

令和元年6月5日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09752

研究課題名(和文) 膵細胞脱分化・運命転換の成因解明に基づいた糖尿病治療の研究

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanisms underlying beta cell dedifferentiation and plasticity in diabetes

研究代表者

田部 勝也 (TANABE, Katsuya)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00397994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病における膵細胞機能不全の病態は多くの点で不明であり進展阻止の治療法も確立されていない。本研究では、ストレス病態モデルWfs1欠損マウスを用いて膵細胞脱分化機構の解明を目的とした。Wfs1欠損細胞は、正常血糖時より脱分化しグルコース異化障害に基づくATP産生障害を呈した。ストレス応答分子Txnipの発現亢進に着目したところ、Wfs1；Txnip二重欠損マウスではエネルギー代謝の改善とともに細胞脱分化が抑制された。以上の結果より、Wolfram症候群では細胞脱分化が中心病態となり糖尿病を発症し、その誘導にはTxnipを介したエネルギー代謝制御との関連性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wfs1欠損マウスは細胞脱分化を明瞭に示し、細胞以外の因子、例えば高血糖の関与を排除できるため、このマウスで示される脱分化の分子病態が、他のマウスモデルやヒトでの脱分化と膵細胞機能不全の病態解明を促進するとともに膵細胞の生物学への理解を一層深める。WFS1遺伝子はWolfram症候群の原因遺伝子であるが、2型糖尿病遺伝子としても認知されており、両疾患での細胞不全の成因について共通する部分も多い。そのため、本研究はWolfram症候群のみならず2型糖尿病の細胞の病態理解や進展阻止に向けた治療法開発への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Insulin deficiency is thought to be caused by both pancreatic cell dysfunction and decreased cell mass. cell loss is associated with augmented ER and oxidative stresses in Wolfram syndrome. In the Wfs1 deficient mice, cells become dedifferentiated and revert to endocrine progenitor-like cells. This appears after nursing, independently of hyperglycemia, and becomes more apparent along with diabetes progression. Wfs1 deficient islets demonstrated decreased ATP production due to impaired glucose catabolism. This was corrected by genetic inhibition of Txnip. Importantly, ablation of Txnip prevented cell dedifferentiation and maintained glucose homeostasis associated with preserved beta cell mass in the Wfs1 deficient mice. Thus, these findings provide new insights into molecular mechanisms underlying cell loss in diabetes related to cellular stresses, such as Wolfram syndrome.

研究分野：内科学、内分泌代謝学

キーワード：糖尿病 膵細胞 小胞体ストレス 脱分化 Wolfram症候群 インスリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の進展には、進行性の膵β細胞の機能低下と細胞量減少が重要な役割を演じる。近年、膵島内の細胞可塑性が明らかにされ、糖尿病病態との関わりに注目が集まっているが病態における意義や制御機構は不明である。インスリン依存性糖尿病を主徴とする遺伝性疾患 Wolfram 症候群の疾患モデル *Wfs1* 欠損マウスでは、膵β細胞が進行性に減少し高血糖を来す。分子病態として原因遺伝子 *WFS1* の機能障害により引き起こされる小胞体ストレスおよび酸化ストレス亢進が想定されており、このことが *Wfs1* 欠損による膵β細胞障害の本質的な原因と考えられる。当初、*Wfs1* 欠損による膵β細胞減少の原因として小胞体機能異常によるアポトーシス亢進が想定されたが、実際には *Wfs1* 欠損膵島で認められるβ細胞のアポトーシス増加は極低度であった。一方、β細胞量が著しく減少する過齢において、膵島ホルモン陰性ながらもクロモグラニンA陽性を示す膵島細胞量が維持されていることから、細胞量減少に関わる要因としてβ細胞の細胞可塑性の関与が示唆された。しかし、*Wfs1* 欠損マウスにおいて膵β細胞の変容過程および可塑性の制御メカニズムは不明であり、このマウスで観察される膵β細胞機能不全の病態の本質も依然として不明である。

2. 研究の目的

小胞体ストレス病態モデル *Wfs1* 遺伝子欠損マウスにおいて、膵β細胞脱分化および分化転換が膵β細胞不全の要因であることを示し、β細胞不全におけるβ細胞脱分化の意義を明らかにする。さらに、細胞内ストレスによるβ細胞可塑性制御機構を解明し、脱分化を標的とした膵β細胞不全に対する新規治療戦略の分子基盤を創出する。

