

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08325

研究課題名（和文）モノアミンシグナルを介した膵島の機能性調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the functional regulatory mechanism of pancreatic islets via monoamine signaling

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ES細胞やiPS細胞から分化誘導した膵臓iPS細胞を使い、より効率的に糖尿病再生医療を行うには、生体内の膵臓細胞がどのように機能維持を行っているかを理解する必要がある。我々の研究チームは、最近膵臓細胞内のドパミン産生能のヘテロ性が細胞内の活性酸素種（ROS）の発生を制御することで細胞集団としての機能を維持していることを明らかにした。本課題では、このメカニズムをさらに詳細に解析するため、ドパミン合成酵素であるTyrosine hydroxylase（TH）の細胞内での発現調節に焦点をあて研究を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの再生医療研究では、より均質な細胞集団を分化誘導させることを目指すことが多かった。今回の研究成果は、生体内では細胞個々の異なる性質が重要であり、これらの“ヘテロ性”をも再現することがより効果的な再生医療での細胞治療につながることを示唆するものであった。

研究成果の概要（英文）：In order to use pancreatic cells derived from ES cells and iPS cells to more efficiently perform regenerative medicine for diabetes, it is necessary to understand how pancreatic cells maintain their functions in vivo.

Our research team recently revealed that the heterogeneity of dopamine-producing ability in pancreatic cells maintains their function as a cell population by controlling the generation of intracellular reactive oxygen species (ROS). In this project, in order to analyze this mechanism in more detail, we focused on the regulation of the expression of tyrosine hydroxylase (TH) which is required for dopamine synthase, in cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：膵臓 インスリン ドパミン ヘテロ性 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ES 細胞や iPS 細胞を用い血糖降下作用のあるインスリンを分泌する膵臓細胞を分化誘導する研究は、近年目覚ましい進歩を遂げた。そして、糖尿病の 1 型、2 型の発症・重篤化の機構は違いがあるものの再生医療は既に臨床試験での効果が示されはじめている。一方で、細胞死や脱分化によりインスリン分泌を維持できず、糖尿病モデル動物を短期間治療するにとどまっていた。一方で、インスリンを産生し、グルコース濃度に応じてインスリン分泌を行えるといった意味での細胞への分化効率が進歩しているにもかかわらず、何故、長期間細胞が試験管内で機能を維持できなかったり、生体への移植後の血糖改善効果を維持できないことが起こるために、この問題を克服する糸口が必要であった。

## 2. 研究の目的

1 型糖尿病やインスリン分泌能の低下を伴う 2 型糖尿病の治療には、膵島や膵臓移植が有効な治療法であることが知られている。しかし、ドナーが不足している現状からこの治療法が広く利用されていない。そこで胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から膵細胞を分化誘導し、移植する方法の確立が望まれている。

近年ではインスリンを産生し、グルコース濃度の上昇とともにインスリンを分泌可能な膵様細胞がヒト iPS 細胞から作製できる分化誘導方法が多数報告されるようになった。しかし、細胞死や脱分化によりインスリン分泌を維持できず、糖尿病モデル動物を短期間治療することはできるものの根治にはいたらず、繰り返し移植が必要となるのが現状である。

我々は、過去の研究成果から細胞集団内のドパミン産生能のヘテロ性 (図 1) をもとにした膵島内のインスリン分泌抑制が細胞内での活性酸素種 (ROS) の産生の抑制に重要であることを明らかにしている (Sakano et al., 2016, Sakano et al., 2020, Uefune et al., 2022)。このような ROS 蓄積の影響による細胞死や脱分化を防ぐことが、前述の問題点を改善する一因であると考えている。本研究課題ではドパミン産生の第一段階を担う酵素である Tyrosine hydroxylase (TH) のヘテロ性発現に焦点をあて、細胞間シグナルの理解と将来的なヒト iPS 細胞由来細胞を用いた効果的な移植治療開発に向けた研究を進めた。

