

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09388

研究課題名(和文) 障害膵 細胞の機能回復・機能的膵 細胞作製へ向けた試み

研究課題名(英文) Functional recovery of daibetic beta cells and the attempt for generating functional beta cells

研究代表者

松岡 孝昭 (Matsuoka, Takaaki)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10379258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンを分泌する膵 細胞の機能が低下すると高血糖が生じるが、高血糖の存在自体がさらなる膵 細胞機能障害を引き起こし、糖尿病へと至る。我々は、高血糖が膵 細胞機能を障害する機序を研究しており、高血糖に対して脆弱な因子を新規に同定した。同因子を欠失させたマウスモデルを用いて、同因子が膵 細胞からのインスリン分泌に重要な役割を果たすことを示している。

また、胎仔期に膵 細胞の作られる過程において重要な因子のうち3因子を選び、これらを任意の時期・細胞に発現可能なマウスを作製した。膵臓内の非 細胞に3因子を発現すると、膵全体にインスリン陽性細胞が観察され、高血糖応答性インスリン分泌も認められた。

研究成果の概要(英文)：The dysfunction of pancreatic beta cells results in hyperglycemia, which causes further dysfunction of beta cells. And, that leads progressed diabetes. Our purpose in this study is to clarify how hyperglycemia impairs beta cells. We newly identified the beta-cell factor, which is fragile to chronic high glucose, and indicated that that is critical for insulin secretion using the knock-out mouse model.

Another objectives is to find candidate cells to be capable of transdifferentiation to pancreatic beta cells in vivo. First of all, we generated transgenic mice to conditionally express transcription factors which are critical for beta-cell differentiation. Using those, we found pancreatic non-beta cells are the candidate for the transdifferentiation into beta cells.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 高血糖毒性 膵 細胞障害 膵 細胞再生

1. 研究開始当初の背景

A) 糖毒性解除による膵細胞機能改善メカニズムの解析

2 型糖尿病患者において、膵細胞機能障害の存在が高血糖を助長し、高血糖が膵細胞機能をさらに増悪させるといった悪循環が繰り返されることは糖毒性として臨床によく経験されている。この膵細胞機能障害の背景に、インスリン転写因子 MafA の発現低下が関与していることを我々は見出してきた (Matsuoka et. al. *Diabetes* 59(7):1709-1720, 2010)。即ち、ヒト、マウスともに、膵切片を用いた免疫組織染色上、インスリン分泌能の低下した状態では明らかな MafA 発現の低下が認められ、2 型糖尿病マウスにおいて MafA 発現を正常レベルにまで外因性に発現させると、インスリン合成、グルコース応答性インスリン分泌の有意な改善が認められる。これは、膵細胞細胞株での MafA ノックアウトにおいて認められた膵細胞機能障害と一致する結果であり、糖尿病状態においても MafA が重要な因子であることを示した結果といえる。一方、糖毒性の解除により MafA 発現がどのように変化するかを検討すべく、これまでに肥満 2 型糖尿病マウスへのインスリン注射や TZD 投与による血糖正常化を試みている。この結果、MafA 発現が正常レベルに保たれ、膵細胞機能も正常に近いレベルに保持され得ることを報告している (Kawashima, Matsuoka et.al. *BBRC*, 2011)。しかしながら、これら実験モデルでは脂質の著明な改善も認められ、脂肪毒性の解除が作用している可能性、また、インスリンや TZD による膵細胞内受容体へ直接作用も膵細胞機能の改善効果をもたらしている可能性なども考えられる。実際に糖尿病状態において血糖のみを選択的に改善 (糖毒性解除) させた上で膵細胞因子を網羅的に解析した報告はなく、膵細胞においてどのような因子が糖毒性解除後の膵細胞機能改善に寄与するのかは、臨床的にも興味を持たれるところである。そこで我々は、肥満 2 型糖尿病モデルである db/db マウスへ SGLT2 阻害剤を短期投与することにより、これまでに糖毒性を選択的に解除し得る条件を見出している。

B) 非膵細胞の正常細胞化へ向けた試み

インスリン分泌の枯渇した糖尿病患者に対する根治療法の一つとして、膵細胞の補充療法が挙げられる。これまでに我々は将来の分子生物学的手法による膵細胞の作製に適した標的細胞を探求すべく、膵細胞に発現特異性が極めて高く、強力なインスリン遺伝

