制的に制御しており、DGK δ の発現抑制は核内 DAG 増加による細胞周期亢進作用を介した膵 β 細胞増殖を促進することが示唆された。

2 型糖尿病における膵 β 細胞機能障害の一因として、過酸化水素 (H_2O_2) を含む活性酸素種による膵 β 細胞アポトーシスが知られている。当研究室では、 H_2O_2 による膵 β 細胞アポトーシスが IP_3 受容体および SOC s を含むカチオンチャネルを阻害する 2-APB により抑制されることを報告している⁷⁵⁾。膵 β 細胞株 INS-1D 細胞に H_2O_2 を処置すると、30 分以内の一過性の小さな $[Ca^{2+}]_c$ の増加 (第 1 相) と持続的な増加 (第 2 相) を伴う 2 相性の $[Ca^{2+}]_c$ 増加反応を示す。 H_2O_2 処置と同時に IP_3 受容体およびストア作動性カチオンチャネルを阻害する 2-APB を作用させると、第 1、2 相ともに $[Ca^{2+}]_c$ 上昇反応が抑制される。一方、 H_2O_2 処置 30 分後に 2-APB 処置しても、 $[Ca^{2+}]_c$ 上昇は抑制されない。以上より、2-APB の処置タイミングの違いにより $[Ca^{2+}]_c$ に対する影響が異なることが示唆されている。そこで第二章では、 H_2O_2 誘導性の膵 β 細胞アポトーシスにおける Ca^{2+} シグナルの重要性を明らかにすることを目的とした。

方法としては、 Ca^{2+} シグナルの指標として、ミトコンドリア内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) を計測した。さらに、アポトーシスの指標としてシトクロム *c* の漏出を、細胞死の指標として MTT アッセイを用いた。 H_2O_2 により惹起される $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の持続的な増加反応は 2-APB 同時処置で強く抑制されたが、2-APB 後処置では効果は認められなかった。さらに、 H_2O_2 により惹起されるミトコンドリアから細胞質へのシトクロム *c* の漏出および細胞死の増大も 2-APB 同時処置により抑制され、2-APB 後処置では変化しなかった。一方、 H_2O_2 による $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇および細胞死は、MCU 阻害剤 Ru360 では抑制されなかった。以上の結果から、 H_2O_2 による IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出が主体となる初期の $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 上昇反応が、後に続く MCU 非依存的な $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の上昇と、引き続き起こるシトクロム *c* の漏出およびアポトーシスのトリガーとなることが示唆された。

糖尿病において、膵 β 細胞量を維持あるいは回復させることは、根本治療に繋がると考えられる。本研究により、DGK δ が膵 β 細胞の増殖を抑制的に調節する因子であること、および酸化ストレスによる膵 β 細胞アポトーシス誘導は IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出を抑制することで制御できることが示唆された。すなわち、DGK δ の抑制は膵 β 細胞増殖促進効果をもたらす新規糖尿病治療ターゲットとなりうる可能性が示され、一方、 IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出抑制は膵 β 細胞量維持効果をもたらす新規糖尿病治療のターゲットとなりうる可能性が示された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始親切なる御指導、御鞭撻を賜りました石川智久教授、金子雪子助教に深く感謝致します。また、研究途上、御助言や御指導を賜りました齊藤真也准教授、小原一男講師には篤く御礼申し上げます。また本論文の作成に際し、御高閲、御助言を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院 生体情報分子解析学教室 菅谷純子教授、生化学教室 鈴木隆教授、創薬探索センター 浅井章良教授に深謝いたします。

マウス由来膵 β 細胞株 MIN6B を供与していただいた大阪大学医学系研究科の宮崎純一教授に深く感謝いたします。抗 human DGK δ WB-1 抗体、DGK δ -loxP トランスジェニックマウスを分与していただいた千葉大学大学院理学研究科生体機能化学研究室の坂根郁夫教授に深く感謝いたします。ラット由来膵 β 細胞株 INS-1D 細胞を分株していた大分大学大学院医学系研究科薬理学教室の仁木一郎先生に深く感謝いたします。

実験のサポートを頂いた石渡千裕学士、澤谷俊明学士、千葉里菜学士、中山貴寛さん、石川揚子さんをはじめ、本学薬学部薬学科薬理学分野、薬学研究院薬理学教室の皆様心より感謝致します。