3. 研究の方法

(1) *Wfs1* 欠損マウスにおける膵β細胞の細胞可塑性の解明

Wfs1 欠損マウスで認められるβ細胞消失の過程を明らかにするため、YFPで永久標識したβ細胞の運命追跡 (Lineage tracing) を行った。*Wfs1* 欠損マウスと *Rosa26 lox-stop-lox YFP* マウスおよび *RIP-Cre* マウスを交配し、*Wfs1^{-/-}; Rosa26-YFP; RIP-Cre* を作出した。マウス離乳前 (3週齢)、高血糖発症前 (20週齢)、高血糖発症後 (40週齢) に採取した膵組織切片を用いて、抗YFP抗、抗インスリン抗体、膵内分泌細胞分化マーカーに対する抗体を用いて免疫組織染色を行いβ細胞がその性質を失っていく過程を組織学的に解析した。

(2) 膵β細胞量減少における高血糖の意義の解明

Wfs1 欠損マウスにおけるβ細胞の変容は正常血糖時より認められるが、高血糖に伴いより顕著となることから、病態形成に対する高血糖の寄与が推察された。そこで、*Agouti* 変異 (*A^{y/a}*) の導入により *Wfs1* 欠損マウスより早期に高血糖を呈する *Wfs1^{-/-}; A^{y/a}* マウスにおいて、SGLT2 阻害剤イプラグリフロジン投与し高血糖を是正した。その際のマウス膵組織切片を用いて高血糖がβ細胞変容に及ぼす影響を評価した。

(3) ストレス病態における細胞内エネルギー代謝と細胞可塑性に及ぼす影響の解明

Wfs1 欠損膵島では有意に血糖値が上昇する以前より小胞体ストレスおよび酸化ストレスが亢進する。インスリンを産生・分泌するβ細胞は通常よりATP需要が高いが、*Wfs1* 欠損β細胞ではストレス応答に伴い一層のATP消費亢進が想定される。そこで、*Wfs1* 欠損β細胞における細胞内エネルギー代謝変化について、正常血糖時期 10-12週齢 *Wfs1* 欠損マウスより単離した膵島を用いて mRNA・タンパク質発現量解析およびメタボローム解析、グルコース負荷時の酸素消費速度を測定し、細胞内エネルギー代謝活性を評価した。*Wfs1* 欠損膵島では、ストレス応答分子 Thioredoxin-interacting protein (*Txnip*) の発現が顕著に亢進する。*Wfs1; Txnip* 二重欠損マウスおよび *Wfs1^{-/-}; Txnip^{-/-}; Rosa26-YFP; RIP-Cre* マウスを作出し、*Txnip* 欠損による細胞

内エネルギー代謝および β 細胞可塑性への影響について、マウス単離膵島を用いた前述(1)と同様の評価および、マウス膵組織切片を用いて組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) *Wfs1*^{-/-}マウスは週齢とともに β 細胞が徐々に減少し、30 週齢頃より高血糖を呈する。個体差はあるものの 36 週齢以降では多くの個体で随時血糖値が 500 mg/dl 以上に上昇し、膵 β 細胞量が顕著な減少と α 細胞増加を来す。一方、20 週齢では β 細胞のアポトーシス増加を認めなかった。正常血糖値を示す 12 週齢 *Wfs1*^{-/-}マウスでは、インスリン顆粒が著しく減少した β 細胞が増加し、インスリン/グルカゴン二重陽性細胞が出現した。この時、 β 細胞では成熟 β 細胞分化能維持に重要な MafA の著明な発現低下とともに膵内分泌前駆細胞特異的遺伝子 Neurogenin3(Ngn3)が出現し、これらは離乳前には観察されなかった。運命追跡では、インスリン顆粒が減少あるいは消失した YFP 陽性 β 細胞が増加しその一部ではグルカゴンが陽性化した。これらの所見は週齢および病態進展とともに顕性化した。以上の観察結果より *Wfs1*^{-/-}マウスでは高血糖に先行し β 細胞が膵内分泌前駆様細胞に脱分化しており、その一部では α 細胞に分化転換すると考えられた。

(2) Agouti 変異(*A^v/a*)の導入により過食・肥満をきたす *Wfs1*^{-/-};*A^v/a* マウスでは β 細胞減少が *Wfs1*^{-/-}マウスに比し若齢より観察され、高血糖の進展と相関した。このマウスにおいて β 細胞非依存的(SGLT2 阻害剤)に高血糖を是正したところ、インスリン陽性細胞量の回復とともにグルカゴン陽性細胞量の増加が抑制された。しかし、組織レベルでは MafA 減少及び Ngn3 出現は改善されずグルコース応答性インスリン分泌も回復されなかった。すなわち、このマウスでは β 細胞脱分化は本質的に高血糖より独立しており、*Wfs1* 欠損がより直接的な原因であると推察された。