子転写活性作用を有する転写因子 MafA (Matsuoka et.al. *Mol Cell Biol*, 2003, Matsuoka et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2004) を、他の膵細胞分化に關与する転写因子、Pdx1、Beta2、Neurogenin3 などと共にトランスジェニックマウスを用いて膵内非膵細胞へ異所性に発現させている。この結果、非膵細胞をインスリン陽性細胞化することには成功している。この系を用いると、*in vitro* での細胞株を用いた系と比べ、高率にインスリン陽性細胞の誘導が可能であり、免疫組織染色での結果ではあるが、インスリン発現量も膵細胞に匹敵するほど豊富に誘導される。これら結果から、膵細胞の作製には *in vivo* 環境 (様々な可溶性因子や周辺細胞との相互作用) の重要性、および標的細胞選択の重要性が改めて認識されたが、このような条件下での、膵細胞への分化転換への限界を知る必要があると考えている。これまでに、MafA、Pdx1、Beta2、Neurogenin3 を組み合わせ、膵管、膵外分泌、膵島内非膵細胞へ異所性に発現させることにより、インスリン陽性細胞を作製することに成功している。

2. 研究の目的

インスリン合成・分泌などの膵細胞機能において重要な働きをする転写因子 MafA は、糖尿病状態において著明に低下しており、膵細胞機能障害の一因と考えられる。糖尿病マウスを用いた *in vivo* での検討において、短期間の糖毒性解除では、多くの膵細胞因子に発現変化が認められない一方、MafA 発現の顕著な改善が認められ、糖毒性解除による膵細胞機能改善の一因と考えられる。本申請において、このような短期間の糖毒性解除により有意に改善する因子を網羅的に解析することにより、糖尿病状態における血糖値改善が膵細胞機能改善へと至る分子メカニズムの一端を解明することを目的の一つとしている。また、トランスジェニックマウスを用いて MafA を含む、膵細胞の発生・分化に必須の転写因子を膵内非膵細胞へ発現誘導することにより、インスリン陽性細胞化することは既に確認しているが、いずれの細胞が *in vivo* において膵細胞へと分化転換し得るのかがいまだ明らかではない。誘導したインスリン陽性細胞においてグルコース応答性インスリン分泌を含む膵細胞化の程度を検討することをもう一つの目的とする。

3. 研究の方法

A) 2 型糖尿病モデル (db/db) マウスへの SGLT2 阻害剤投与により血糖値を選択的に改善させ、糖毒性解除が膵β細胞内遺伝子発現に与える影響を検討した結果、単離膵島 RNA

を用いた TaqMan PCR array 上、糖毒性に感受性が高いと思われる少数の因子の発現が改善し、インスリン発現の増大も認められた。さらに、この背景にある因子の発現変化に迫るべく、DNA microarray を実施し、糖毒性に感受性の高い遺伝子を抽出する。

B) 膵 細胞関連転写因子を異所性に発現することにより各組織へ誘導し得たインスリン陽性細胞が膵 β 細胞へと分化する程度を評価するため、マウス膵 細胞を ablation した後、糖負荷試験を行い、グルコース応答性インスリン分泌の有無を検討する。さらに、誘導インスリン陽性細胞における膵 細胞特異的因子の発現率を比較し、膵 細胞化を評価する。

4. 研究成果

A) 糖毒性解除による膵 細胞機能改善メカニズムの解析

糖毒性に感受性があり、膵 細胞機能に關与する未知の因子を網羅的に解析すべく、db/db マウスへ 1 週間 SGLT2 阻害剤を投与した後、膵島 RNA を抽出し、無治療 db/db 群膵島 RNA との間で DNA microarray 解析による膵島内遺伝子発現量の比較を行った(各群 n=4)。得られた 3,4000 有効 probe の中で、SGLT2 阻害剤投与による血糖改善により膵島内で有意に発現量が増大したのは 42 遺伝子であり、膵 細胞機能に關与することがアジア人の 2 つの独立した GWAS 解析において報告されている TMEM163 に注目し解析している。同因子は膵 細胞に特異的に発現しており、膵 細胞株において同因子のノックアウト解析を行ったところ、グルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) の有意な低下を認めた。また、in vivo での解析のため同因子の flox ノックアウトマウスを作製中であるが、先に得ら確立できた全身のノックアウトマウスに対し高脂肪高シヨ糖食負荷を行ったところ、膵ノックアウトでは膵ノックアウトに比べ耐糖能の悪化を認め、GSIS の低下も認められた。TMEM163 欠損による膵 細胞障害のメカニズムに関しては、他組織において TMEM163 が亜鉛の膜内輸送に關与するとの報告があり、また、インスリン顆粒の形成に亜鉛が必須であることから、同因子と亜鉛との関連を検討した。膵ノックアウトでは、膵 細胞における亜鉛含量が低下しており、現時点では、同因子が亜鉛輸送を介してインスリン分泌顆粒の成熟化に必要な因子であると考えている。