また、中外製薬株式会社において、本研究を遂行するにあたり、深い御理解と御支援を賜りました創薬薬理研究第一部部長の川邊良樹博士、グループマネージャーの鈴木好幸博士、深澤正徳博士、嶋田英輝博士をはじめ創薬薬理研究機能の皆様へ深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) International Diabetes Federation. "IDF Diabetes Atlas Sixth Edition ": <http://www.idf.org/diabetesatlas/update-2014>.
- 2) Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A: β -cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*, **50 Suppl 1**, S154-159 (2001).
- 3) Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S: Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, **46**, 1733-1742 (1997).
- 4) Kaneto H, Fujii J, Myint T, Miyazawa N, Islam KN, Kawasaki Y, Suzuki K, Nakamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Taniguchi N: Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic β -cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *The Biochemical Journal*, **320**, 855-863 (1996).
- 5) Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M, Araki E: Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic β -cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **300**, 216-222 (2003).
- 6) Kaneto H, Xu G, Song KH, Suzuma K, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC: Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic β -cell function through the induction of oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 31099-31104 (2001).
- 7) Matsuoka T, Kajimoto Y, Watada H, Kaneto H, Kishimoto M, Umayahara Y, Fujitani Y, Kamada T, Kawamori R, Yamasaki Y: Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *The Journal of Clinical Investigation*, **99**, 144-150 (1997).
- 8) Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, Shimohata H, Oishi H, Hamada M, Morito N, Hasegawa K, Kudo T, Engel JD, Yamamoto M, Takahashi S: MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 4969-4976 (2005).
- 9) Poitout V, Robertson RP: Glucolipotoxicity: fuel excess and β -cell dysfunction. *Endocrine Reviews*, **29**, 351-366 (2008).
- 10) Wang H, Kouri G, Wollheim CB: ER stress and SREBP-1 activation are implicated in β -cell glucolipotoxicity. *Journal of Cell Science*, **118**, 3905-3915 (2005).
- 11) Kaneto H, Fujii J, Seo HG, Suzuki K, Matsuoka T, Nakamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Kamada T, Taniguchi N: Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic β -cells. *Diabetes*, **44**, 733-738 (1995).
- 12) Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, Brownlee M: Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of

- hyperglycemic damage in endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, **112**, 1049-1057 (2003).
- 13) Koya D, King GL: Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, **47**, 859-866 (1998).
 - 14) Nakamura J, Kasuya Y, Hamada Y, Nakashima E, Naruse K, Yasuda Y, Kato K, Hotta N: Glucose-induced hyperproliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells through polyol pathway hyperactivity. *Diabetologia*, **44**, 480-487 (2001).
 - 15) Peter-Riesch B, Fathi M, Schlegel W, Wollheim CB: Glucose and carbachol generate 1,2-diacylglycerols by different mechanisms in pancreatic islets. *The Journal of Clinical Investigation*, **81**, 1154-1161 (1988).
 - 16) Wolf BA, Easom RA, McDaniel ML, Turk J: Diacylglycerol synthesis de novo from glucose by pancreatic islets isolated from rats and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, **85**, 482-490 (1990).
 - 17) Robertson RP: Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 42351-42354 (2004).
 - 18) Schmitz-Peiffer C, Laybutt DR, Burchfield JG, Gurisik E, Narasimhan S, Mitchell CJ, Pedersen DJ, Braun U, Cooney GJ, Leitges M, Biden TJ: Inhibition of PKC ϵ improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance. *Cell Metabolism*, **6**, 320-328 (2007).
 - 19) Delghingaro-Augusto V, Nolan CJ, Gupta D, Jetton TL, Latour MG, Peshavaria M, Madiraju SR, Joly E, Peyot ML, Prentki M, Leahy J: Islet beta cell failure in the 60% pancreatectomised obese hyperlipidaemic Zucker fatty rat: severe dysfunction with altered glycerolipid metabolism without steatosis or a falling beta cell mass. *Diabetologia*, **52**, 1122-1132 (2009).
 - 20) Sakane F, Imai S, Kai M, Yasuda S, Kanoh H: Diacylglycerol kinases: why so many of them? *Biochimica et Biophysica Acta*, **1771**, 793-806 (2007).
 - 21) Ishikawa T, Iwasaki E, Kanatani K, Sugino F, Kaneko Y, Obara K, Nakayama K: Involvement of novel protein kinase C isoforms in carbachol-stimulated insulin secretion from rat pancreatic islets. *Life Sciences*, **77**, 462-469 (2005).
 - 22) Sumara G, Formentini I, Collins S, Sumara I, Windak R, Bodenmiller B, Ramracheya R, Caille D, Jiang H, Platt KA, Meda P, Aebersold R, Rorsman P, Ricci R: Regulation of PKD by the MAPK p38 δ in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell*, **136**, 235-248 (2009).
 - 23) Kaneko YK, Ishikawa T: Diacylglycerol Signaling Pathway in Pancreatic β -Cells: An Essential Role of Diacylglycerol Kinase in the Regulation of Insulin Secretion. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **38**, 669-673 (2015).
 - 24) Chibalin AV, Leng Y, Vieira E, Krook A, Bjornholm M, Long YC, Kotova O, Zhong Z, Sakane F, Steiler T, Nylen C, Wang J, Laakso M, Topham MK, Gilbert M, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR: Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to

