

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09455

研究課題名(和文)モノアミン-GPCR シグナルに制御される膵 細胞分化・成熟化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of monoamine-GPCR signal-regulated pancreatic beta cell differentiation and maturation mechanism

研究代表者

坂野 大介 (Sakano, Daisuke)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：40571039

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)：ヒトiPS細胞から分化誘導した 様細胞への分化効率の上昇と成熟度の向上にドーパミンの合成阻害剤やドーパミンを貯留するためのトランスポーター(VMAT2)の阻害剤の培地中への添加が効果的である。脱分化の進行を抑制することが主たる効果であった。

様細胞の分化、成熟化の過程でみられる弱いインスリン分泌は細胞の成熟化を促進する遺伝子の発現上昇とともに、同時進行する脱分化を促進することを明らかにした。また、VMAT2を膵 細胞でのみ欠失するマウスの解析実験により生体内では生後も成熟化・脱分化を 細胞毎に違うバランスにおくことで一部の 細胞だけが膵臓内で機能することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞が主たる構成要素である膵島は内部の 細胞が均一な分化・成熟化レベルではない。高い成熟度を維持し続けることは、 細胞の脱分化・細胞死につながることを本研究におけるマウス個体を用いた実験で実証した。今後、再生医療にヒトiPS細胞由来 様細胞を使用するうえで、より長期的かつ生体内に近い血糖値維持を達成するためには、生体内における膵島内の細胞間相互作用を理解、再現することが必要不可欠である。モノアミンを介した細胞間相互作用機構の一部を解明することができたことは、再生医療の実現化に貢献できたと考える。

研究成果の概要(英文)：Addition of a dopamine synthesis inhibitor or a monoamine transporter (VMAT2) inhibitor to the medium improves the differentiation efficiency and maturity of human iPS cell-derived -like cells. The main cause of this was suppression of dedifferentiation. Weak insulin secretion observed during the process of -like cell differentiation and maturation suppressed an increase in the expression of genes that promote cell maturation. Furthermore, this insulin secretion promoted dedifferentiation. In addition, the proportion of cells having dopamine synthetic ability was different for each pancreatic islet. Dopamine, which is released extracellularly during insulin secretion, may be involved in heterogeneous maintenance of -cell differentiation levels within the islets.

研究分野：細胞生物学

キーワード：膵臓 インスリン ドーパミン GPCR iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ES・iPS細胞を用いた膵β細胞の分化誘導研究の現状

膵臓は発生過程において内胚葉から形成される臓器である。現在では分化研究によりヒトの多能性幹細胞からの胚性内胚葉や内分泌前駆細胞への分化手法の効率化が進み正常発生の主な分化経路をある程度模倣できるようになった。そして、我々の研究グループを含めいくつもの報告において分化の効率化が可能となった (Shahjalal et al., *J. Mol. Cell Biol.*, 2014; Pagliuca et al., 2014; Rezanian et al., 2014)。しかし、生体内のβ細胞とは依然として差がみられ、インスリン分泌様式に更なる改善が必要である (図1)。したがって、β細胞になる最終段階の分化・成熟化過程が生体を模倣しておらず、このメカニズムを理解・模倣し、正常なβ細胞を作る必要がある。

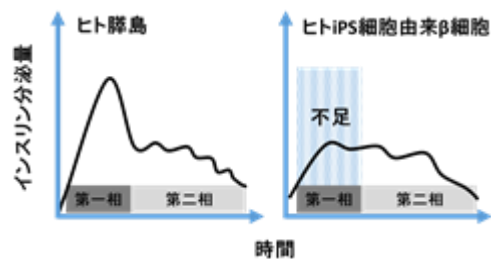


図1 ヒト膵島とヒトiPS細胞由来β細胞のインスリン分泌における違い

(2) これまでの研究

① 化合物スクリーニングを行いES細胞から膵β細胞への分化を効率化した

我々は過去の研究においてマウスES細胞を安定的にインスリン産生細胞(β細胞)に分化させる系を構築した。これにより低分子化合物を大量にスクリーニングすることが可能となり、Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2)の阻害剤が膵前駆細胞から内分泌前駆細胞への分化を促進することを見出した。VMAT2は細胞質内のモノアミン(ドーパミン、セロトニン、アドレナリンなど)を細胞内小胞へ取り込む膜輸送体であることから、モノアミン量の変化が細胞分化の調節因子であることを示した (Sakano et al., *Nat. Chem. Biol.* 2014)。