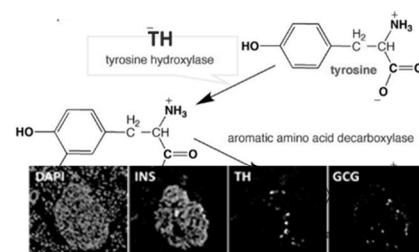


図 1. 膵細胞中の TH 発現細胞  
マウス膵島中の TH 陽性細胞は一部の細胞に限定される

## 3. 研究の方法

### 3-1 TALEN を用いた TH 強制発現 MIN6 細胞株の作製

ヒト TH 遺伝子はヒト膵島 (56 歳、男性、白人、BMI: 13.7、hemoglobin A1c: 5.0%) から RT-PCR にて増幅した。これの下流に T2A-mCherry-polyA を融合した遺伝子カセットを作製した。このカセットを Tet-On システムによって強制発現させることができる iDEST-R26\_hTH-mCherry ドナーベクターを構築した (図 2)。作製したドナーベクターは TALEN によりマウスのインスリンノーマ細胞株である (MIN6) の Rosa26 遺伝子座に挿入した。ターゲティングには TALEN mROSA26 KKR (Plasmid #60025) 及び TALEN mROSA26 ELD (Plasmid #60026) を addgene より購入し、ドナーベクターと共にリポフェクションにより MIN6 に導入した。

次に puromycin (InvivoGen) を用いて遺伝子組み換えが起こっていない細胞を排除した。その後、ドキシサイクリン (DOX) を添加し mCherry 陽性の単一クローンを回収し、DOX 依存的 TH 強制発現 MIN6 細胞株 (THiOE) とした。

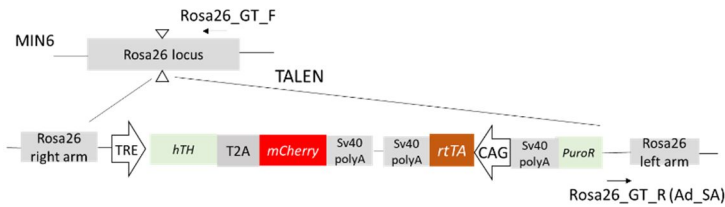


図2 THiOE MIN6細胞株はDOX依存的にTHを発現した。作製した遺伝子カセットはMIN6のRosa26遺伝子座に挿入した。

### 3-2 ドパミン定量

培養細胞をPBSで3回洗浄後、1% Triton (137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1% Triton-X100) を加えピペティングにより細胞を溶解した。ドパミンの定量にはDopamine ELISA kit (LDN, BA-E-5300)を用い、説明書にしたがって測定した。

### 3-3 アデノウイルスを用いた強制発現実験

ラットTHプロモーター制御下でGFPを発現する遺伝子カセットはAddgeneより購入 (Addgene No. Plasmid #80336) した(Oh et al., 2009)。ヒトTH遺伝子はヒト臍島からRT-PCRにより増幅したのを用い、HaloTagと融合した。これらの遺伝子カセットをpENTR1Aベクター(A10462, Invitrogen)に挿入した後、pAd/CMV/V5-DESTベクター (493-20, Invitrogen) にGateway LR Clonase Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific, 11791020) を用いて組み換えた。

作製したアデノウイルスベクターはHEK293AにLipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000001)を用いて導入し、アデノウイルスを産生させた。プラークが出現し、8割程がプラークになった時点で細胞を回収した。凍結融解を2回繰り返して細胞を破碎後、遠心(1680 g, 15分)し、上清を回収し、1次ウイルス液を得た。1次ウイルス液を再度HEK293Aに感染させ、8割程がプラークになった時点で細胞を回収し、同様な方法で2次ウイルス液を得た。実験には2次以上のウイルス液を用いた。ウイルスの量については実験開始前に濃度検討を行った。TH-HaloTagを過剰発現するアデノウイルスにおいて、培地量に対して1/10, 1/20, 1/40量のウイルス液を用いてMIN6に感染させると、高濃度のウイルス液では細胞死が起きているが1/40量では細胞数を維持していた。また、1/40濃度のウイルス液で強制発現がされていることを確認した。96 well plateに5 x 10<sup>4</sup> cells/wellで播種したMIN6に対して1/40濃度のアデノウイルスを感染させ、HaloTag R110 ligandで一晩処理した。EB培地で3回洗浄後、HaloTag TMR ligandを30分加えた。R110 ligand及びTMR ligandはEB培地で1000倍に希釈し使用した。

