

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08547

研究課題名（和文）膵内分泌細胞間クロストークによるアミノ酸シグナルを介した恒常性維持システムの解明

研究課題名（英文）Homeostatic system mediated by amino acid signaling through intercellular crosstalk between pancreatic endocrine cells

研究代表者

中川 祐子（Nakagawa, Yuko）

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：90422500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体内において、各臓器は正常機能を維持するため、細胞の量とその運命を厳密にコントロールする。膵臓の内分泌細胞である膵島でも、 α 、 β 、 δ 、PPの4種類の細胞の量がそれぞれ決められており、その細胞増殖の制御と細胞運命維持の破綻が糖尿病等の発症へと直結する。PP細胞は膵島内分泌細胞の僅か数パーセントを構成する細胞であり、その機能はほとんど解明されていない。本研究はグルカゴンが制御するアミノ酸シグナルによりPP細胞の増殖が調節されることを見出した。この結果はアミノ酸シグナルが膵島細胞の可塑性をコントロールすることで運命維持にも極めて重要な役割を果たす可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵内分泌細胞のPP細胞についての報告は少なく、特にその生理的機能については、殆ど未開拓であった。私達はPP細胞またPP細胞より分泌するPPの機能解析に必要なリソースを揃え、精力的にPP細胞の生理的機能について解析を進めてきた。本研究では、PP細胞の増殖と可塑性をグルカゴンが制御していることを見出した。近年、血中のアミノ酸濃度バランスが変化することによりがん細胞の悪性度を促進させることが報告されているが、本研究では正常な膵内分泌細胞がアミノ酸濃度の変化により増殖が劇的に亢進し、多重ホルモン発現細胞を誘導することを見出した。本研究の成果は極めて新規性高い発見に繋がることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：In vivo, each organ strictly controls the quantity and fate of cells to maintain normal function. In the pancreatic islets, which are endocrine cells of the pancreas, the quantities of the four types of cells- α , β , δ , and PP-are each precisely regulated. The breakdown of control over cell proliferation and fate maintenance directly leads to the onset of diseases such as diabetes. PP cells constitute only a small percentage of the pancreatic islet endocrine cells, and their function is mostly unexplored. This study discovered that the proliferation of PP cells is regulated by amino acid signals controlled by glucagon. These results suggest that amino acid signaling may play a crucial role in maintaining the fate of pancreatic islet cells by controlling their plasticity.

研究分野：生理学

キーワード：PP細胞 グルカゴン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PP細胞は膵内分泌細胞の一つで、膵頭部に多く存在する。PP細胞が分泌するPPは摂食や肥満の抑制、脂質代謝異常症の改善に寄与することが知られているが、PP細胞自身の生理的意義については不明な点が多い。そこで我々はPP細胞の生理的機能を明らかにする目的でPP細胞の量の変化するモデルを探索した。その結果、プログルカゴン遺伝子欠損マウス (Hayashi, Y. *et al.*, *Mol. Endocrinol.*, 2009) でPP細胞が過形成すること、正常膵内分泌細胞ではあまり見られないPP⁺ グルカゴン⁺ (GCG⁺) 二重陽性細胞が多数存在することを見出した。プログルカゴン遺伝子はグルカゴンやGLP-1をはじめとする様々なホルモンをコードするため、どのホルモンが原因であるか不明であった。その後の検討により、グルカゴン作用を欠損したマウス、すなわちグルカゴン受容体欠損マウスで同様の表現型が再現されたことより、グルカゴン作用不全によりPP細胞の過形成とPP⁺ GCG⁺二重陽性細胞が誘導されるが明らかとなった。さらに、グルカゴン受容体floxマウスを作製し、5種類の組織特異的にCreを発現するマウスと交配し、検討を行った結果、肝臓特異的グルカゴン作用不全によりPP細胞の過形成とPP⁺ GCG⁺二重陽性細胞が誘導されることを突き止めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、グルカゴン作用不全マウスにおいて認められたPP細胞の過形成およびPP⁺ GCG⁺二重陽性細胞の発現誘導のメカニズムを明らかにし、この際、誘導された多重ホルモン発現細胞の特性を解明することである。この結果より生物の普遍的な問いである細胞増殖と細胞運命の制御機構の未知なる領域に迫ろうとするもので、きわめて高い新規性をもつ研究である。本研究により、今まで未開拓であったPP細胞の生物学および膵内分泌細胞間のクロストークを介した恒常性維持のメカニズムが明らかになることが期待される。予備検討の結果では、アミノ酸特に高濃度のグルタミン刺激によりPP細胞の過形成とPP⁺ GCG⁺二重陽性細胞が誘導された。この結果はアミノ酸が膵内分泌細胞の細胞増殖や運命維持を制御する可能性を示唆するもので独自性の高い研究であると考えられる。また、この分子機構を明らかにすることで、培地中のアミノ酸の濃度を調節することで目的の膵内分泌細胞を特異的に増殖させることが期待でき、糖尿病をはじめとする膵内分泌細胞に起因する病態の新しい治療に貢献できることが期待される。