- hyperglycemia-induced insulin resistance. *Cell*, **132**, 375-386 (2008).
- 25) Miele C, Paturzo F, Teperino R, Sakane F, Fiory F, Oriente F, Ungaro P, Valentino R, Beguinot F, Formisano P: Glucose regulates diacylglycerol intracellular levels and protein kinase C activity by modulating diacylglycerol kinase subcellular localization. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 31835-31843 (2007).
 - 26) Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I: L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic β -cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes*, **55**, 1391-1397 (2006).
 - 27) Kawasaki F, Matsuda M, Kanda Y, Inoue H, Kaku K: Structural and functional analysis of pancreatic islets preserved by pioglitazone in db/db mice. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism*, **288**, E510-518 (2005).
 - 28) Sakane F, Imai S, Kai M, Yasuda S, Kanoh H: Diacylglycerol kinases as emerging potential drug targets for a variety of diseases. *Current Drug Targets*, **9**, 626-640 (2008).
 - 29) Alonso R, Mazzeo C, Merida I, Izquierdo M: A new role of diacylglycerol kinase α on the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes. *Biochimie*, **89**, 213-221 (2007).
 - 30) Adachi N, Oyasu M, Taniguchi T, Yamaguchi Y, Takenaka R, Shirai Y, Saito N: Immunocytochemical localization of a neuron-specific diacylglycerol kinase β and γ in the developing rat brain. *Brain research. Molecular Brain Research*, **139**, 288-299 (2005).
 - 31) Hozumi Y, Ito T, Nakano T, Nakagawa T, Aoyagi M, Kondo H, Goto K: Nuclear localization of diacylglycerol kinase ζ in neurons. *The European Journal of Neuroscience*, **18**, 1448-1457 (2003).
 - 32) Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G: Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes*, **51**, 2005-2011 (2002).
 - 33) Kraegen EW, Saha AK, Preston E, Wilks D, Hoy AJ, Cooney GJ, Ruderman NB: Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism*, **290**, E471-479 (2006).
 - 34) Rasilainen S, Nieminen JM, Levonen AL, Otonkoski T, Lapatto R: Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. *Biochemical Pharmacology*, **63**, 1297-1304 (2002).
 - 35) Sakane F, Imai S, Yamada K, Murakami T, Tsushima S, Kanoh H: Alternative splicing of the human diacylglycerol kinase δ gene generates two isoforms differing in their expression patterns and in regulatory functions. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 43519-43526 (2002).
 - 36) Martelli AM, Bortul R, Tabellini G, Bareggi R, Manzoli L, Narducci P, Cocco L: Diacylglycerol kinases in nuclear lipid-dependent signal transduction pathways. *Cellular and*