### 3-4 画像解析

免疫細胞化学により染色した細胞はMetaXpress (Molecular device)を用いて写真を取得し、解析を行った。タンパク質Xの染色画像において一定の輝度値を超える細胞をX陽性細胞とし、Xの陽性率はDAPI陽性細胞中のX陽性細胞の割合を算出した。また、TH-HaloTag融合タンパクを用いた実験では、DAPI陽性細胞のTMRリガンドの平均輝度値を算出し、TH-HaloTagを強制発現させていない細胞のTMRリガンド平均輝度値をネガティブコントロールとして差し引いた。

## 4. 研究成果

### 4-1 単一細胞から培養した細胞のTH発現の変化

MIN6においてTH抗体を用いた免疫細胞化学的解析を行うと0.1%程の細胞でTH陽性細胞が存在することが分かった。そこで、THの発現をヘテロに制御する機構が細胞自身に備わっていると考え、次の実験を行った。MIN6を単一の細胞から培養することで均一の性質をもつ細胞集団を作製できる。この細胞集団からTH発現量の異なるヘテロな細胞集団が自発的に生じるかどうか調べた。単一細胞の分取にはフローサイトメトリーを用い

た。96 well plate の 1 つの well に 1 つの細胞が入るよう機器の設定を行い、MIN6 単一細胞を分取した。単一の細胞から培養と継代を繰り返し、継代毎に細胞を一部分取し、TH 抗体を用いた免疫細胞化学により解析した。最初に単一にした時点での継代数を P1、次に継代した細胞の継代数を P2、...と表記する。免疫細胞化学的解析の結果、P6 以前ではほとんどのクローンですべての細胞が TH 陰性であったが、継代数の増加と共に TH 陽性細胞が一部の細胞で出現し、その割合は次第に増加した。今回 6 つのクローンを培養し、いずれのクローンにおいても TH 陽性細胞の出現を観察した (図 3A)。このことから TH 発現のヘテロ性が自発的に生まれることが分かった。

MIN6 は継代数によって性質が変化するため、クローンを再度フローサイトメトリーで単一細胞にし、元の状態に戻るかを検証を行った。clone 1 を再度フローサイトメトリーで単一細胞にし、clone 1-1 ~ clone 1-5 を培養した。その結果、clone 1 は再び TH 陰性のみからなる細胞集団に戻り、さらに培養を続けると再び TH 陽性細胞が出現した (図 3B)。

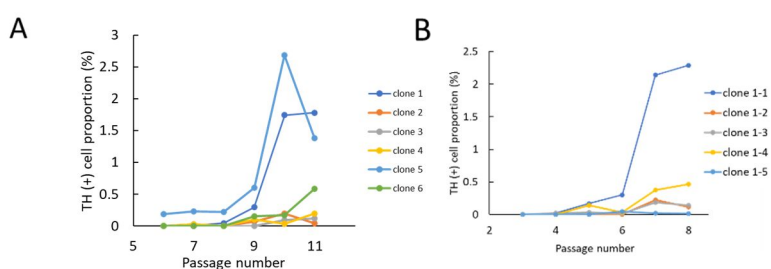


図 3 TH 陰性細胞から TH 陽性細胞が自発的に出現した。

(A)クローン毎の TH 陽性率の推移。(B) clone 1 を再度フローサイトメトリーで単一細胞化して同様の実験を行ったときの TH 陽性率の推移。横軸が継代数、縦軸が TH 陽性率。

#### 4-2 TH 合成能の解析

次に TH 発現のヘテロ性が生み出される機構について調べる為、TH のプロモーター活性に着目した。TH のプロモーター活性を可視化するため、TH プロモーター制御下で GFP を発現するアデノウイルスを用いた。膝島のマウス初代培養細胞に対してこのアデノウイルスを感染させた。その結果、TH 陽性細胞と TH 陰性細胞の両方で GFP 蛍光強度の高い細胞が観察され、TH の発現と GFP の蛍光強度に相関が見られなかった (図 4)。そこで、TH の発現は TH タンパク質の分解によって制御されている可能性があると考えた。

