

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08576

研究課題名（和文）新規治療戦略を見据えた膵 細胞機能とDPP-4発現の病態学的解析

研究課題名（英文）Pathophysiological analysis of pancreatic alpha cell function targeting DPP-4 expression for future development of therapeutic strategies for diabetes

研究代表者

河盛 段（Kawamori, Dan）

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50622362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では将来の新規糖尿病治療法開発を目標に、また病態の一層深い理解のため、これまで研究されていなかった膵 細胞の機能変化に着目した解析を行った。まず、グルカゴン分泌細胞株においてインクレチン分解酵素であるDPP-4の発現が、糖尿病下の高血糖を模倣した持続する高グルコース濃度といった周囲環境に応じてグルカゴン分泌と同様に変化することを見出した。さらにヒト由来iPS細胞から膵島内分泌様細胞を分化誘導したところ、膵 様細胞におけるDPP-4発現は分化段階により大きく変化していた。これら研究成果により、 細胞機能や膵島発生・細胞分化におけるDPP-4の重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大きな社会健康問題である糖尿病では、多彩な病態や合併症・併存症を有し、その病態の多様性から最適な治療法選択に難渋することも少なくない。本研究成果は糖尿病における 細胞機能変容やグルカゴン分泌異常の機序解明の糸口となり、インスリン偏重の糖尿病および代謝疾患の治療現状において、未来の 細胞・グルカゴン標的療法開発の学術的基盤となりうるものである。糖尿病学における学術的意義のみならず、将来の治療法開発に向けた基盤としての社会的意義を有するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Diabetes mellitus is a major public health problem in Japan, with a wide variety of pathological conditions, complications and comorbidities, and this diversity often hinders clinicians in providing optimal care. In this project, we focused on functional changes in pancreatic α -cells with the aim of developing novel therapeutic strategies for diabetes in the future along with a better understanding of the disease. First, we found that the expression of DPP-4, an incretin-degrading enzyme, changes in glucagon-secreting cell lines in response to prolonged exposure to high glucose, as does glucagon secretion. In addition, DPP-4 expression was significantly upregulated in islet endocrine α -like cells induced from human iPS cells as differentiation progressed. These results suggest the importance of DPP-4 in α -cell function, islet development and cell differentiation, which has both academic significance in diabetology and societal importance in future public health.

研究分野：糖尿病・代謝学

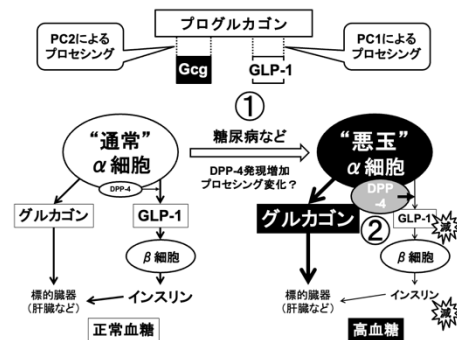
キーワード：糖尿病 グルカゴン 膵 細胞 DPP-4 GLP-1 インクレチン

1. 研究開始当初の背景

全世界における大きな社会健康問題である糖尿病に対し現在、様々な治療方略が講じられているが、その疾患管理はいまだ不十分であり、その多彩な病態や合併症・併存症から最適な治療法選択に難渋することも少なくない。またこれまでの診療はインスリンの質的・量的不足の改善に特化するあまり低血糖・肥満といった臨床的問題点も指摘されてきた。そのようななか 2010年代以降、糖尿病病態におけるグルカゴン分泌調節異常の寄与が再注目され、その治療的重要性の認識が広がっている。しかし、グルカゴン標的療法の開発に必須である糖尿病下のグルカゴン分泌調節・α細胞機能異常の発症機序に関しては未だ不明点が多い。また、グルカゴン受容体阻害薬による肝グルカゴン作用の抑制は血糖改善作用を示すが、多くの代謝学的副作用を呈するなど、いまだ問題点が多く、実用には至っていない。他方、グルカゴンのみを標的とするよりも本態であるα細胞を標的とした治療が期待されており、次世代糖尿病治療の開発において包括的なα細胞機能異常の解明が重要といえる。これまで我々は、糖尿病におけるα細胞グルカゴン分泌異常の発症機序を検討し、α細胞に対する慢性高グルコース負荷が細胞内酸化ストレス増大とインスリンシグナル障害を介してグルカゴン分泌過剰を誘導することを明らかとするなど、α細胞機能異常の病態解明に努めてきた²⁾。加えてα細胞がグルカゴン以外にもGLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) など様々な生理活性物質を産生・分泌して近隣のβ細胞機能に影響すること³⁾も提唱されているなか、以前の検討(18K08511)によりα細胞機能とその異常に関わる因子として、GLP-1といったインクレチンの分解酵素DPP-4 (Dipeptidyl Peptidase-4)のα細胞における発現を抽出した。

