

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08579

研究課題名(和文) 膵細胞におけるインスリンシグナルが可塑性に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) The Effect of Insulin Signaling on Plasticity in Pancreatic Beta Cells

研究代表者

木戸 良明 (Kido, Yoshiaki)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：10335440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞特異的にTsc2を欠損させたマウス(TSC2KO)では、高齢期になると膵細胞量減少、高血糖を呈する。膵細胞量減少の機序として、膵細胞の可塑性に注目が集まっており、TSC2KOにおいても影響している可能性が考えられる。TSC2KOの膵島では、若齢期から腺房細胞マーカーであるPtf1aが発現しており、高齢期になるとアミラーゼ陽性細胞が多数認められるようになった。Lineage-tracingでは、膵細胞由来マーカーであるYFPとアミラーゼの共陽性細胞が確認された。以上より、mTORC1活性亢進が膵細胞の可塑性に影響することで、腺房細胞に分化転換している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病患者では膵細胞量が減少しているが、その機序についてはまだよくわかっていない。膵細胞量減少の機序が解明されれば、糖尿病発症・進展を阻止する治療が可能となり、多くの患者にとっても医療経済にとっても大きな改善点であると考えられる。本研究で代表者は、膵細胞が腺房細胞に分化転換することを明らかにした。この現象はこれまでに報告されておらず、糖尿病の発症・進展予防において大きく寄与する可能性がある。今後、この現象を防ぐ機序についても検討を行い、実臨床への応用を目指したい。

研究成果の概要(英文)：Mice lacking Tsc2 specifically in pancreatic β -cells (TSC2KO) show decreased pancreatic β -cell volume and hyperglycemia in old age. In islets of TSC2KO mice, Ptf1a, an acinar cell marker, is expressed from young age, and many amylase-positive cells are observed in old age. Lineage-tracing revealed co-positive cells for amylase and YFP, a marker derived from pancreatic β -cells. These results suggest that increased mTORC1 activity may affect the plasticity of pancreatic β -cells, leading to their differentiation into acinar cells.

研究分野：糖尿病・代謝学

キーワード：膵細胞 可塑性 mTORC1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の糖尿病有病者や糖尿病予備軍はいずれも 1000 万人と推計されており、年々増加の一途をたどっている。2 型糖尿病の発症には膵 β 細胞不全やインスリン抵抗性が関係しており、特に日本を含めた東アジア人では膵 β 細胞不全が重要であることが知られている。膵 β 細胞不全は、グルコースなどの刺激に対してインスリンを適切に分泌できないインスリン分泌不全と膵 β 細胞量の減少によって引き起こされるが、インスリン分泌能や膵 β 細胞量の調節には膵 β 細胞におけるインスリンシグナルが関わっていることが明らかとなってきた。インスリンシグナル中の mTOR は複数のタンパク質と複合体を形成し、複合体は mTORC1 と mTORC2 と呼ばれる。2 型糖尿病の膵島では特に mTORC1 が活性化しているとされている。

これまでに、インスリンシグナルに含まれる PDK1 をノックアウトすると転写因子 FoxO1 が活性化し β 細胞量が減少するが、FoxO1 をノックアウトすると β 細胞数が回復し血糖値が改善するということが報告された (Nat Genet. 2006)。PDK1 をノックアウトすると mTORC1 活性も低下するため同時に β 細胞のサイズが減少する。したがって mTORC1 を活性化させると β 細胞が増大し糖尿病発症を抑制できるのではないかと考え、mTORC1 を抑制している TSC2 を膵 β 細胞特異的に欠損させたマウスを作製した。膵 β 細胞特異的 TSC2 ノックアウトマウス(β TSC2KO)では、mTORC1 の活性化により個々の β 細胞のサイズが増大し、若週齢では低血糖および高インスリン血症を示すが、高週齢になると主に β 細胞数の減少が原因で血糖値が上昇しはじめることが明らかとなった (Mol Cell Biol. 2008)。この血糖推移はヒトが 2 型糖尿病を発症する際と同様であり、 β TSC2KO は日本人の 2 型糖尿病モデルマウスになりうると考えている。さらに我々の研究室ではこれまでに、 β TSC2KO が高血糖になり糖尿病を発症する際、mTORC1 の活性化を介してインスリンシグナルの減弱化やオートファジー障害が起こっていることを報告している。以上の結果では、 β 細胞の増殖低下やアポトーシス亢進が β 細胞量に大きく寄与していることが明らかになっているが、 β 細胞分化に mTORC1 活性がどのような役割を担っているかは不明のままであった。

2. 研究の目的

膵 β 細胞における mTORC1 活性化が膵 β 細胞量減少に寄与していることは、我々を含め複数の研究室から報告されており、確かな現象であると考えられる。一方、膵 β 細胞量減少の機序としては、アポトーシス亢進と増殖能低下が知られているが、分化に関する検討はこれまで報告されていない。近年、膵 β 細胞量減少において膵 β 細胞脱分化が重要であることが明らかになっており、膵 β 細胞における mTORC1 活性亢進が、脱分化と関連している可能性を考えた。そこで本研究計画では、膵 β 細胞における mTORC1 活性亢進が膵島の分化に及ぼす影響について検討することを目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