3. 研究の方法

単離膵島の培養

10-13週齢の野生型マウスまたは *PPY-DTA* マウスより膵島を単離した。単離膵島はマトリゲルを塗布した 24 well プレートで 4 日間培養した。コントロールの培地は RPMI1640 w/o L-Glutamine

に 500 μ M L-Glutamine を加え使用した。高濃度グルタミン培地は RPMI1640 w/o L-Glutamine に 3,250 μ M L-Glutamine を加え使用した。

4. 研究成果

(1) 肝臓特異的グルカゴン受容体欠損マウスでは PP 細胞の自己増殖および GCG⁺ PP⁺二重陽性細胞の増加により PP 細胞量が増加した

PP 細胞の生理的機能を明らかにする目的で、PP 細胞量が増加するモデルの探索を行った。その結果、グルカゴン受容体を欠損させたマウス (*Gcgr*^{-/-} マウス) において PP 細胞が過形成

し、PP⁺ GCG⁺二重陽性細胞が多数存在することを明らかにした。免疫染色法の結果、GCG⁺陽性細胞の約60%の細胞がPP陽性細胞であった。この結果は、グルカゴン作用不全により増加した細胞の一部がPPを発現し、それにより、PP陽性細胞が増加し、PP細胞量が増えたことが考えられた。4週齢のGcgr^{-/-}マウスはコントロールに比べ、PP細胞量が増加していた。また、Gcgr^{-/-}マウスでは増殖マーカーであるKi67陽性のPP細胞が増加していた。この結果は、グルカゴン作用不全よりPP細胞自身の自己増殖が亢進したことを示唆している。

これらの結果を踏まえて、今回私たちは、どの組織のグルカゴン作用不全が、PP細胞の過形成に寄与するかを明らかにすることにした。その結果、肝臓特異的グルカゴン受容体欠損マウスにおいて、PP細胞量が増加することを明らかにした(図1)。10週齢の肝臓特異的グルカゴン受容体欠損マウスにおいて、Ki67⁺GCG⁺PP⁺細胞がコントロールに比べ増加していた。この結果は、肝臓特異的グルカゴン受容体欠損マウスにおいてもPP細胞自身の自己増殖によりPP細胞量が増加することを示唆するものである。加えて10週齢と40週齢の肝臓特異的グルカゴン受容体欠損マウスを比較すると、PP細胞量が約5倍増加していた。また、40週齢の肝臓特異的グルカゴン受容体欠損マウスは10週齢の肝臓特異的グルカゴン受容体欠損マウスに比べて、PP⁺ GCG⁺細胞が顕著に増加していた。この結果は肝臓特異的グルカゴン受容体欠損マウスにおいても、細胞の一部がPPを発現し、それにより、PP陽性細胞が増加し、PP細胞量が増えたことが考えられた。

