

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19790392

研究課題名（和文）内分泌腫瘍の顆粒形成とホルモン分泌を制御する細胞内コレステロール代謝

研究課題名（英文）Cholesterol biosynthesis pathway enhance regulated insulin secretion and secretory granule formation in pancreatic β -cells.

研究代表者

橋本 博美（横田 博美）(HASHIMOTO HIROMI)

群馬大学・生体調節研究所・助手

研究者番号：30323372

研究成果の概要（和文）：近年、ペプチドホルモンを分泌顆粒へ運ぶ、カルボキシペプチターゼ E (CPE)、ペプチドホルモンの前駆体を活性型にするプロホルモン転換酵素 (PC1/3, PC2)、ペプチドホルモンを含むクロモグラニン A を分泌顆粒へ輸送するセクレトグラニン III が高コレステロール組成の分泌顆粒膜に結合することが報告されている。私の研究室では、分泌顆粒膜が 40-45 mol% という高いコレステロール組成を示すことを見出した。そこで本研究では、分泌顆粒膜のコレステロール組成が変化した時、ホルモン分泌と顆粒数、顆粒形態がどのように変化するかを調べた。

細胞のコレステロールは、二つのルートで供給される。一つは食事により取り込まれたコレステロールが LDL（低比重リポタンパク質）を介したエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれる系。もう一つは細胞内合成系で、アセチル CoA を出発原料として、HMG-CoA、メバロネート、ファルネシルピロリン酸 (FPP)、スクアレンを経て、コレステロールが合成される。細胞内オルガネラのコレステロール組成は小胞体膜、ミトコンドリア膜で 7 mol% と低いものの、ゴルジ装置のトランス側に向けてその組成は上昇し、細胞膜では 20-26 mol% の値を示す。本研究では、内分泌顆粒膜のコレステロールが非常に高いことから、その役割を明らかにするため、コレステロール合成経路中間体メバロネート、スクアレン、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP)、コレステロール合成阻害剤ロバスタチンを膵 β 細胞に与えて MIN6 β -細胞のインスリン分泌と分泌顆粒形成を調べた。その結果、コレステロールは、膵 β 細胞で内分泌顆粒の顆粒数とその大きさ、顆粒タンパク質の保持に重要であることがわかった。また、コレステロール合成経路の枝経路にあるゲラニルゲラニルピロリン酸は、MIN6 細胞とラット膵島でグルコース刺激インスリン分泌を促進した。従って、GGPP はインスリン分泌を促す薬剤としても期待できると考える。

研究成果の概要（英文）：Cholesterol is reportedly abundant in the endocrine secretory granule (SG) membrane. In this study, I examined the involvement of cholesterol biosynthesis intermediates and inhibitors in insulin secretion and SG formation mechanisms. There are two routes for the supply of cholesterol to the cells: one via de novo biosynthesis, and the other via LDL receptor-mediated endocytosis. I found that insulin secretion and content are diminished by HMG-CoA inhibitor lovastatin, but not by lipoprotein depletion from the culture medium in MIN6 β -cells. Cholesterol biosynthesis intermediates, mevalonate, squalene, and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) enhanced glucose-stimulated insulin secretion (GSIS), and the former two increased insulin content. The GSIS-enhancing effect of GGPP was also confirmed in perfusion with rat islets. Morphologically, mevalonate and squalene increased the population of SGs without affecting their size. In contrast, lovastatin increased the SG size with reduction of insulin-accumulating dense-cores, leading to a decrease in insulin content. Furthermore, insulin was secreted in a constitutive manner, indicating disruption of regulated insulin secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総 計	5,000,000	990,000	5,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：細胞・組織、生理活性、脂質、トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

