

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 15日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21689007

研究課題名（和文） 膵β細胞の増殖機構の解明とその測定法の開発

研究課題名（英文） Elucidation of growth mechanisms of pancreatic β-cells with new developed procedures

研究代表者

鳥居 征司 (TORII SEIJI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：40312904

研究成果の概要（和文）：膵β細胞においてインスリン分泌顆粒に局在するフォグリンは、糖刺激による開口放出によって細胞膜に移動し、分泌されたインスリンで活性化したインスリン受容体に一過的に結合する。フォグリンは、フィードバック経路による IRS2 の分解機構を抑制することで、インスリン・オートクライン作用による細胞増殖を制御していることを明らかにした。またフォグリン前駆体のプロ領域に CPE 蛋白質が結合し、ホルモン選別輸送に関わる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Phogrin, a member of receptor protein tyrosine phosphatases, primarily localize on secretory granules (SGs) in a variety of neuroendocrine cells including pancreatic β-cells, and recycle between SGs and the plasma membrane upon stimulation of regulated secretion. We suggest that the transitory interaction of phogrin with insulin receptor enables autocrine insulin action in pancreatic β-cells through stabilization of IRS2 protein by inhibition of negative feedback mechanism. We also suggest that phogrin has a supportive role in SG formation, through providing a communication mechanism between the luminal CPE complex and the cytoplasmic transport machinery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	17,900,000	5,370,000	23,270,000

研究分野：内分泌細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：インスリン、脱リン酸化酵素、ペプチドホルモン、分泌顆粒

1. 研究開始当初の背景

膵β細胞のインスリン分泌機構と細胞生存・増殖経路は密接に関連しており、遺伝子欠損マウスの解析などから、インスリン受容体を介したシグナル伝達経路が重要である

ことが見出された。なかでもインスリン受容体に結合するアダプターである IRS2 は、インスリン抵抗性時にみられるβ細胞の代償性増殖において中心的な働きをしていることが分かってきた。またグルコース刺激によ

る細胞増殖促進のメカニズムとして、分泌されたインスリンがオートクライン作用によりインスリン増殖シグナルを誘導する可能性が考えられている。しかしその作用を正確に解析するのは困難で否定的な論文報告もみられる。フォグリンは、神経内分泌細胞に限局して発現するチロシンホスファターゼ様の膜蛋白質である。これまでの申請者の解析によって、フォグリンはグルコース刺激により誘導されるβ細胞の増殖に関与することが判明している。

2型糖尿病の前段階においては、β細胞の代償性増殖によって膵島容量の増大が認められ、これを非侵襲的に測定することは、糖尿病のリスク診断に結びつく可能性がある。膵β細胞マスの非侵襲的測定法の開発は、放射性同位元素を用いてポジトロン断層撮影でイメージングする方法が進んでいるが、多くの課題が残されており、最近注目されている光学的イメージング法の発展が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、フォグリンが膵β細胞においてインスリンのオートクライン機能を調節していることを、細胞レベルで詳しく解析し分子機序を明らかにする。またフォグリン遺伝子のβ細胞特異的欠損マウスを樹立し、その機能を個体レベルで確認する。さらにフォグリン蛋白質に特異的に結合する分子を探索し、これを利用してβ細胞マスの新規測定法を開発する。

3. 研究の方法

まずフォグリンの増殖促進機能の詳細を調べるため、細胞レベルの解析を行う。初代培養β細胞やマウス膵島にAktの恒常的活性化変異体や種々の阻害剤を作用させたとき、フォグリンによるIRS2蛋白安定活性を測定する。次に生理機能を個体レベルで明らかにするため、フォグリン遺伝子の欠損マウスを作成し解析を行う。はじめにフォグリンfloxマウスを作製し、これをインスリンプロモーター下でCreを発現するマウスRIP-Creと交配し、フォグリン遺伝子のβ細胞特異的欠損マウスを樹立する。欠損マウスに様々な負荷を与え、β細胞の代償性増殖におけるフォグリンの機能を明らかにする。

