

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18437

研究課題名(和文) CGFによる膵細胞自己増殖機構の解明に基づく糖尿病治療の開発

研究課題名(英文) Development of diabetes treatment based on the mechanism of bCGF inducible beta cells proliferation

研究代表者

津川 陽司 (Tsugawa, Yoji)

名古屋大学・生命農学研究科・研究科客員研究員

研究者番号：90763269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病は、インスリン感受性が低下しそれに伴う膵ラ島b細胞のインスリン分泌量の増加、負担を強いられた膵ラ島b細胞が減少し、インスリン分泌量が不足することで発症する。最近の研究結果により、生体内の栄養素で準必須アミノ酸の1つであるアルギニンが膵ラ島b細胞の強力なインスリン分泌誘導因子であることを定量的に明らかとなった。アルギニンの生体内での役割について解析するため、独自に作製したアルギニンナノビーズを作製し、3種類のアルギニン結合因子(A/PBP1、bCGF、GK)を同定した。それらの生理機能解析により、アルギニンを介したインスリン分泌制御およびその恒常性維持機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、膵b細胞の自己増殖を促すメカニズムと併せてアルギニンによる新規の分泌機構を明らかにしたことは、現行の対症療法から、糖尿病病態の改善、さらには、根本的治療が可能な新薬の開発につながる可能性を秘めており、糖尿病治療において大きな意義を有する。糖尿病研究業界においてもまだ認知の低いA/PBPやbCGFについて新たな知見を提供することは、当該研究分野の視野を広げ、まだ未開拓な研究を展開させ得るという点で非常に重要であり、大きなインパクトがある。

研究成果の概要(英文)：Type 2 diabetes mellitus is a multifactorial disease, due to decreased glucose peripheral uptake and beta cell dysfunction, due to reduced both insulin secretion and insulin sensitivity. In our previous study, we have identified several factors involved in arginine-induced insulin secretion. To understand the mechanism of arginine-induced insulin secretion, using arginine-immobilized magnetic nanobeads, A/PBP, bCGF and GK were isolated and identified as the arginine-binding protein complex. By analyzing their physiological functions, we clarified the mechanism of arginine-mediated regulation of insulin secretion and its homeostasis maintenance mechanism.

研究分野：内分泌

キーワード：糖尿病 アルギニン インスリン アルギニン結合因子 内分泌 細胞 A/PBP

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、肝臓、骨格筋などの組織におけるインスリン感受性が低下し、それに伴い膵臓ランゲルハンス島β細胞(膵β細胞)のインスリン分泌量の増加、その長期化によって負担を強いられる膵β細胞が減少し、インスリン分泌量が不足することで発症する。一方で、現所属研究室は最近、生体内の栄養素で準必須アミノ酸の1つであるアルギニンが膵β細胞の強力なインスリン分泌誘導因子であることを発見した。さらに、アルギニンを固定化した独自のナノビーズを開発し(Masaki et al., *Biomed. Chromatogr.*, 24: 606-612 (2010))、インスリン分泌細胞抽出液から新規アルギニン標的因子として arginine/proinsulin-binding protein (A/PBP)およびβCGF (β Cell Growth Factor) を世界に先駆けて同定した(WO2012029958 A1)。A/PBPについては、膵β細胞特異的にA/PBPが過剰発現するトランスジェニックマウス(A/PBP Tgマウス)を作製したところ、野生型マウスと比較して膵島サイズや膵β細胞の大きさは変化がなく、膵β細胞数が有意に増加していた。さらに、同マウスに糖尿病状態を誘導したところ、ダメージを受けた膵β細胞の細胞死が抑制された。一方、βCGFについては、精製したβCGF組換えタンパク質をマウス膵β細胞株に添加したところ、有意な細胞増殖が認められているが、詳細な機能はよくわかっていない。

2. 研究の目的

上述の研究背景を踏まえ、申請時にはβCGFを基軸とし糖尿病病態における膵β細胞の増殖・再生について解明することを目的としていた。しかし、ファミリーとして抽出してきたβCGFの組換えタンパク質の精製およびトランスジェニックマウスの作出が難航したため、A/PBPを含む別のアルギニン結合因子 Glucokinase(GK)に標的を変え、これら因子が生体内でどのような分子と相互作用をして機能発揮するのかを明らかにする。

① 膵β細胞のβCGF増殖メカニズムの解明(2017年~2018年)

② アルギニンを介したA/PBPあるいはGKによる膵β細胞インスリン分泌制御メカニズムの解明(2018年~2020年)

3. 研究の方法

現在までに、膵β細胞は胎生期の急速なβ細胞の成長および妊娠中や高血糖時の膵島の傷害状態において増殖する報告があり、今回新たにβCGFが培養細胞レベルで自己増殖を促すことがわかった。そこで、生体内でのβ細胞の自己増殖におけるβCGFの役割を詳細に検討するため、βCGF強制発現トランスジェニックマウス(βCGF Tgマウス)を作成する。一方で、アルギニンの生体内での役割についてより具体的に解析するため、先に作成していたアルギニンナノビーズを用いて同定したアルギニン結合因子の機能解析を試みた。その1つであるA/PBP1では遺伝子改変マウス・組換えタンパク質実験に加えて、イメージング解析により、A/PBPとアルギニンとのβ細胞内器官におけるインスリン分泌までの変化を解析する。また、GKについてはインスリン分泌においてグルコキナーゼ酵素活性が関与している事が報告されていることから、アルギニンによるGK酵素活性への影響について生化学的な解析を執り行う。インフォマティクス解析においては、アルギニンとA/PBPあるいはGKとの結合活性ドメインを同定し、さらに若年発症成人型糖尿病(MODY)患者の全ゲノム解析を行うことで、それらの遺伝子変異がアルギニン誘導性インスリン分泌制御を関与しているのか検討する。