内分泌細胞に含まれる多数の分泌顆粒はゴルジ装置のトランス側に樹枝状に伸長するネットワーク (TGN) から出芽・形成される。分泌顆粒は高グルコースなどの外来刺激によって細胞膜と融合し、内容物のホルモンが血中に放出され、ホルモンは血流を介して標的組織・細胞に到達し、その機能を調節する。ところで、内分泌組織から内分泌細胞を取り出して初代培養すると、時間とともに顆粒数が減少し、ホルモン分泌能が低下する。また、培養株化された内分泌細胞はその母細胞に比べて顆粒数とホルモン含量が減少している。例えば、膵島のβ細胞は顆粒に充ちているが、マウス膵β細胞由来株 MIN6 は正常β細胞と同様のグルコース刺激インスリン分泌パターンを示すものの、顆粒数は減少し、インスリン含量は母細胞の 11/10-1/20 である。しかし、それでも MIN6 はβ細胞培養株の中では最も高いインスリン量を含む。更に、ラット膵β細胞由来株 RINm5F は顆粒をもたず、インスリン含量は MIN6 のく 1/50 であるが、増殖は非常に速い。また、同じ MIN6 細胞でも、細胞の継代を重ねるとインスリン含量が減少し、増殖が速くなる。そこで、インスリン含量を顆粒数の反映とみると、「分泌顆粒数と増殖能は対極の関係にある」と云える。内分泌細胞の増殖亢進例は内分泌腫瘍で、

顆粒数の減少、消失、更に顆粒サイズの小型化を観察できる。分泌顆粒が減少すると、ホルモンのサイズは大型化し、インスリンノーマで見られるプロインスリン、下垂体クッシングで見られる ACTH 前駆体 POMC がその例である。つまり、分泌顆粒にはホルモン前駆体を活性型に転換する酵素 PC1/3、PC2、カルボキシペプチダーゼ E などが局在するが、増殖の亢進した内分泌細胞では顆粒形成能が低下して、これらの酵素群が減少し、ホルモン分泌は顆粒で運ばれる調節性分泌からいわゆる “たれ流し分泌” 一構成性分泌にシフトする。しかし、内分泌腫瘍の電顕像を観察すると、顆粒の豊富なものから全くないものまでバラエティーに富み、「顆粒数と増殖能は対極の関係」と云う仮説がそのまま成り立つとは思えない。下垂体腫瘍では GHoma のように成長ホルモン (GH) 顆粒数が比較的によく保たれているものがある一方、PRLoma のようにプロラクチン (PRL) 顆粒が激減している腺腫も多い。ACTH 産生腫瘍では顆粒内容の濃度がまちまちで、dense な顆粒、pale な顆粒が混在する。また、分泌顆粒は存在するが、血中 ACTH が上昇していない silent adenoma もある。更に、顆粒を消失して、その由来する母細胞が推測できない null cell adenoma も頻度が高い。

2. 研究の目的

研究の背景に述べたように、なぜ内分泌顆粒にこのようなバリエーションが生ずるのだろうか？ その原因として私は細胞内コレステロール代謝が関わっていると考えている。私の属する研究グループは内分泌細胞株 MIN6、AtT-20、PC12 の分泌顆粒をショ糖密度勾配超遠心で分画・精製し、その膜成分のコレステロール組成を測定し、継代数が少ないと 40-45 mol% を示すが、継代数が進むと 25-35 mol% に低下することを見出した。更に、GHoma の顆粒膜はコレラ毒素で染色され、GM1 ガングリオシドを構成脂質としてもち、Lipidraft 様の脂質構成を示すのでコレステロールが失われにくく、一方 PRLoma の PRL 顆粒はコレラ毒素で染色されず、GM1 ガングリオシドをもたないので、コレステロールが失われやすいと思われる。更に積極的にコレステロール合成酵素 HMG-CoA reductase の阻害剤 lovastatin や pravastatin 存在下に内分泌細胞を培養して細胞内コレステロールを減少させると、顆粒数が減少し、ホルモンが前駆体のまま分泌されるようになる。つまり、スタチンによって増殖が亢進した内分泌細胞と同じような分泌様式を再現できる。このような背景から、私は「細胞増殖が亢進すると顆粒膜コレステロール組成が減少して顆粒形成能が低下する」、「顆粒膜コレステロール組成が減少するとホルモン前駆体、コレステロール結合タンパク質（例えばセクレトグラニン III）が構成性経路から血流中に分泌される」、「顆粒膜からコレステロールが抜けにくいと顆粒数が保たれる」、と考えるようになった。本研究ではこれらの考えを検証する。

3. 研究の方法

上記背景と目的に基づき、下記 A-E に示す研究を試みコレステロールと分泌顆粒形成について明らかにする。

A. コレステロール除去血清を用いた時のインスリン分泌

MIN6 細胞を通常ウシ胎児血清 (FBS) とコ

レステロール除去血清 (LPDS) で培養し、インスリン分泌を調べた。MIN6 細胞は、高グルコース (HG) 刺激でインスリン分泌と細胞内インスリン含量に変化を示さなかった。次に HMG-CoA 還元酵素阻害剤ロバスタチンで細胞内コレステロール合成を抑えるとインスリン分泌は著しく増加したが、インスリン含量はロバスタチンを与えない時に比して半分近くに減少した。このことから、細胞内コレステロール合成が MIN6 細胞のインスリン顆粒のコレステロール源であると考えた。