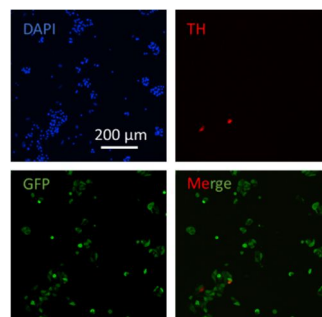


図 4 TH 陰性細胞でも TH プロモーター活性の高い細胞が存在した TH (red), GFP (green), DAPI (blue)

#### 4-3 TH 分解能の解析

TH の分解能について調べる為、TH-HaloTag 融合タンパクを強制発現するアデノウイルスを MIN6 に感染させた。R110 ligand を一晩加えることで TH-HaloTag 融合タンパク質と R110 ligand が 1 : 1 で共有結合し、続いて TMR ligand を 30 分加えることで、この 30 分間に新たに合成された融合タンパク質が TMR ligand と共有結合し、赤色に染色される。この赤色蛍光を経時的に観察し、pulse chase を行った (図 5A)。その結果、時間経過とともに赤色蛍光強度が弱まり、およそ 24 時間で半減した (図 5B)。このことから、TH タンパク質は不安定であり、合成後速やかに分解されていることが示唆された。

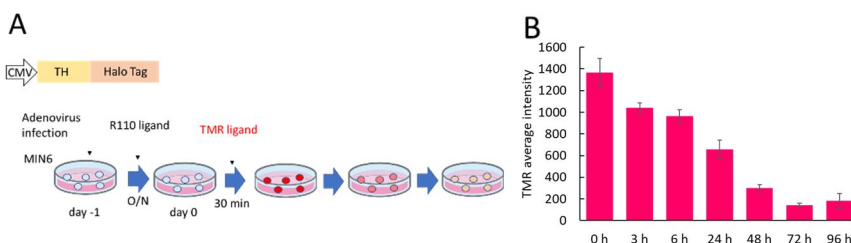


図 5 TH タンパクは約 24 時間で半減した (A) TH-Halo Tag 融合タンパク質を強制発現するアデノウイルスを作製し、MIN6 で強制発現させた。R110 リガンドを一晩加えた後、TMR リガンドを 30 分加え、この 30 分間に新たに合成された TH-Halo Tag 融合タンパク質を赤色で標識した。(B) TMR ligand 蛍光強度の推移。

#### 4-4 考察

本研究では TH の発現制御機構に着目し、TH 陽性細胞の移り替わりや TH 発現のヘテロ性が生まれる機構について解析を行った。THiOE 株を作製すると図のように DOX 非存在下でも一部で TH 陽性細胞が観察され、これらの細胞は mCherry 陰性であることから、内在の TH 陽性細胞と考えられる。今回この細胞株を作製する際、1

細胞由来のクローンを培養して作製しているため、もとは性質が均質の細胞集団であったと考えられる。また、MIN6 は TH 陽性率が 0.1%程しかないことから、このクローンが TH 陰性であった確率は 99.9%である。つまり今回の結果は TH 陰性細胞の一部が自発的に TH 陽性に変化した可能性があることを示している。フローサイトメトリーを用いて MIN6 を単一細胞から培養した細胞の解析において、培養を開始してから P6 まではほとんどすべての細胞が TH 陰性であった。しかし、培養を続けると次第に TH 陽性細胞が出現した。今回培養した 6 つのクローンのうち少なくとも 1 つが TH 陽性のクローンである確率は 0.6%しかないため、すべて TH 陰性のクローンと考えられる。この結果は TH 陰性細胞が自発的に TH 陽性に変化したことを示しており、TH の発現に可塑性があることを示唆している。

また、継代を重ねるごとに TH 陽性細胞の割合は増加した。TH 陽性細胞率の増加は TH 陽性細胞の増殖能が高いことが原因である可能性があることから、TH 陽性細胞が増加中の細胞に EdU を 1 時間添加し EdU 陽性率を測定したところ、TH 陰性細胞の EdU 陽性率は 8 %であるのに対し、TH 陽性細胞の EdU 陽性率は 12 %であり、わずかに増加傾向があった。しかし、TH 陽性率の増加が止まった細胞でも同様の実験を行うと TH 陽性細胞の EdU 陽性率は TH 陰性細胞のそれと比べて 6 %から 10 %に増加していることから、TH 陽性細胞は増殖能が高い可能性はあるが、それが原因で TH 陽性率が増加しているとは言い難い。TH タンパク質の分解能の実験と合わせて考えると、TH 陽性細胞が増殖したとしてもその分 TH タンパク質が分解を受けるため TH 陽性率は増加しないと推察している。