これら結果から、TMEM163 は高血糖毒性による膵 細胞障害のメカニズムを説明し得る因子の一つであることが推察される。

B) 非 細胞の正常 細胞化へ向けた試み
Sox9-CreER を用いて Mafa, Pdx1, Ngn3 の 3 因子を膵導管細胞へ発現誘導した場合と、Elastase-CreER を用いて膵腺房細胞へこれら 3 因子を発現誘導した場合、いずれの場合にも膵外分泌領域に多数のインスリン陽性細胞が確認された。発現母細胞の違いによる差異を比較検討したところ、導管細胞由来 3 因子発現細胞の方がインスリン陽性化効率が高く、内因性膵 細胞を ablation した系での膵内インスリン含量やインスリン陽性細胞数で補正した GSIS も高値であった。さらに、これら 3 因子により新生したインスリン陽性細胞における Glut2 や Nkx6.1 等の膵 細胞因子の発現率を比較すると、導管細胞由来インスリン陽性細胞において有意に高かった。

これら結果から、非 細胞から膵 細胞への分化転換を目指す場合、その標的細胞の選択も重要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Matsuoka TA, Kaneto H, Kawashima S, Miyatsuka T, Tochino Y, Yoshikawa A, Imagawa A, Miyazaki JI, Gannon M, Stein R, Shimomura I. Preserving Mafa expression in diabetic islet β -cells improves glycemic control in vivo. *J. Biol. Chem.* 290(12):7647-57, 2015.

Sasaki S, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Takahara M, Yamamoto Y, Yasuda T, Kaneto H, Fujitani Y, German MS, Akiyama H, Watada H, Shimomura I. Activation of GLP-1 and gastrin signalling induces in vivo reprogramming of pancreatic exocrine cells into beta cells in mice. *Diabetologia.* 58(11):2582-91. 2015

Shimo N, Matsuoka TA, Miyatsuka T, Takebe S, Tochino Y, Takahara M, Kaneto H, Shimomura I. Short-term selective alleviation of glucotoxicity and lipotoxicity ameliorates the suppressed expression of key β -cell factors under diabetic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 467:948-954. 2015

Matsuoka TA, Kawashima S, Miyatsuka T, Sasaki S, Shimo N, Katakami N, Kawamori D, Takebe S, Herrera PL, Kaneto H, Stein R, Shimomura I. Mafa enables Pdx1 to effectively convert pancreatic islet progenitors and committed islet α -cells into β -cells in vivo. *Diabetes* 66:1293-1300, 2017

Katsura T, Kawamori D, Aida E, Matsuoka TA, and Shimomura I. Glucotoxicity induces abnormal glucagon secretion through impaired

insulin signaling in InR1G cells. *PLoS One*. 12(4):e0176271, 2017

〔学会発表〕(計 19 件)

松岡孝昭

膵 細胞機能におけるインスリン転写因子群の重要性 第51回高血圧関連疾患研究学会ランチョンセミナー 2015

松岡孝昭

膵 細胞機能の分子メカニズムからみた糖尿病治療 第52回日本糖尿病学会近畿地方会ランチョンセミナー 2015

松岡孝昭

膵 細胞機能保護を目指した糖尿病治療 第59回日本糖尿病学会総会 ランチョンセミナー 2016

松岡孝昭

膵 細胞機能保護を目指した糖尿病治療 第54回日本糖尿病学会中国四国地方会 ランチョンセミナー 2016

松岡孝昭

糖尿病合併症としての膵 細胞障害への対処 第53回日本糖尿病学会近畿地方会 シンポジウム 2016

下 直樹、高原充佳、片上直人、**松岡孝昭**、日本人2型糖尿病における各種インスリン感受性指標の有用性の検討 第60回日本糖尿病学会学術集会 2017

松岡孝昭

2型糖尿病：インスリン分泌 第54回日本糖尿病学会近畿地方会 シンポジウム 2017

松岡孝昭

血糖値スパイクの本質を知る 第16回日本栄養改善学会近畿支部学術総会 市民公開講座 2017

下 直樹、**松岡孝昭**、河盛 段、宮塚 健、小山佳久、島田昌一、下村伊一郎

膵 細胞糖毒性感受性遺伝子の新規同定と解析 第29回分子糖尿病学シンポジウム 2017

松岡孝昭

肥満2型糖尿病マウスを用いた膵 細胞障害メカニズムの解析 第32回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 スポンサーシンポジウム 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松岡孝昭 (MATSUOKA TAKAAKI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：10379258

(2)研究分担者

片上直人 (KATAKAMI NAOTO)
大阪大学・医学系研究科・寄付講座講師
研究者番号：10403049

(3)研究分担者

河盛段 (KAWAMORI DAN)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50622362