- Molecular Life Sciences : CMLS*, **59**, 1129-1137 (2002).
- 37) Goto K, Hozumi Y, Kondo H: Diacylglycerol, phosphatidic acid, and the converting enzyme, diacylglycerol kinase, in the nucleus. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1761**, 535-541 (2006).
 - 38) Baldanzi G, Mitola S, Cutrupi S, Filigheddu N, van Blitterswijk WJ, Sinigaglia F, Bussolino F, Graziani A: Activation of diacylglycerol kinase α is required for VEGF-induced angiogenic signaling in vitro. *Oncogene*, **23**, 4828-4838 (2004).
 - 39) Topham MK, Bunting M, Zimmerman GA, McIntyre TM, Blackshear PJ, Prescott SM: Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase- ζ . *Nature*, **394**, 697-700 (1998).
 - 40) Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T: Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory β -cell hyperplasia. *Diabetes*, **49**, 1880-1889 (2000).
 - 41) Takamoto I, Terauchi Y, Kubota N, Ohsugi M, Ueki K, Kadowaki T: Crucial role of insulin receptor substrate-2 in compensatory β -cell hyperplasia in response to high fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, **10 Suppl 4**, 147-156 (2008).
 - 42) Togashi Y, Shirakawa J, Orime K, Kaji M, Sakamoto E, Tajima K, Inoue H, Nakamura A, Tochino Y, Goshima Y, Shimomura I, Terauchi Y: β -Cell proliferation after a partial pancreatectomy is independent of IRS-2 in mice. *Endocrinology*, **155**, 1643-1652 (2014).
 - 43) Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, Barbacid M: Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia. *Nature Genetics*, **22**, 44-52 (1999).
 - 44) Fajas L, Annicotte JS, Miard S, Sarruf D, Watanabe M, Auwerx J: Impaired pancreatic growth, β cell mass, and β cell function in E2F1^{-/-} mice. *The Journal of Clinical Investigation*, **113**, 1288-1295 (2004).
 - 45) Kushner JA, Ciemerych MA, Sicinska E, Wartschow LM, Teta M, Long SY, Sicinski P, White MF: Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic β -cell growth. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 3752-3762 (2005).
 - 46) Iglesias A, Murga M, Laresgoiti U, Skoudy A, Bernales I, Fullaondo A, Moreno B, Lloreta J, Field SJ, Real FX, Zubiaga AM: Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 double-mutant mice. *The Journal of Clinical Investigation*, **113**, 1398-1407 (2004).
 - 47) Latres E, Malumbres M, Sotillo R, Martin J, Ortega S, Martin-Caballero J, Flores JM, Cordon-Cardo C, Barbacid M: Limited overlapping roles of P15^{INK4b} and P18^{INK4c} cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *The EMBO Journal*, **19**, 3496-3506 (2000).
 - 48) Pei XH, Bai F, Tsutsui T, Kiyokawa H, Xiong Y: Genetic evidence for functional dependency of p18^{INK4c} on Cdk4. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 6653-6664 (2004).
 - 49) Uchida T, Nakamura T, Hashimoto N, Matsuda T, Kotani K, Sakaue H, Kido Y, Hayashi Y,

- Nakayama KI, White MF, Kasuga M: Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice. *Nature Medicine*, **11**, 175-182 (2005).
- 50) Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, McNally SR, Swain GP, Montagna C, Hager JH, Hanahan D, Edlund H, Magnuson MA, Garrett-Beal L, Burns AL, Ried T, Chandrasekharappa SC, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS: Of mice and MEN1: Insulinomas in a conditional mouse knockout. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 6075-6085 (2003).
 - 51) Harvey M, Vogel H, Lee EY, Bradley A, Donehower LA: Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin. *Cancer Research*, **55**, 1146-1151 (1995).
 - 52) Heit JJ, Apelqvist AA, Gu X, Winslow MM, Neilson JR, Crabtree GR, Kim SK: Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic β -cell growth and function. *Nature*, **443**, 345-349 (2006).
 - 53) Williams BO, Remington L, Albert DM, Mukai S, Bronson RT, Jacks T: Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. *Nature Genetics*, **7**, 480-484 (1994).
 - 54) Porter LA, Donoghue DJ: Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Progress in Cell Cycle Research*, **5**, 335-347 (2003).
 - 55) Irvine RF: Nuclear lipid signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **4**, 349-360 (2003).
 - 56) Poli A, Ramazzotti G, Matteucci A, Manzoli L, Lonetti A, Suh PG, McCubrey JA, Cocco L: A novel DAG-dependent mechanism links PKC α and Cyclin B1 regulating cell cycle progression. *Oncotarget*, **5**, 11526-11540 (2014).
 - 57) Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA: Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, **429**, 41-46 (2004).
 - 58) Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA: Growth and regeneration of adult β cells does not involve specialized progenitors. *Developmental Cell*, **12**, 817-826 (2007).
 - 59) Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza RA, Butler PC: β -cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of β -cell mass in humans. *Diabetes*, **57**, 1584-1594 (2008).
 - 60) Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA: Very slow turnover of β -cells in aged adult mice. *Diabetes*, **54**, 2557-2567 (2005).
 - 61) Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL: Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology*, **130**, 1459-1466 (1992).
 - 62) Rieck S, White P, Schug J, Fox AJ, Smirnova O, Gao N, Gupta RK, Wang ZV, Scherer PE, Keller MP, Attie AD, Kaestner KH: The transcriptional response of the islet to pregnancy in mice. *Molecular Endocrinology*, **23**, 1702-1712 (2009).
 - 63) Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH: β -cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in