また clone 1 から再度単一細胞を分取し、同様の実験を行うと同様な結果が再現されることから、TH 陽性細胞の出現は単なる継代数の増加による性質の変化ではないことが分かる。

このように、TH 陽性細胞が移り替わることによってインスリン分泌能の高い機能的な細胞と分泌能の低い細胞が移り替わっていると考えられる。このことによって 細胞全体のストレスが緩和され、細胞が長期的に機能を維持するために重要であると考えている。

TH プロモーター制御下で GFP が発現するアデノウイルスベクターを用いて TH の合成能を調べた実験では、TH 陽性細胞では TH のプロモーター活性が高く、GFP の蛍光強度が高くなると予想した。しかし、予想に反して TH 陰性細胞でも GFP 蛍光強度の高い細胞が存在し、TH の発現と GFP の蛍光強度に相関が見られなかった。そこで、TH の発現は TH タンパクの分解量によって制御されている可能性があると考え、TH-HaloTag 融合タンパク質を用いた実験を行うと、TH タンパク質の分解速度は予想以上に速いことが分かった。TH プロモーター GFP を用いた実験において、TH 陰性細胞でも GFP 蛍光強度が高い細胞が存在した原因は TH の合成速度以上に分解速度が速いためと推察している。また、HaloTag リガンドを加えて 4 日経過後も TH が残存する細胞も存在した。これらの細胞は TH の分解速度が比較的遅いと考えられ、TH タンパクの分解能は細胞毎に異なる可能性がある。

TH が分解するメカニズムに関して、TH の 40 番目セリン残基のリン酸化が関係しているという報告がある (Kawahata et al., 2009)。TH は T8、S19、S31、S40 残基でリン酸化を受ける。特に S40 は TH の活性を上昇させることが知られており、主に PKA によってリン酸化される。反対に、TH によって合成された DA がフィードバックにより TH に結合し、活性を低下させることが知られる (Dunkley et al., 2004)。S40 のリン酸化は TH から DA を解離させる。一方で DA は TH タンパクを安定化させるが、S40 のリン酸化は TH タンパクを不安定化する。実際、神経細胞において S40 リン酸化 TH がユビキチン・プロテアソーム系により分解されることが報告されている。そのため、S40 のリン酸化を阻害すると TH の分解が抑制される可能性がある。そこで、40 番目セリン残基をアラニンに置換した変異型 TH と HaloTag を融合させたタンパク質を用いて解析を進めている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sakano Daisuke, Uefune Fumiya, Tokuma Hiraku, Sonoda Yuki, Matsuura Kumi, Takeda Naoki, Nakagata Naomi, Kume Kazuhiko, Shiraki Nobuaki, Kume Shoen	4. 巻 69
2. 論文標題 VMAT2 Safeguards -Cells Against Dopamine Cytotoxicity Under High-Fat Diet Induced Stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 26-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db20-0207	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 Sakano Daisuke, Inoue Airi, Enomoto Takayuki, Imasaka Mai, Okada Seiji, Yokota Mutsumi, Koike Masato, Araki Kimi, Kume Shoen	4. 巻 10
2. 論文標題 Insulin2Q104del (Kuma) mutant mice develop diabetes with dominant inheritance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68987-z	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上船史弥、坂野大介、糸昭苑
2. 発表標題 膵 細胞におけるD1-D2ヘテロ多量体を介したドーパミンによるインスリン分
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上愛里、坂野大介、糸昭苑
2. 発表標題 ドーパミンによる膵臓発生機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 坂野大介 桑昭苑	4. 発行年 2020年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 8
3. 書名 糖尿病学2020	

1. 著者名 坂野大介 桑昭苑	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 「膵 細胞再生療法の最前線」『糖尿病・内分泌代謝科』	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------