

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08487

研究課題名（和文）消化管ペプチドBetagenin受容体の解明と糖尿病治療への応用

研究課題名（英文）Identification of receptor for novel intestinal secretory protein, Betagenin, and application to diabetes treatment.

研究代表者

豊島 秀男（Toyoshima, Hideo）

埼玉医科大学・医学部・客員准教授

研究者番号：20197966

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）：我々は膵細胞の増加およびインスリン分泌を促進する消化管ペプチドとしてBetageninを発見し解析を進めてきた。本研究では、膵細胞上のBetagenin受容体を新たに同定し、その機能解析を進めた。今回の結果をもとに将来的には、Betagenin受容体に対する作用薬が糖尿病治療あるいは膵細胞の再生医療につながる有用性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病はインスリンの絶対的、相対的な作用不足により発症する。これまでにインスリンの分泌を増やす治療薬は臨床応用されている。一方で、膵細胞を増やす試みは行われているが未解決である。我々のBetageninは膵細胞にインスリンを分泌促進させつつ増殖させるという新しい機序を持つことから、その受容体の同定、その解析は糖尿病発症への理解、新しい糖尿病治療の開発に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：We identified a gene of betagenin as an intestinal peptide that promotes pancreatic β -cell increase and insulin secretion. In this study, we identified a novel betagenin receptor on pancreatic β -cells and performed a functional analysis of the receptor. Our findings suggest betagenin receptor may be useful for the therapeutic target for diabetes and regeneration of pancreatic β cells.

研究分野：代謝内分泌学

キーワード：糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の臨床では経過と共にインスリン分泌能が低下していくことが悪化の大きな要因の一つとなる。消化管ホルモンであるインクレチンに係る治療薬 (GLP-1 アナログ製剤や GLP-1 分解酵素 DPP-IV 阻害薬) は最近新しい糖尿病治療薬として臨床の場で大きな成功を収め、膵β細胞の保護作用についても期待されている。しかし、保護作用についてはそれを示唆する論文がわずかにあるものの、増殖作用についてはこれまでのところ証明されていない。

我々は新しい消化管ホルモンの探索を行い、消化管特異的に発現する *Tm4sf20* 遺伝子に由来するペプチド断片が細胞外に分泌され、そのペプチドが膵β細胞に対して細胞量の増加、およびインスリン分泌を促進することを明らかにしてきた。我々はこのペプチド因子を化学合成し **Betagenin** と命名して研究を進めてきた。**Betagenin** は全く独立に作製した 2 系統の Tg マウスにおいて膵島が 3 倍増加することが確認されている。さらに、KO マウスでは逆に膵島が 1/4 に減ることが明らかとなっており、**Betagenin** は単独で膵島の量を決める重要な因子と考えられる。従って、**Betagenin** は膵β細胞の増加作用においては、既存のインクレチンよりも有効である可能性が高く、膵β細胞への分化促進作用およびインスリン分泌を促進するも併せ持つことから糖尿病に対する根源的治療薬となることが想定される。

なお、**Betagenin** 合成ペプチドの活性については外部製薬企業において共同研究のための確認実験においてもマウス膵島でのインスリン分泌促進および、膵β細胞増殖刺激作用についての再現性が確認されている。

また、我々は最近、新たに膵β細胞に対するアポトーシス抑制作用があること、ヒト膵島に対してもマウスと同様の作用が認められることを確認してきた。

2. 研究の目的

本研究では膵β細胞上の **Betagenin** 受容体を同定し、そのシグナル伝達経路を明らかにすることで、本因子に関連した生理的意義の解明を目指した。その結果を基に **Betagenin** そのもの、受容体に対する活性化剤、あるいはシグナル阻害剤などによる糖尿病治療さらに膵臓再生医療への応用展開を期待した。最終的には、本研究の結果から **Betagenin** 関連薬の臨床応用への道を拓き、膵β細胞が破壊され糖尿病が発症している状態でも新しい膵β細胞あるいは膵島を作ることの出来る画期的な治療薬のための基礎検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) **Betagenin** 受容体の探索とその機能解析

ホルモン受容体は病態において重要な役割を果たすため、**Betagenin** 受容体、特に膵β細胞上の受容体探索・同定および解析は糖尿病の病態解明には必須である。クローニング方法は、膵β細胞株化細胞 MIN6 細胞由来 cDNA からレトロウイルスなどを利用した発現ライブラリーを作製し、蛍光標識した **Betagenin** 合成ペプチドの結合の有無、あるいは、**Betagenin** 合成ペプチド添加時における膵β細胞増殖を指標として発現クローニングを行う。同時に発現マイクロアレイを行い膵臓に発現している遺伝子を抽出し、この絞り込みと発現クローニングの結果から候補遺伝子を得た。細胞増殖には EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) の取り込みを指標に検討した。

(2) **Betagenin** 受容体遺伝子欠損による表現型解析

(1) で決定した受容体遺伝子について、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法で遺伝子ノックアウト (KO) を行った。まず膵β細胞 MIN6 細胞で予備検討を行い KO を確認後、マウス受精卵においても同様にゲノム編集を行い、**Betagenin** 受容体 KO マウスを作製した。

4. 研究成果

(1) **Betagenin** 受容体の探索とその機能解析

得られた **Betagenin** 受容体遺伝子候補群を抽出し、HEK293T 細胞に遺伝子を一時的に導入し、その細胞とビオチンを用いて蛍光標識した **Betagenin** 合成ペプチドとの結合により受容体遺伝子