2. 研究の目的

本研究課題では、将来の膵α細胞の機能変化を標的とした新規糖尿病治療法開発における学術的基盤の確立を目標に、①「膵α細胞は複数ホルモンの分泌バランスが変化する様々な機能的多様性 (subtype)を呈し」、②「糖尿病下のα細胞ではDPP-4発現増加などの機能的シフトがおこり、これがグルカゴン過剰と共に膵島内GLP-1減少を介して病態悪化に関与する」という新しい概念仮説を設定し、分子生物学的手法を用いたこれらの立証を目的とした。



3. 研究の方法

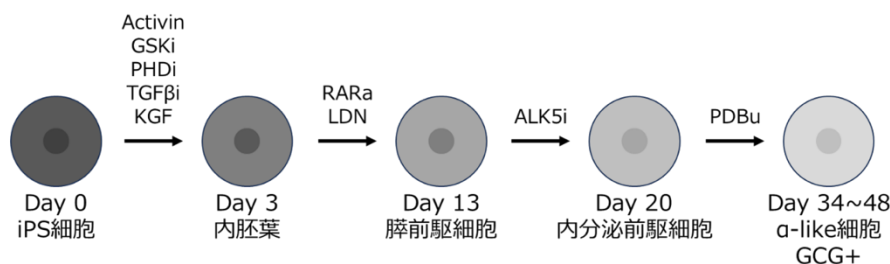
①グルカゴン分泌細胞株におけるグルカゴン・GLP-1分泌およびDPP-4発現の解析

細胞外環境による直接的なα細胞の機能変化とその背景機序を検討すべく、外的刺激応答性にグルカゴン分泌が変化するInR1G細胞に対し、通常条件である11.1mMグルコースを対照に糖尿病の慢性高血糖を模倣する25mMグルコースを負荷し、グルカゴン・GLP-1の分泌はStatic Incubation法で、また遺伝子発現は細胞から抽出したmRNAを用いたRT-PCR~Real-Time PCR法で、蛋白発現は全細胞蛋白を用いたWestern Blot法で、それぞれ評価した。グルカゴンとGLP-1の測定はそれぞれに対する特異的ELISAにて行った。