② 膵島の分化・脱分化を調節する化合物を探索し、GPCRの会合状態が重要である

マウス膵島細胞の分散培養法を構築し化合物をスクリーニングした。初代培養細胞を長期培養すると脱分化が進みグルコース応答性のインスリン分泌能を有する指標となる成熟化マーカー遺伝子の発現が低下するが、ドーパミンD2受容体(Drd2)のアンタゴニストがそれを抑制することを発見した。この効果は、Drd2とアデノシンA2a受容体がヘテロ複合体を形成することでアデノシンA2a受容体の機能を促進した結果であることを示した (Sakano et al., *Stem Cell Reports*, 2015)。現在、さらに複数の化合物ライブラリーを用い、新たにいくつかの標的GPCR候補を同定した。

2. 研究の目的

本研究では、過去の研究成果において明らかにした膵β細胞の細胞分化・成熟化・脱分化に関与する(図2)モノアミンをリガンドとする複数のGPCRに着目し、以下の疑問点を明らかにしていく。

- ① どのGPCRが細胞分化・成熟化・脱分化に関与するか、化合物スクリーニングにより検証する。
- ② 化合物の標的となるGPCRは膵β細胞に存在するのか局在性を明らかにする。
- ③ 標的のGPCR群の会合の有無を検証し、会合状態が化合物により変わるのかを明らかにする。
- ④ マウスやヒトの膵島を用いた知見をヒトiPS細胞からの膵β細胞分化培養法の改良に応用し、分化誘導されるβ細胞のインスリン分泌能をより生体内に近づける。
- ⑤ 分化誘導した細胞は移植治療に利用できるのか、より**臨床応用**を目指した観点から実験する。

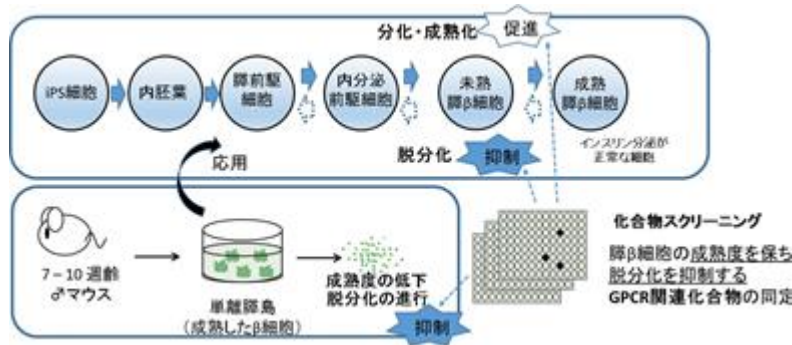


図2 モノアミンをリガンドとするGPCRによる分化・成熟化・インスリン分泌制御

3. 研究の方法

実験1 GPCR 関連化合物の分化促進、脱分化抑制、成熟化促進効果の解析

(1) 化合物の探索

申請者らはマウス膵島の分散培養下でおこる膵β細胞の脱分化がDrd2アンタゴニストに抑制されることを見出した (Sakano et al., *Stem Cell Reports*, 2016)。この方法としてインスリン発現細胞がEYFPにより蛍光標識されるRIP-Cre/R26-EYFPマウス膵島細胞を用いる。インスリン抗体による免疫染色を行いβ細胞 (INS+, EYFP+) および脱分化細胞 (INS-, EYFP+) の割合の変化から化合物の効果の有無を推察できる (図3)。

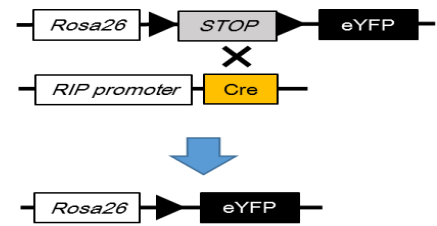


図3 RIP-Cre/R26-EYFP マウス膵島を用いた化合物スクリーニング

(2) スクリーニング結果の検証

化合物スクリーニングにより、膵β細胞の脱分化・成熟度に影響を与える可能性が高い化合物の多くが細胞内モノアミンの蓄積に関わっていたことから細胞内モノアミンの蓄積に関与する小胞モノアミントランスポーター2 (VMAT2) のコンディショナルノックアウトマウスを用いてスクリーニング結果の検証を行った。