- adipocyte- β -cell relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 10878-10882 (1994).
- 64) Lee Y, Hirose H, Zhou YT, Esser V, McGarry JD, Unger RH: Increased lipogenic capacity of the islets of obese rats: a role in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes*, **46**, 408-413 (1997).
- 65) Kelpel CL, Johnson LM, Poitout V: Increasing triglyceride synthesis inhibits glucose-induced insulin secretion in isolated rat islets of langerhans: a study using adenoviral expression of diacylglycerol acyltransferase. *Endocrinology*, **143**, 3326-3332 (2002).
- 66) Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, Schaffer JE: Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 3077-3082 (2003).
- 67) Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, Eizirik DL: Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*, **54 Suppl 2**, S97-107 (2005).
- 68) Donath MY, Storling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T: Inflammatory mediators and islet β -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *Journal of Molecular Medicine*, **81**, 455-470 (2003).
- 69) Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J, Miyazaki J: Pancreatic β cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *The Journal of Experimental Medicine*, **188**, 1445-1451 (1998).
- 70) Wang X, Li H, De Leo D, Guo W, Koshkin V, Fantus IG, Giacca A, Chan CB, Der S, Wheeler MB: Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic β -cell line MIN6. *Diabetes*, **53**, 129-140 (2004).
- 71) Sakurai K, Katoh M, Someno K, Fujimoto Y: Apoptosis and mitochondrial damage in INS-1 cells treated with alloxan. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **24**, 876-882 (2001).
- 72) Choi SE, Min SH, Shin HC, Kim HE, Jung MW, Kang Y: Involvement of calcium-mediated apoptotic signals in H₂O₂-induced MIN6N8a cell death. *European Journal of Pharmacology*, **547**, 1-9 (2006).
- 73) Benhamou PY, Moriscot C, Richard MJ, Beatrix O, Badet L, Pattou F, Kerr-Conte J, Chroboczek J, Lemarchand P, Halimi S: Adenovirus-mediated catalase gene transfer reduces oxidant stress in human, porcine and rat pancreatic islets. *Diabetologia*, **41**, 1093-1100 (1998).
- 74) Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes*, **52**, 1-8 (2003).
- 75) Takada M, Noguchi A, Sayama Y, Kurohane Kaneko Y, Ishikawa T: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated initial Ca²⁺ mobilization constitutes a triggering signal for hydrogen peroxide-induced apoptosis in INS-1 β -cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **34**, 954-958 (2011).
- 76) Brown GC, Borutaite V: Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome *c*.

- Biochimica et Biophysica Acta*, **1777**, 877-881 (2008).
- 77) Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P: Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, **4**, 552-565 (2003).
- 78) van Vliet AR, Verfaillie T, Agostinis P: New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1843**, 2253-2262 (2014).
- 79) Csordas G, Varnai P, Golenar T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, Balla T, Hajnoczky G: Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Molecular Cell*, **39**, 121-132 (2010).
- 80) Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C: Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, **13**, 566-578 (2012).
- 81) Marchi S, Pinton P: The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *The Journal of Physiology*, **592**, 829-839 (2014).
- 82) Alam MR, Groschner LN, Parichatikanond W, Kuo L, Bondarenko AI, Rost R, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF: Mitochondrial Ca²⁺ uptake 1 (MICU1) and mitochondrial Ca²⁺ uniporter (MCU) contribute to metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic β -cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 34445-34454 (2012).
- 83) Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE: The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, **427**, 360-364 (2004).
- 84) Hajnoczky G, Csordas G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Sinha Roy S, Yi M: Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, **40**, 553-560 (2006).
- 85) Verma G, Bhatia H, Datta M: JNK1/2 regulates ER-mitochondrial Ca²⁺ cross-talk during IL-1 β -mediated cell death in RINm5F and human primary β -cells. *Molecular Biology of the Cell*, **24**, 2058-2071 (2013).
- 86) Tao L, Harris AL: 2-aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits channels composed of connexin26 and/or connexin32. *Molecular Pharmacology*, **71**, 570-579 (2007).
- 87) Klee P, Allagnat F, Pontes H, Cederroth M, Charollais A, Caille D, Britan A, Haefliger JA, Meda P: Connexins protect mouse pancreatic β cells against apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation*, **121**, 4870-4879 (2011).