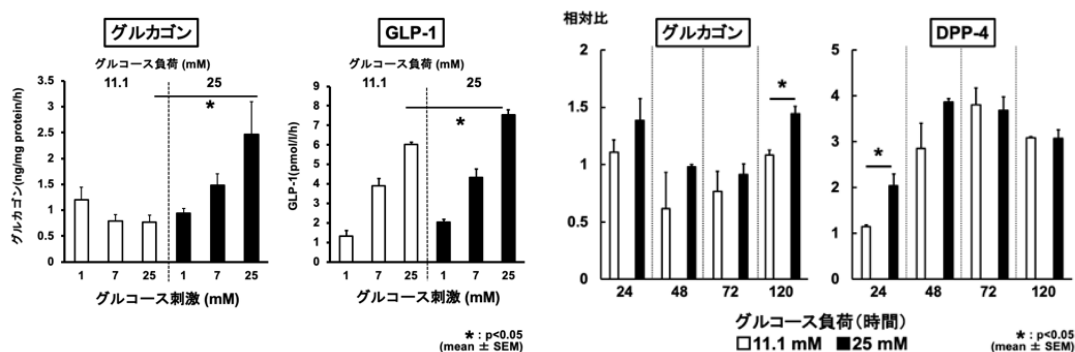
②ヒトiPS細胞由来膵島内分泌様細胞の誘導および各種遺伝子発現の解析

膵島発生・分化段階における膵α細胞機能および同細胞におけるDPP-4の意義を検討すべく、ヒト由来iPS細胞から既報の分化プロトコル⁴⁾に則り膵島細胞群を分化誘導した。分化の各段階において分化途中のスフェロイドより細胞を単離し、フローサイトメトリーを用いて細胞群を分別した。グルカゴン発現細胞集団を単離のうえ、細胞から抽出したmRNAを用いたRT-PCR~Real-Time PCR法で遺伝子発現を評価した。



4. 研究成果

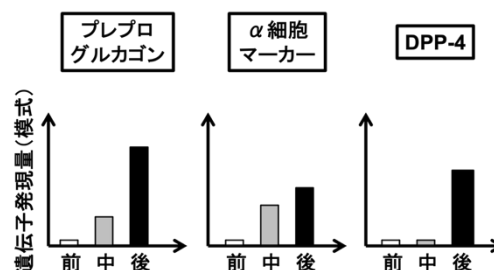
① グルカゴン分泌細胞株におけるグルカゴン・GLP-1 分泌および DPP-4 発現の解析



グルカゴン分泌細胞株 InR1G に対し、11.1mM の通常グルコース濃度もしくは 25mM の高グルコース負荷にて 12 時間培養した後、1 時間 Static Incubation にて 1、7、25mM グルコース下のグルカゴン分泌を評価した結果、25mM の高グルコース下で培養した InR1G 細胞では 25mM の高グルコース刺激時のグルカゴン分泌過剰を呈し、糖尿病と同様のグルカゴン分泌異常の誘導が確認された。一方、グルカゴン遺伝子発現においては高グルコース負荷による有意な増加は無く、このグルカゴン分泌過剰はグルカゴン合成の増加によるものではないと考えられた。また、グルカゴンと同様にプログルカゴンよりプロセシングされる GLP-1 の分泌について、前述のグルカゴン分泌過剰が誘導されている条件下で検討を行ったところ、実際に高グルコース刺激応答性の分泌増加を見出したほか、長時間高グルコース負荷による高グルコース刺激下 GLP-1 分泌の有意な増加を確認した。次に、InR1G における DPP-4 遺伝子について長時間高グルコース負荷の経時的な発現変化を評価したところ、25mM グルコース負荷 24 時間時点において DPP-4 遺伝子発現量の有意な増加が確認された。遺伝子発現量の増大が確認できた 24 時間時点においては、DPP-4 蛋白質自体の発現を Western Blot 法にて確認は可能であったが、その量的変化については評価できなかった。

② ヒト iPS 細胞由来膵島内分泌様細胞の誘導および各種遺伝子発現の解析

より人体に近い状況における DPP-4 の意義を検討すべく、ヒト由来 iPS 細胞から膵島内分泌様細胞を分化誘導した。分化各段階においてフローサイトメトリーにて α -like 細胞を単離し、DPP-4 遺伝子発現を定量したところ、分化後期にプレプログルカゴンと呼応して大きく増加することを見出し（提示は模式図）、膵島分化における意義が示唆された。



α 細胞とグルカゴン分泌は状態に応じてダイナミックに変化すること、さらに DPP-4 が α 細胞分化や機能に関与していることが示され、糖尿病下の α 細胞機能やグルカゴン分泌異常における病態生理学的意義が示唆された。本研究成果は糖尿病における α 細胞機能変容やグルカゴン分泌異常の機序解明の糸口となり、インスリン偏重の糖尿病および代謝疾患の治療現状において、未来の α 細胞・グルカゴン標的療法開発の学術的基盤となりうるものである。糖尿病学における学術的意義のみならず、将来の治療法開発に向けた基盤としての社会的意義を有するものと考えられる。