まず、Creリコンビナーゼ存在下でVMAT2第3エクソンを欠失するVmat2^{Tm1c/Tm1c}マウスを作製した。このマウスをPDX1プロモーター下でCreERT2を発現するPDX1-CreERT2マウスと交配した。このマウスではタモキシフェン注射によって膵前駆細胞特異的にVmat2が欠損される (Pdx1-CreER/ Vmat2^{Tm1c/Tm1c})。本研究ではこのマウスの発生期におけるVMAT2遺伝子の必要性について考察した。さらにラットのInsulin2プロモーター下でCreを発現するRIP-CreマウスとVmat2^{Tm1c/Tm1c}マウスを交配した (RIP-Cre/ Vmat2^{Tm1c/Tm1c})。このマウスでは膵β細胞でVmat2が欠損される。高脂肪食 (HFD) を与え、膵β細胞の変化について考察した。

実験2 GPCR 関連化合物によるインスリン分泌改善

マウスやヒト膵島、ヒトiPS由来の膵β細胞におけるモノアミン関連シグナルの変化がもたらすインスリン分泌現象の変化を解析する。方法としてアデノウイルスの感染によりヒトインスリンとVenusの融合タンパク質を発現させる。さらに培地中のグルコース濃度を上昇させ、インスリン顆粒の細胞外放出を全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRFM) で観察する。

5. 研究成果

(1) 発生期における膵前駆細胞内のVMAT2欠損による膵臓内分泌細胞の増加

E8.5にタモキシフェンを注射したPdx1-CreER/ Vmat2^{Tm1c/Tm1c}マウスでは、E19.5の時点で内分泌細胞数の増加が見られた。また、野生型マウスのE12.5の膵原基をEx Vivo培養する過程でVMAT2阻害剤を添加するとコンディショナルノックアウトマウスの結果と同様に内分泌細胞の量が増加した (図4)。発生期における膵前駆細胞でモノアミン貯蔵が機能しなくなると主にドーパミンが枯渇することで膵前駆細胞から内分泌前駆細胞への分化の抑制が弱まるためであると推察した。この結果は我々のマウスES細胞分化の研究結果 (Sakano et

al., 2014) と一致している。また、ヒト iPS 細胞の分化培養系においても VMAT2 阻害剤の効果を確認できることから発生期における VMAT2 を介したモノアミン貯留が膵島の発生に重要であることを強く示唆する結果と考えている。

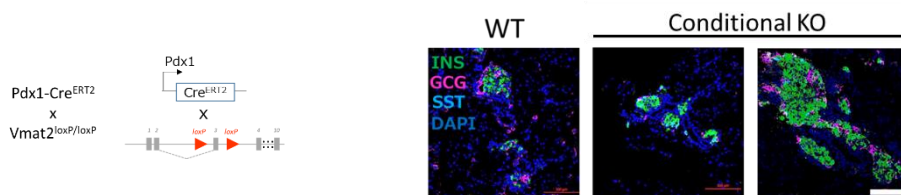


図4 Pdx1-CreER/ Vmat2^{Tmlc/ Tmlc} マウス胚における膵内分泌細胞の増加

(2) GPCR 関連化合物によるインスリン分泌改善

インスリン分泌におけるドーパミンを中心としたモノアミンの役割を調べるため、単一にしたマウス β 細胞に対し INSULIN-Venus を強制発現させ、TIRFM を用いて解析を行った。モノアミンの細胞内貯留を枯渇させるため VMAT2 阻害剤である TBZ による前処理を 24 時間行った後にインスリン分泌を観察すると TBZ 無処理の群と比較して、高グルコース刺激下における 1 層目 (グルコース刺激後 5 分以内) 開口放出イベント数に変化は見られなかった。一方、前処理群では 2 相目 (刺激後 5-20 分) において有意に増加していた。細胞外にドーパミンを添加したところ、一時的な開口放出のち、速やかにイベント数が大きく減少した。これらの結果から、細胞外ドーパミンがインスリン分泌を阻害すること、VMAT2 を介した細胞内モノアミン貯蔵が分泌 2 相目を抑制していることが分かった。