β細胞増殖の新測定法開発に向けて、まずフォグリンの細胞表面領域の大量精製を行う。次にファージディスプレイ法などを使用し、この細胞表面領域に結合するペプチドを探索する。工学的改変によりペプチドに蛍光を付加し、これをマウス尾静脈から注入してイメージング装置を使った解析を行う。あるいはフォグリン蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を作製し、そのFc分子

を利用しβ細胞増殖の新規測定法を開発する。

4. 研究成果

膵β細胞においてインスリン分泌顆粒に局在するフォグリンは、糖刺激による開口放出によって細胞膜に移動するが、このとき、分泌されたインスリンで活性化したインスリン受容体に一過的に結合し、それがアダプター蛋白質IRS2の分解を保護してβ細胞増殖を促進する。フォグリンは、Akt等を介したフィードバック経路によるIRS2の分解機構を抑止することで、インスリンのオートクライン作用による細胞増殖を制御していることを明らかにした。

フォグリンflox遺伝子を持つホモ接合型マウスとRIP-Creマウスを交配し、フォグリン遺伝子のβ細胞特異的欠損マウスを樹立した。高脂肪食負荷などを与えたフォグリン欠損マウスの解析により、インスリン抵抗性時に現れるβ細胞の代償性増殖にフォグリンが関与することを示した。また同時にフォグリンが消化管組織に発現することを見出し、GIPやGLP-1といったインクレチン分泌細胞、セロトニンやガストリンなどの消化管ホルモン分泌細胞に局在することを明らかにした。

ファージディスプレイおよびペプチドアレイによるフォグリン結合ペプチドの探索では、フォグリン蛋白質に特異的で有用な結合分子が得られなかったため、特異的モノクローナル抗体を作製して蛍光ラベル抗体によるイメージング解析を進めている。一方、これらの研究過程でフォグリン前駆体のプロ領域にCPE蛋白質が結合することを発見し、この相互作用が分泌顆粒への選別輸送に関わることを明らかにした(下図)。

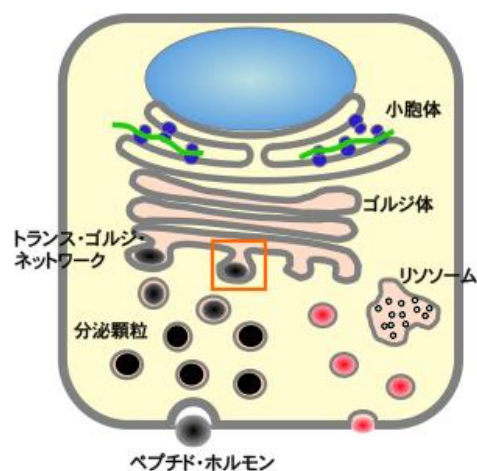


図1 内分泌細胞におけるホルモン分泌経路

図説明： ペプチドホルモンなど分泌顆粒に貯蔵される蛋白質群は、トランス・ゴルジ・

ネットワークあるいは未成熟顆粒において特異的に選別される（ソーティング）。その機構として弱酸性／高カルシウム環境における蛋白質凝集や、蛋白質間あるいは脂質膜との相互作用が提唱されているが、フォグリンとCPEの特異的結合が重要な役割を果たす可能性がある（図2）。