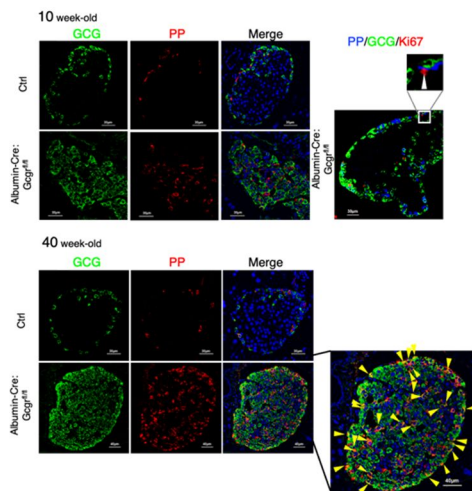


図1. 肝臓特異的グルカゴン受容体欠損マウスはPP細胞が増加した

(2) 高濃度グルタミン条件下で単離膵島を培養することによりPP⁺陽性細胞が増加した
 グルカゴン作用不全における細胞の過形成のメカニズムにおいては既に多くの報告がなされている (Solloway M. J. *et al.*, *Cell. Reports*, 2015., Jinrang K. *et al.*, *Cell. Metabolism*, 2017., Dean E. D. *et al.*, *Cell. Metabolism*, 2017.). これらの報告によると肝臓での作用不全により、アミノ酸の代謝が不全となり、血中のアミノ酸濃度が上昇する。このため、細胞に過剰なグルタミンが取り込まれることにより、mTORが活性化し、細胞の過形成が促進される。またTC1-6細胞および単離膵島を用いた検討では高濃度のグルタミンおよびアラニンで細胞が増殖することが報告されている (Jinrang K. *et al.*, *Cell. Metabolism*, 2017., Dean E. D. *et al.*, *Cell. Metabolism*, 2017.). そこで、PP細胞の過形成も細胞同様にグルタミンによって誘導されるかを検討した。その結果、高濃度グルタミン培地(3.25 mM L-Glutamine)で培養した単離膵島ではGCG⁺ PP⁺二重陽性細胞が増加した(図2)。また、この二重陽性細胞の増加は、mTORの阻害剤であるラバマイシンで二重陽性細胞の数が

減少した（図3）。以上の結果は高濃度グルタミンによって、PP+陽性細胞の増加が誘導されることが考えられる。

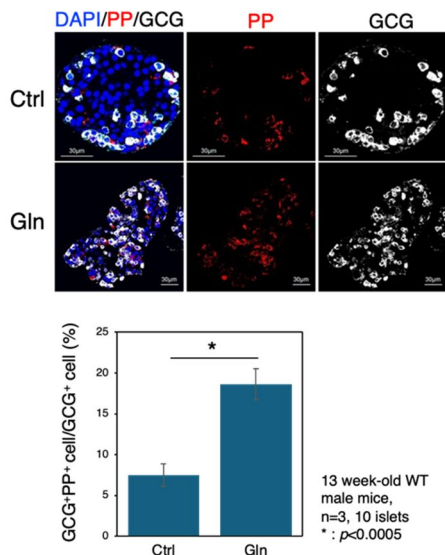


図2. 単離膵島を高濃度グルタミン存在下で培養すると GCG+ PP+陽性細胞が増加した

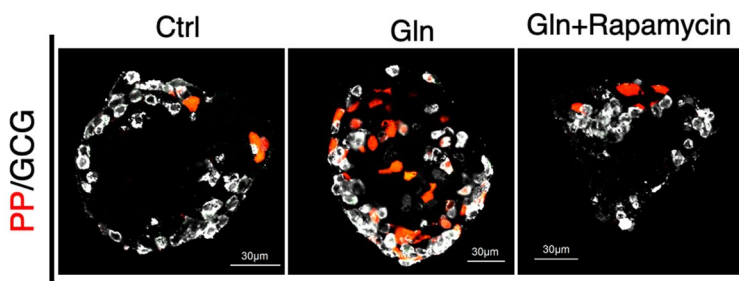


図3. ラパマイシンによりは高濃度のグルタミンの存在下で増加した GCG+ PP+二重陽性細胞の数が減少した

(3) *PPY-DTA* マウスの膵島では高濃度グルタミンによって GCG+細胞の増殖は誘導されなかった

PPY-DTA マウスは PP 発現細胞でジフテリア毒素 A フラグメントが発現し、細胞死するというマウスである。このマウスでは *PPY* 発現細胞が死滅する。グルタミンによって増殖する細胞が *PPY*-lineage 細胞かを検証するために、野生型マウス及び *PPY-DTA* マウスより膵島を単離して、高濃度グルタミン存在したで4日間培養した。その結果、*PPY-DTA* マウスの膵島では高濃度グルタミンによっても GCG+細胞の増殖は認められなかった（図4）。以上のことより、高濃度グルタミンにより増殖する細胞は非 *PPY*-lineage 細胞である可能性が考えられる。また *PPY* 遺伝子の発現または PP タンパク質が高濃度グルタミンによって惹起される細胞の過形成に関与する可能性が考えられる。