さらに、内在性のドーパミンがどのように分泌を制御しているかを調べるため、ドーパミン受容体を用いた TIRFM 観察実験を行った。高グルコース刺激下で、ドーパミン D1 様受容体アンタゴニスト、SCH23390 およびドーパミン D2 様受容体アンタゴニストを加えたところ、SCH23390 が $1 \mu\text{M}$ 以上の濃度でイベント数を大きく増加させることが分かった。さらに、SCH23390 は細胞内カルシウムを増加させた。また、別の D1 様受容体アンタゴニスト SKF83566 を用いてもイベント数が増加することが確認した。一方で D1 様受容体アゴニスト SKF38939 は分泌を阻害しなかった。これらの結果から、内在性のドーパミンが D1 様受容体を介して分泌を制御していることが示唆された。さらに SCH23390 とドーパミンおよび D1 アゴニスト、SKF38939 および D2 アゴニストの (-)-Quinpirole を同時に添加したところ、これらの化合物は SCH23390 の効果を阻害せず、SKF38939 はさらにインスリン分泌を促進した。過去の研究ではドーパミン受容体は D1, D2, D3 間でのヘテロ二量体形成が知られており、互いのリガンドに対するアフィニティーの変化に影響するため、今後 FRET などの手法を用いて TIRFM で観察するような短時間でのインスリン分泌への二量化の影響など研究を進める予定である。

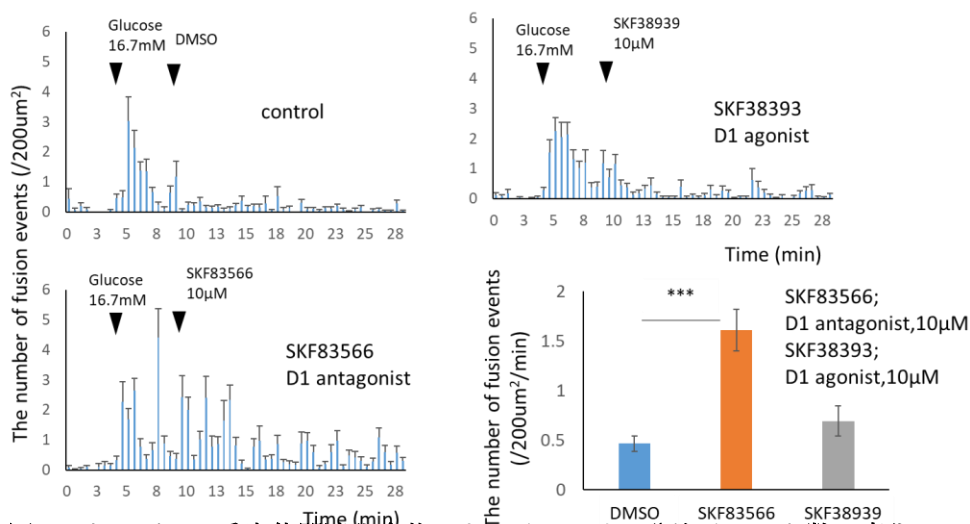


図5 ドーパミン受容体関連化合物によるインスリン分泌イベント数の変化

(3) 出生後のβ細胞でのVMAT2欠損による脱分化・細胞死の誘導

膵島の中の細胞の多様性、または膵島ごとに細胞のヘテロ性に違いを持たせることで多様な膵島からなる膵臓が構成される。この膵島内の細胞と膵島毎といった2種類のヘテロ性を維持することが、さまざまな体内の状況に適応可能な状態を作り上げているのではないかと考えている。

このヘテロ性を生体内では一部のβ細胞のみにドーパミン産生に必要なチロシンヒドロキシラーゼ (TH) が発現し、インスリン分泌が過多になる条件下ではTH陽性細胞数が増加する。ドーパミンシグナルはこのように加齢や生活環境、特に食事などの影響をうけTH陽性細胞数を変化させることにより生体が環境に適応するメカニズムのひとつであると考えられる。興味深いことに食事によってもβ細胞内のドーパミン合成や受容体を介したシグナル伝達が変わり、インスリン分泌に影響が出ることが知られている。本研究ではRIP-Cre/*Vmat2^{Tm1c/Tm1c}*に6週令以降HFDを与えたところ、一時的に膵島の数の増加と膵島内のβ細胞の増加がみられた。(図6)。一方で継続的なHFDの給餌は、β細胞の脱分化及び細胞死につながることを予測された。今後、脱分化・細胞死へのストレスという側面からモノアミン貯蔵の役割について研究を継続する。