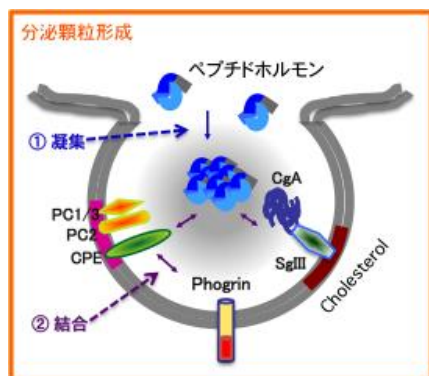


図2 ホルモン選別過程と分泌顆粒形成

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7件）

1. Sun M, Watanabe T, Bochimoto H, Sakai Y, Torii S, Takeuchi T, Hosaka M
Multiple sorting systems for secretory granules ensure the regulated secretion of peptide hormones.
Traffic 14, 205-218, 2013 査読有
2. Gomi H, Kubota-Murata C, Yasui T, Tsukise A, Torii S
Immunohistochemical analysis of IA-2 family of protein tyrosine phosphatases in rat gastrointestinal endocrine cells.
J Histochem Cytochem 61, 156-168, 2013 査読有
3. Hou N, Mogami H, Kubota-Murata C, Sun M, Takeuchi T, Torii S
Preferential release of newly synthesized insulin assessed by a multi-label reporter system using pancreatic β -cell line MIN6.
PLoS One 7, e47921, 2012 査読有
4. Yamaguchi R, Hosaka M, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, Imai H, Takeuchi T

Cyclophilin C-associated protein regulation of phagocytic functions via NFAT activation in macrophages.

Brain Res 1397, 55-65, 2011 査読有

5. Saito N, Takeuchi T, Kawano A, Hosaka M, Hou N, Torii S
Luminal interaction of phogrin with carboxypeptidase E for effective targeting to secretory granules.
Traffic 12, 499-506, 2011 査読有

6. Kubota C, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, Imai H, Takeuchi T
Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity.
J Biol Chem 285, 667-674, 2010 査読有

7. Torii S
Expression and function of IA-2 family proteins, unique neuroendocrine-specific protein-tyrosine phosphatases.
Endocrine Journal 56, 639-648, 2009 査読有

〔学会発表〕（計10件）

1. Seiji Torii, Naoya Saito, Ayumi Kawano, Ni Hou, Toshiyuki Takeuchi
Exocytosis-coupled interaction of insulin receptor and secretory granule-resident PTP phogrin allows for autocrine insulin signaling in pancreatic beta cells
10th International Conference on Protein Phosphatase 2013.2.7 がんセンター（東京）
2. 鳥居征司、候妮、最上秀夫
マルチタグ・ラベリング法によるインスリン分泌機構の解析
第30回日本内分泌学会内分泌代謝学サマーセミナー 2012.7.13 伊香保（群馬）
3. 鳥居征司、候妮、最上秀夫
Preferential release of newly generated insulin assessed by a multi-labeling reporter system.
第64回日本細胞生物学会 2012.5.29 国際会議場（神戸）
4. Seiji Torii, Chisato Kubota, Hideaki Imai, Toshiyuki Takeuchi
Basal autophagy regulates oxidative stress-associated cell death in neural

cells.
1st International Symposium on
Carcinogenic Spiral and 9th
International Conference on Protein
Phosphatase 2011.2.1 東京大学(東京)

5. 鳥居征司、久保田知里、今井英明、
竹内利行
Implication of constitutive reactive
oxygen species generation from
autophagosome/lysosome in neuronal
oxidative cell death.
第62回日本細胞生物学会 2010.5.20
国際会議場(大阪)
6. Seiji Torii, Naoya Saito, Toshiyuki
Takeuchi
A protein-tyrosine phosphatase
phogrin regulates autocrine insulin
signaling through direct interaction
with insulin receptor.
49th Annual meeting of The American
Society for Cell Biology 2009.12.7
San Diego(米国)
7. 鳥居征司、久保田知里、竹内利行
酸化ストレス性神経細胞死に対するオー
トファジーの関わり
第82回日本生化学会 2009.10.24 国際
会議場(神戸)
8. 鳥居征司、久保田知里、竹内利行
酸化ストレスによる神経細胞死とオート
ファジー
第8回生体機能研究会 2009.7.25 箱根
(神奈川)

[図書](計1件)

1. 鳥居征司、竹内利行
膵β細胞における phogrin/IA-2 の役割
糖尿病学 2010 初版 診断と治療社
2010年 52-57頁

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥居 征司 (TORII SEIJI)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号: 40312904

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山田 圭一 (YAMADA KEIICHI)
群馬大学・工学研究科・助教
研究者番号: 70323334