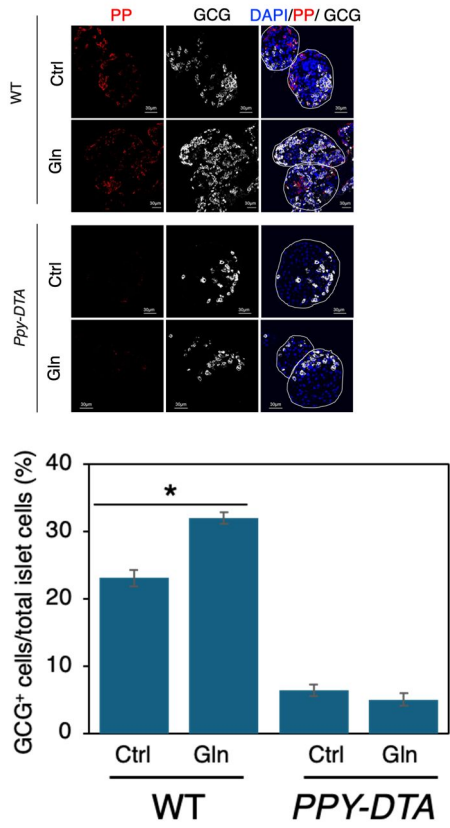


図 4. 高濃度のグルタミンの存在下で培養した *PPY-DTA* マウスの膵島の GCG⁺陽性細胞の数は増加しなかった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Pereye Ofejiro Blessing, Nakagawa Yuko, Sato Takashi, Fukunaka Ayako, Aoyama Shuhei, Nishida Yuya, Mizutani Wakana, Kobayashi Nanami, Morishita Yohei, Oyama Tetsunari, Kawabata Iwakawa Reika, Watada Hiroataka, Mizukami Hiroki, Fukuda Akihisa, Fujitani Yoshio	4. 巻 0022-3417
2. 論文標題 Identification of <sc>Ppy</sc> lineage cells as a novel origin of pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	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） 10.1002/path.6295	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 Fukaishi Takahiro, Nakagawa Yuko, Fukunaka Ayako, Sato Takashi, Hara Akemi, Nakao Keiko, Saito Michiko, Kohno Kenji, Miyatsuka Takeshi, Tamaki Motoyuki, Matsuhisa Munehide, Matsuoka Takaki, Yamada Tetsuya, Watada Hiroataka, Fujitani Yoshio	4. 巻 64
2. 論文標題 Characterisation of Ppy-lineage cells clarifies the functional heterogeneity of pancreatic beta cells in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 2803 ~ 2816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00125-021-05560-x	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 Kasano-Camones Carlos Ichiro, Takizawa Masayuki, Ohshima Noriyasu, Saito Chinatsu, Iwasaki Wakana, Nakagawa Yuko, Fujitani Yoshio, Yoshida Ryo, Saito Yoshifumi, Izumi Takashi, Terawaki Shin-Ichi, Sakaguchi Masakiyo, Gonzalez Frank J, Inoue Yusuke	4. 巻 173
2. 論文標題 PPAR activation partially drives NAFLD development in liver-specific <i>Hnf4a</i>-null mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 393 ~ 411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad005	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 Fukunaka Ayako, Shimura Mari, Ichinose Takayuki, Pereye Ofejiro B., Nakagawa Yuko, Tamura Yasuko, Mizutani Wakana, Inoue Ryota, Inoue Takato, Tanaka Yuto, Sato Takashi, Saitoh Tatsuya, Fukada Toshiyuki, Nishida Yuya, Miyatsuka Takeshi, Shirakawa Jun, Watada Hirotaka, Matsuyama Satoshi, Fujitani Yoshio	4. 巻 13
2. 論文標題 Zinc and iron dynamics in human islet amyloid polypeptide-induced diabetes mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-023-30498-y	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 Saito Daisuke, Nakagawa Yuko, Sato Takashi, Fukunaka Ayako, Pereye Ofejiro Blessing, Maruyama Nobuhiro, Watada Hirotaka, Fujitani Yoshio	4. 巻 17
2. 論文標題 Establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay for mouse pancreatic polypeptide clarifies the regulatory mechanism of its secretion from pancreatic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e58 ~ e0269958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0269958	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川 祐子, Ofejiro B. Pereye, 佐藤 隆史, 福中 彩子, 青山 周平, 西田 友哉, 森下 揚平, 川端 麗香, 綿田 裕孝, 水上 浩哉, 福田 晃久, 藤谷 与士夫.