4. 研究成果

① 膵β細胞のβCGF増殖メカニズムの解明

ヒトβ細胞株PANC1あるいはマウスβ細胞株NIT1において、βCGFによる細胞増殖活性が認められた。また、当研究室のこれまでの研究によりマウス膵β細胞株抽出液中から細胞膜に発現するβCGFs受容体候補(βCGFR)がいくつか同定された。そのうちのイムノグロブリン様ドメインを保有する膜糖タンパク質の1つを上記細胞にて安定的に発現させたところ、コントロールと比較して細胞増殖が2-3倍程度促進された。さらにこれら細胞株に対して組換え体βCGFの投与によって相乗的な細胞増殖活性が認められた。しかしながら先述の通り、βCGF Tgマウスの作成を予定していたが、当初の研究に含めていたβCGFタンパク質投与後のβCGFの組織局在や機能の解析においてβCGF Tgマウスと大きく異なる可能性が示唆されたため計画が大きく遅れた。

② アルギニンを介したA/PBPあるいはGKによる膵β細胞インスリン分泌制御機構の解明

我々は、アルギニンが小胞体に存在する未成熟なインスリンの放出に関与すること明らかにしている(Umeda et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 466(4):717-22 (2015))、詳細なメカニズムは分かっていない。アルギニン誘発インスリン分泌のメカニズムを理解するために、アルギニン枯渇培地培養または絶食状態において、細胞内アルギニン濃度を低下させた状態からアルギニンを加え、インスリン分泌への影響を観察した。まず、アルギニン枯渇は、A/PBPを介して小胞体へのプロインスリンの蓄積および保持を誘導した。次に、A/PBPに競合的に結合するアルギニンの追加により、処方帯からゴルジ体および分泌小胞に転位した。このことからA/PBPからプロインスリンが放出され、インスリン分泌に至り、アルギニンがA/PBPの機能調

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

節することが明らかとなった。さらに、**MODY** 患者の全ゲノムデータにおける解析結果からプロインスリンと **A/PBP** の相互作用に関与する各分子の遺伝子変異が **MODY** 患者におけるインスリン分泌不全に関与する可能性が示唆された。これらの遺伝子改変インスリンおよび **A/PBP** を作製し、アルギニン投与実験を行ったところ、アルギニンとの競合反応の欠損あるいはプロインスリンと **A/PBP** の結合が阻害され、インスリン分泌が抑制されること明らかとなった。

MODY2 はグルコースからグルコース 6 リン酸への変換を促す **GK** の変異が原因とされているが、具体的な分子機構を不明である。**MODY2** 患者の中にはアルギニン不耐性インスリン分泌不全が報告されている。**GK** 介したアルギニン誘発インスリン分泌のメカニズムを解明するために、ドッキングモデルによる相互作用部位の予測を基に *in vitro* での結合および酵素活性試験を行った。結果としてまず、異性体 **D**-アルギニンではなく、**L**-アルギニンが直接 **GK** に結合し、グルコース-6-リン酸の生産においてグルコキナーゼ酵素活性を刺激した。**L**-アルギニンは 3 つのグルタミン酸残基を介して **GK** に直接結合していることが分かった。また、アルギニンはグルコキナーゼ活性を刺激して、アルギニン誘発性インスリン分泌を誘導した。

以上の研究成果により、膵 β 細胞におけるアルギニンによるインスリン分泌および恒常性維持機構の役割が明らかとなり、特にインスリン分泌需要の高まる糖代謝時に重要であることが示された。本研究では **A/PBP** シグナル下流でアルギニンのセンシングにより競合的にプロインスリンが成熟化しインスリン分泌顆粒へ移行し、アルギニン制御下の **GK** 酵素活性により分泌促進されることで細胞外が輸送されていることを見出だした。さらに糖尿病患者由来の遺伝子データベースから得られたデータを基に作製した遺伝子改変実験により、それら分子の遺伝子変異が実際の **MODY** 患者においても原因因子となりえることから、今後引き続き具体的な治療法の開発にむけて解析を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuki Hattori, Yu Naito, Yoji Tsugawa, Shigenori Nonaka, Hiroaki Wake, Takashi Nagasawa, Ayano Kawaguchi & Takaki Miyata	4. 巻 11
2. 論文標題 Transient microglial absence assists postmigratory cortical neurons in proper differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15409-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsugawa Yoji, Natori Michiya, Handa Hiroshi, Imai Takeshi	4. 巻 Volume 12
2. 論文標題 Estradiol accelerates liver regeneration through estrogen receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 331 ~ 336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/CEG.S214196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsugawa Yoji, Hiramoto Masaki, Imai Takeshi	4. 巻 511
2. 論文標題 Estrogen induces estrogen receptor expression and hepatocyte proliferation in late pregnancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 592-596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.02.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsugawa Yoji, Handa Hiroshi, Imai Takeshi	4. 巻 514
2. 論文標題 Arginine induces IGF-1 secretion from the endoplasmic reticulum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1128 ~ 1132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.05.044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoji Tsugawa, Takeshi Imai
2. 発表標題 ER quality control protein UGGT1 regulates IGF1 secretion via sensing Arginine condition and controlling ER-associated degradation
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----