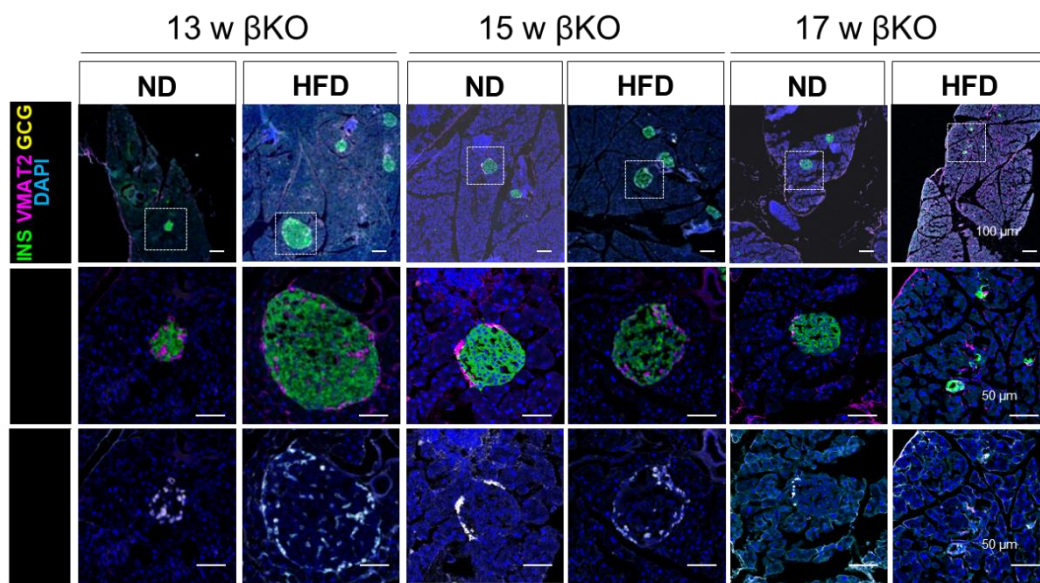


図6 膵島内モノアミン貯蔵不全によるβ細胞の脱分化および細胞死の進行

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Uefune F, Sonoda Y, Sakano D, Aonishi T, Kume S
2. 発表標題 Analysis of Vmat2 mediated regulation in insulin secretion
3. 学会等名 International Diabetes Federation Congress 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上船史弥、園田雄輝、坂野大介、青西亨、糸昭苑
2. 発表標題 モノアミンによるインスリン分泌制御機構の解明
3. 学会等名 50th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 徳間 啓, Zixuan Erinn Sim, 上船 史弥, 坂野 大介, 白木 伸明, 糸 昭苑
2. 発表標題 Establishment and analysis of hiPSC that visualize the INSULIN producing cells
3. 学会等名 第89回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 徳間 啓, Zixuan Erinn Sim, 上船 史弥, 坂野 大介, 白木 伸明, 糸 昭苑
2. 発表標題 Generation and Characterization of an INSULIN promoter driven mCherry Reporter Human iPS Cell Lines Using CRISPR/Cas9 system
3. 学会等名 日本発生物学会第50回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Sakano, Yuki Toyoda, Sai Araki, Nobuaki Shiraki, Shoen Kume
2. 発表標題 Monoamine signaling controls cell differentiation and maturation of pancreatic beta cell
3. 学会等名 Conbio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sai Araki, Yuki Toyoda, Daisuke Sakano, Shoen Kume
2. 発表標題 Signaling Pathway of Monoamine in Pancreatic β -cell Differentiation
3. 学会等名 Conbio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuki Toyoda, Sai Araki, Daisuke Sakano, Shoen Kume
2. 発表標題 Monoamine controls differentiation and maturation state of pancreatic β -cells
3. 学会等名 Conbio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----