2. 発表標題 PPY遺伝子発現細胞に由来する膵管腺癌モデルの発症機構の解析
3. 学会等名 第21回生体機能研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川 祐子, Ofejiro B. Pereye, 佐藤 隆史, 福中 彩子, 青山 周平, 西田 友哉, 森下 揚平, 川端 麗香, 綿田 裕孝, 水上 浩哉, 福田 晃久, 藤谷 与士夫.
2. 発表標題 PPY遺伝子発現細胞に由来する膵管腺癌モデルの発症機構の解明
3. 学会等名 第34回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川 祐子, Ofejiro B. Pereye, 佐藤 隆史, 福中 彩子, 青山 周平, 西田 友哉, 森下 揚平, 川端 麗香, 綿田 裕孝, 水上 浩哉, 福田 晃久, 藤谷 与士夫.
2. 発表標題 膵内分泌細胞に由来する膵管腺癌モデルの発症機構の解析
3. 学会等名 第37回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川 祐子, 齊藤 大祐, Ofejiro B. Pereye, 福中 彩子, 佐藤 隆史, 丸山 順裕, 藤谷 与士夫
2. 発表標題 Pancreatic polypeptide分泌メカニズムの解明
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中川 祐子, 齊藤 大祐, Ofejiro B. Pereye, 福中 彩子, 佐藤 隆史, 丸山 順裕, 綿田 裕孝, 藤谷 与士夫
2. 発表標題 新規ELISAを用いたPancreatic polypeptide分泌調節機構の解明
3. 学会等名 第35日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ofejiro B. Pereye, Takashi Sato, Yuko Nakagawa, Ayako Fukunaka and Yoshio Fujitani
2. 発表標題 A novel Islet-derived mouse pancreatic ductal adenocarcinoma model
3. 学会等名 第35日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ofejiro B. Pereye, Takashi Sato, Yuko Nakagawa, Ayako Fukunaka and Yoshio Fujitani
2. 発表標題 Genetically induced immortalization of Ppy-expressing cells result in malignant transformation
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 隆史 , 中川 祐子 , 深石 貴大 , 福中 彩子 , 藤谷 与士夫
2. 発表標題 特定時期における膵内分泌細胞の運命変換機序の解明
3. 学会等名 北関東医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ofejiro B. Pereye, Takashi Sato, Yuko Nakagawa, Ayako Fukunaka, Shuhei Aoyama, Yuya Nishida, Hirotaka Watada, Akihisa Fukuda, Hiroki Mizukami and Yoshio Fujitani
2. 発表標題 Genetically induced immortalization of Ppy-expressing cells result in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
3. 学会等名 The 8th IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ofejiro B. Pereye, Takashi Sato, Yuko Nakagawa, Ayako Fukunaka, Shuhei Aoyama, Yuya Nishida, Hirotaka Watada, Akihisa Fukuda, Hiroki Mizukami and Yoshio Fujitani
2. 発表標題 Genetically induced immortalization of Ppy-expressing cells results in lethal pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 第25回Diabetes Research Forum in Tokyo
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ofejiro B. Pereye, Takashi Sato, Yuko Nakagawa, Ayako Fukunaka, Shuhei Aoyama, Yuya Nishida, Hirotaka Watada, Akihisa Fukuda, Hiroki Mizukami and Yoshio Fujitani
2. 発表標題 Genetically induced immortalization of Ppy-expressing cells results in pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川 祐子, Ofejiro B. Pereye, 佐藤 隆史, 福中 彩子, 青山 周平, 西田 友哉, 森下 揚平, 川端 麗香, 綿田 裕孝, 水上 浩哉, 福田 晃久, 藤谷 与士夫.
2. 発表標題 膵内分泌細胞に由来する膵管腺癌モデルの解析
3. 学会等名 第67回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2024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

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