B. コレステロール中間体メバロネート、スクアレン添加培養時のインスリン分泌

次にコレステロール中間体メバロネートとスクアレンを MIN6 細胞に加えてインスリン分泌とインスリン含量を調べた。メバロネートは、グルコース刺激インスリン分泌を 1.6 倍に増加させ、インスリン含量を 1.5 倍に増加させた。スクアレンもメバロネート同様の傾向が見られた。

C. コレステロール生合成中間体 GGPP 添加培養時のインスリン分泌

FPP (ファルネシルピロリン酸) はコレステロール合成だけではなく、タンパク質のプレニル化に重要なコレステロール中間体である。プレニル化タンパクには低分子 GTP 結合タンパク質 Rho, Rac, Rab, Ras ファミリーがあり、膵β細胞ではゲラニルゲラニル化されるタンパク質 Rab3a, Rab27a, CDC42 Rac1 がインスリン分泌を制御すると報告されている。MIN6 細胞に 10 μM GGPP を添加して培養すると、グルコース刺激インスリン分泌は 2.3 倍に増加した。

D. GGPP によるラット膵島からのインスリン分泌

次にラット膵島を用いて細胞灌流実験を行った。GGPP を加えるとグルコース刺激インスリン分泌のピークが約 2 倍高くなった。

E. コレステロール生合成中間体が分泌顆粒形成に及ぼす効果

ロバスタチン、スクアレン、メバロネート、GGPP 存在下で培養した MIN6 細胞から分泌顆粒を精製し、顆粒膜コレステロール組成を調

べた。顆粒膜コレステロール組成は、無添加の顆粒膜が 48 mol%に対してロバスタチン 24 mol%、メバロネート 59 mol%、スクアレン 64 mol%、GGPP 48 mol%を示した。次に顆粒膜のコレステロールに結合するセクレトグラニンⅢ (SgIII) の顆粒局在は、無添加のコントロールを 100 とすると、メバロネートは 107%、スクアレンは 127%と増加しているのに対し、ロバスタチン存在下では 43%と減少した。

更に私は、免疫電子顕微鏡で顆粒を観察した。分泌顆粒の直径は 300-400 nmであるが、ロバスタチン存在下では 500 nm以上の顆粒が増加した。トータルの分泌顆粒数は、コントロールで $84.2 \pm 10.7 / 100 \mu\text{m}^2$ 、ロバスタチンで $61.4 \pm 16.4 / 100 \mu\text{m}^2$ となり、ロバスタチン存在下で顆粒数が減少した。一方、メバロネートとスクアレンでは $128.9 \pm 19.0 / 100 \mu\text{m}^2$ 、 $117.7 \pm 15.8 / 100 \mu\text{m}^2$ と顆粒数が増加した。

4. 研究成果

コレステロールは、内分顆粒膜の主要な脂質である。コレステロールは、膵β細胞で内分泌顆粒の顆粒数とその大きさ、顆粒タンパク質の保持に重要である。更に、GGPP は、MIN6細胞とラット膵島でグルコース刺激インスリン分泌を促進した。従って、GGPP はインスリン分泌を促す薬剤としても期待できると考える(論文投稿中)。

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 2 件)

①A simple method to induce differentiation of murine bone marrow mesenchymal cells to insulin-producing cells using conophylline and betacellulin-delta4. Hisanaga E, Park KY, Yamada S, Hashimoto H, Takeuchi T, Mori M, Seno M, Umezawa K, Takei I, Kojima I. Endocrine J. 2008 55, 535-543, 2008 査読有

②Exophilin4/Slp2-a targets glucagon granules to the plasma membrane through unique Ca^{2+} -inhibitory phospholipid-binding activity of the C2A domain. Yu M, Kasai K, Nagashima K, Torii S, Yokota-Hashimoto H, Okamoto K, Takeuchi T, Gomi H, Izumi T. Mol. Biol. Cell. 18, 688-96, 2007 査読有

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 博美(横田 博美)(HASHIMOTO HIROMI)

群馬大学・生体調節研究所・助手

研究者番号：3 0 3 2 3 3 7 2