を得た。次に、Betagenin 受容体遺伝子を安定的に発現する CHO-Stable 細胞を樹立し、その細胞における Betagenin ペプチド添加による細胞増殖効果を確認することができた。ここまでの結果から、我々は Betagenin ペプチドと結合し、膵β細胞の増殖を誘導する遺伝子を特定した。この遺伝子の発現を siRNA でノックダウンすると、CHO-Stable 細胞と MIN6 細胞の両方で増殖が起らないことから、我々は膵β細胞上の Betagenin 受容体を同定できたと考える。

(2) Betagenin 受容体遺伝子欠損による表現型解析

受容体 KO マウス作製のために、まず MIN6 細胞においてゲノム編集で KO 細胞を作製した。Exon3 に対するガイド RNA (gRNA) を CRISPR direct で複数個設計した。その中で切断効率の良い gRNA と Cas9 タンパクをエレクトロポレーションで導入し受容体遺伝子 KO-MIN6 細胞を作製した。なお、この細胞に置いても Betagenin 合成ペプチドによる細胞増殖の阻害を確認出来た。

次にこの gRNA と Cas9 を用いてマウス受精卵でゲノム編集を行い、受容体 KO マウスを作製した。遺伝子解析の結果、1 塩基挿入変異により KO できていることを確認した。このマウスは、現在戻し交配を行っている段階ではあるが、基礎的検討でヘテロ KO マウスでは体重、成長曲線等に差は認められていない。糖代謝に関わる表現型解析は個体数が揃わずに未実施であるため今後の課題である。また、ホモ KO マウスは胎生致死の可能性が高く得ることができていないため、膵β細胞特異的 KO マウス作製が重要と考えられた。

そのためにまず、Exon3 周辺に 2 つ gRNA を設計した。loxP 配列を Exon3 前後に含む一本鎖 DNA (ssDNA) を作製し gRNA と Cas9 と同時にマウス受精卵にエレクトロポレーションにて導入することで Betagenin 受容体 flox マウスを作製した。このマウスは現在、個体化、戻し交配を実施して数を増やしている段階であるが、これは当初の計画が想定以上に研究が進んだためであり、次課題で解析する。今後は、この flox マウスに膵β細胞特異的 Cre マウス (Ins1-cre マウス、理研 BRC より入手) を交配することで膵β細胞特異的 KO マウスを作製し、糖代謝に対する影響を解析することが重要と考えられた。

Betagenin は他の消化管ホルモンと有意なホモロジーを持たない特徴的なペプチドであることに加え、我々以外からの報告は無くその生理的意義の全容の解明は必須である。これまでに得られた膵β細胞増加促進作用およびインスリン分泌促進作用など、有用性を明らかにできれば、血糖降下作用だけで無く膵β細胞自体を増やす新しいタイプの治療となるため、1 型だけではなく 2 型糖尿病の臨床への直接的な応用が期待される。また、膵β細胞保護作用の結果から、Betagenin を用いた高効率な膵島の培養法や膵島移植への応用やさらには膵臓の再生、あるいは ES/iPS 細胞、体細胞からの膵β細胞への分化誘導に関する問題にも応用できる可能性を秘めていると考えられる。

そのためにも、Betagenin 受容体に対する化合物アゴニストの探索や糖尿病治療への有効性の確認が重要と考えられた。今回我々の作製した KO 細胞、遺伝子改変マウスの解析が益々重要となり、さらに化合物スクリーニングにおいても有用となり得ることからも今回の研究結果は一定の成果を上げたと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saikawa Rika, Yamada Hodaka, Suzuki Daisuke, Amamoto Misato, Matsumoto Yuko, Funazaki Shunsuke, Yoshida Masashi, Toyoshima Hideo, Hara Kazuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Risk Factors of Hypoglycemic Encephalopathy and Prolonged Hypoglycemia in Patients With Severe Hypoglycemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine Research	6. 最初と最後の頁 213～218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14740/jocmr3728	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 Ochiai Nagahiro, Nakachi Yutaka, Yokoo Tomotaka, Ichihara Takahiro, Eriksson Tore, Yonemoto Yuki, Kato Takehiko, Ogata Hitoshi, Fujimoto Natsuko, Kobayashi Yasuhiro, Udagawa Nobuyuki, Kaku Shinsuke, Ueki Tomokazu, Okazaki Yasushi, Takahashi Naoyuki, Suda Tatsuo	4. 巻 2
2. 論文標題 Murine osteoclasts secrete serine protease HtrA1 capable of degrading osteoprotegerin in the bone microenvironment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1～13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0334-5	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 豊島秀男、横尾友隆、島野仁、岡崎康司
2. 発表標題 消化管ペプチドBetageninはヒト 細胞のアポトーシスを抑制し、増殖とインスリン分泌を促進する
3. 学会等名 第91回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横尾友隆、島野仁、岡崎康司、豊島秀男
2. 発表標題 消化管ペプチドBetageninはヒト膵島のアポトーシスを抑制し、増殖とインスリン分泌を促進する
3. 学会等名 第61回 日本糖尿病学会年次学術集会
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
研究 分担 者	横尾 友隆 (Yokoo Tomotaka) (80400688)	埼玉医科大学・医学部・准教授 (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------