<引用文献>

- 1) Kawamori D, Sasaki S. Newly discovered knowledge pertaining to glucagon and its clinical applications. *J Diabetes Investig.* 2023 14:829-37.
- 2) Katsura T, Kawamori D, et al. Glucotoxicity induces abnormal glucagon secretion through impaired insulin signaling in InR1G cells. *PLoS One.* 2017 12:e0176271.
- 3) Habener JF, Stanojevic V. Alpha cells come of age. 2013 *Trends Endocrinol Metab.* 24:153-63.
- 4) Peterson QP, Veres A, et al. A method for the generation of human stem cell-derived alpha cells. *Nat Commun.* 2020 11:2241.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9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 4件）

1. 著者名 Kawamori Dan, Sasaki Shugo	4. 巻 14
2. 論文標題 Newly discovered knowledge pertaining to glucagon and its clinical applications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 829 ~ 837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.14009	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 Matsuda Tsuguka, Himeno Natsumi, Nakashima Akira, Nakagawa Naoya, Kohashi Toshihiko, Kawamori Dan, Kamei Nozomu	4. 巻 70
2. 論文標題 Different post-pancreatectomy glucagon responses to a meal test between surgical approaches	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1077 ~ 1085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ23-0032	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 河盛 段、河盛隆造	4. 巻 51
2. 論文標題 糖尿病治療UPDATE2024「糖尿病治療薬・基礎研究・臨床評価が拓く、グルカゴンの重要性解明」	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 CLINIC magazine	6. 最初と最後の頁 26-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 大杉 満、田村好史、河盛 段	4. 巻 42
2. 論文標題 座談会 糖尿病病態研究と診療の未来	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Current Therapy	6. 最初と最後の頁 164~169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Okita Tomonori, Kita Shunbun, Fukuda Shiro, Fukuoka Keita, Kawada-Horitani Emi, Iioka Masahito, Nakamura Yuto, Fujishima Yuya, Nishizawa Hitoshi, Kawamori Dan, Matsuoka Taka-aki, Norikazu Maeda, Shimomura Iichiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Soluble T-cadherin promotes pancreatic α -cell proliferation by upregulating Notch signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105404 ~ 105404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105404	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 Yabe Daisuke, Kawamori Dan, Seino Yusuke, Oura Tomonori, Takeuchi Masakazu	4. 巻 25
2. 論文標題 Change in pharmacodynamic variables following once weekly tirzepatide treatment versus dulaglutide in Japanese patients with type 2 diabetes (SURPASS J mono substudy)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diabetes, Obesity and Metabolism	6. 最初と最後の頁 398 ~ 406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dom.14882	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 Kawamori Dan, Kageyama Yoko, Tanaka Takayuki, Ishizaka Yuko, Hosoe Shigero, Katakami Naoto, Shimomura Iichiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Characteristic changes in plasma glutamate levels and free amino acid profiles in Japanese patients with type 1 diabetes mellitus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 111 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13911	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 河盛 段、細江重郎	4. 巻 131
2. 論文標題 糖尿病における膵 細胞機能条の実態は? “bi-hormonal disorder” から “bi-directional disorder” へ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊糖尿病	6. 最初と最後の頁 45-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 河盛 段	4. 巻 37
2. 論文標題 特集「生理活性ペプチド」各論5「グルカゴンに関する新知見と臨床応用」	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 336-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 河盛 段
2. 発表標題 シンポジウム「臨床・基礎におけるグルカゴン研究の進歩 / Recent progress in glucagon research: clinical and basic」グルカゴン分泌異常機序の解明とその臨床的検証 / Exploring the molecular mechanisms underlying abnormal glucagon secretion and its verification: research from basic to clinical
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 日本内分泌学会・日本糖尿病学会 編	4. 発行年 2023年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 516
3. 書名 内分泌代謝・糖尿病 内科領域専門医研修ガイドブック	

1. 著者名 日本糖尿病学会 編	4. 発行年 2023年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 616
3. 書名 糖尿病専門医研修ガイドブック改訂第9版	

1. 著者名 日本糖尿病学会 編	4. 発行年 2023年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 168
3. 書名 糖尿病治療の手引2023 改訂58版増補	

1. 著者名 野見山崇 編	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 256
3. 書名 血糖だけにこだわらない！糖尿病治療薬の考え方・使い方	

〔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	片上 直人 (Katakami Naoto) (10403049)	大阪大学・大学院医学系研究科・講師 (14401)	

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