(3) *Wfs1*^{-/-}膵島では小胞体及び酸化ストレス関連分子の遺伝子発現が亢進しており細胞内ストレスの増強が想定される。一方、 β 細胞の代謝特性に着目し 10-12 週齢 *Wfs1*^{-/-}膵島を用いてメタボローム解析を行ったところ解糖系中間代謝物及びピルビン酸の増加を認めた。しかし、アセチル CoA 及びクエン酸は低下しており結果的に ATP 含量が低下した。エネルギー代謝障害の原因について Pyruvate dehydrogenase(PDH)に着目し、リン酸化(pPDH)増加による活性低下を見出した。さらに、*Wfs1*^{-/-}膵島において顕著な発現増強を示すストレス応答分子 Thioredoxin-interacting protein (Txnip)が、PDH 及び PDH kinase1 への結合を介して PDH のリン酸化を促進することを突き止めた。*Wfs1*;*Txnip* 二重欠損マウスでは、膵島での pPDH が *Wfs1*^{-/-}マウスに比し著しく低下しており、グルコース応答性インスリン分泌が回復した。一方、*Wfs1*^{-/-}膵島ではグルコース応答性 ATP 産生、解糖速度および酸素消費速度が著しく低下しており、これらが *Txnip* 欠損により有意に回復した。重要なことに、*Wfs1*^{-/-}膵島では脱共役による最大酸素消費速度が維持されており *Txnip* 欠損による影響も受けなかった。すなわち、*Wfs1*^{-/-}膵島において PDH 活性低下が代謝機能障害の要因であることが推察された。組織学的には、*Txnip* 欠損により脱分化の抑制とともに β 細胞量が維持され、50 週齢までの観察において *Wfs1*;*Txnip* 二重欠損マウス全観察個体で糖尿病の発症が抑制された。

以上の研究成果より、 β 細胞脱分化が主因となり糖尿病を発症する疾患モデルを初めて明確に示すとともに、細胞内ストレスによる脱分化誘導機構の解明に基づき新規治療標的を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Kondo M, Tanabe K, Amo-Shiinoki K, Hatanaka M, Morii T, Takahashi H, Seino S, Yamada Y, Tanizawa Y, Activation of GLP-1 receptor signaling alleviates cellular stresses and improve beta

cell function in a mouse model of Wolfram syndrome、 *Diabetologia* 61(10); 2189-2201、 2018
(査読有) doi:10.1007/s00125-018-4679-y

2. 田部勝也、膵β細胞脱分化と糖尿病、糖尿病、61巻2号;39-41、2018 (査読無)
doi: 10.11213/tonyoby.61.39

3. Tanabe K, Amo-Shiinoki K, Hatanaka M, Tanizawa Y. Interorgan crosstalk contributing to β-cell dysfunction. *J Diabetes Res.* 3605178、 8 pages、 2017 (査読有)
doi: 10.1155/2017/3605178

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 田部勝也、Pancreatic β cell plasticity as a mechanism of diabetic beta cell failure caused by *Wfs1* deficiency 第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会、2019 年
2. 椎木幾久子、Metabolic insufficiency caused by cellular stresses is implicated to β cell dedifferentiation in the mouse model of Wolfram Syndrome、第 54 回欧州糖尿病学会、2018 年
3. 田部勝也、Metabolic insufficiency caused by cellular stresses is implicated to β cell dedifferentiation in the mouse model of Wolfram Syndrome、第 78 回米国糖尿病学会、2018 年
4. 椎木幾久子、Wolfram 症候群をモデルとした細胞内ストレスによる膵β細胞可塑性制御の解明、第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、2018 年
5. 田部勝也、Wolfram 症候群をモデルとしたストレス病態における膵β細胞可塑性制御の解明 第 91 回日本内分泌学会学術総会、2018
6. 田部勝也、Wolfram 症候群の臨床像と糖尿病、第 27 回臨床内分泌代謝 Update、2017 年
7. 田部勝也、Wolfram 症候群においてβ細胞脱分化は糖尿病の成因として重要である、第 32 回日本糖尿病合併症学会、2017 年
8. 椎木幾久子、Genetic deficiency of *Txnip* prevents diabetes progression in the mouse model of Wolfram syndrome、第 77 回米国糖尿病学会、2017 年
9. 椎木幾久子、ヒトの糖尿病においてβ細胞脱分化はβ細胞不全に関連する、第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017 年
10. 椎木幾久子、β cell dedifferentiation plays a central role in β cell failure in a model of Wolfram syndrome、第 76 回米国糖尿病学会、2016 年
11. 田部勝也、β cell dedifferentiation plays a central role in β cell failure in a model of Wolfram syndrome、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年

〔図書〕(計 4 件)

1. 椎木幾久子、田部勝也、科学評論社、内分泌・代謝・糖尿病、2017 年、178 (170-175)
2. 椎木幾久子、田部勝也、医学出版、月刊糖尿病、2017 年、150(36-44)
3. 田部勝也、医学出版、月刊糖尿病、2017 年、109(45-53)
4. 田部勝也、谷澤幸生、メディカルレビュー社、*Diabetes Frontier*、2016 年、132(18-21)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：谷澤 幸生

ローマ字氏名：TANIZAWA, Yukio

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：00217142

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。