マウス

2型糖尿病モデルマウスとして、膵β細胞特異的にCreが発現するIns-CreマウスとTSC2 floxedマウスを交配して膵β細胞特異的TSC2ノックアウトマウス(βTSC2KO)を作製した。対照(Control)としてTSC2 flox/floxマウスを使用した。βTSC2KOとControlの血糖値と体重を10週齢から測定し、β細胞量やα細胞量の変化を観察した。またインスリンが発現した細胞でのみYFPが継続的に発現するように、R26R YFPマウスとβTSC2KOを交配し、βTSC2KO・YFPマウスとして、TSC2(flox/flox)YFP(YFP+)Cre+を作成した。対照(Control)として、TSC2(flox/+)YFP(YFP+)Cre+を使用した。マウスのジェノタイピングは尻尾から抽出したDNAを用いてPCRにより確認した。

免疫染色

解剖で摘出したマウスの膵臓に対して、4% paraformaldehyde (PFA)で固定し、パラフィン切片にした。また、PFAで固定した膵臓をOTCコンパウンドを用いて凍結切片にした。インスリン・グルカゴン染色では、賦活化処理はせず、blocking one histo(ナカライ)でブロッキングをした。一次抗体は抗インスリン(DAKO)、抗グルカゴン(Sigma)を使用し、二次抗体にはFITCまたはCy3標識抗マウス・モルモット抗体(Jackson Immuno Research)を用いた。

RNAseq

βTSC2KOの膵島単離を行い、RNA抽出を行った。RNA抽出はRNeasy Plus Mini Kit(QIAGEN)を用いて行った。RNAサンプルは18μl使用し、Macrogen Japanに解析を依頼した。

統計解析

データ分析にはスチューデントのt検定を使用した。統計的に有意差を示すために、 $p < 0.05$ の閾値を使用した。 $p < 0.05$ なら*、 $p < 0.01$ なら**と示した。

4. 研究成果

日本人の膵島におけるmTORC1活性を免疫染色で確認したところ、2型糖尿病患者で明らかに活性が亢進していた(図1)。ControlとβTSC2KOの血糖値を比較すると、Controlは140mg/dL前後で維持していたのに対し、βTSC2KOは45週齢頃までは100mg/dL程度とControlよりも低く、その後45週齢以降から60週齢にかけて血糖値が上昇した。10週齢、40週齢、60週齢についてのβ細胞量、α細胞量を比較すると、血糖値が上昇していない10週齢から40週齢にかけて既にβ細胞量減少を認めた。血糖値の上昇後40週齢から60週齢にかけてさらにβ細胞量は減少し、α細胞も60週齢において減少した。そこでβ細胞量減少の機序を解明するべく、分化に関する検討を行った。膵臓内分泌4ホルモン(インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、PP)とクロモグラニンAの免疫染色を行った(図2)。Controlでは、4ホルモンとクロモグラニンAが共染するのに対して、βTSC2KOではクロモグラニンA陽性、4ホルモン陰性細胞が確認された。

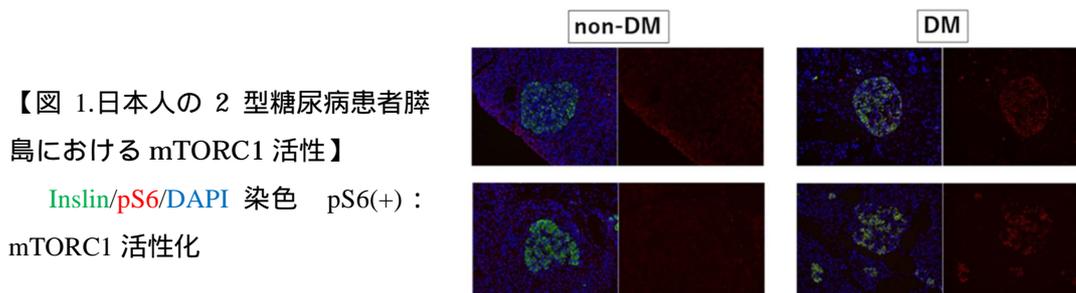
45 週齢のマウスにアミラーゼ・クロモグラニン A 染色を行った。Control ではアミラーゼとクロモグラニン A が染め分けられる一方、 β TSC2KO では共染が確認された。強拡大でも周囲の外分泌腺よりは淡いものの、Control と比較してアミラーゼが発現する膵島を認めた。また、膵島でのアミラーゼ発現の経過を観察すると、10 週齢においてアミラーゼ染色では Control と β TSC2KO に差は認められない。しかし β TSC2KO では、40w はアミラーゼが弱く発現し、60w では周囲の外分泌腺と同程度に発現する(図 3)。

そこで膵島に発現したアミラーゼ陽性細胞の由来を検討するべく、アミラーゼの転写因子である Ptf1a に注目した。40 週齢のマウスにクロモグラニン A・Ptf1a 染色を行ったところ、 β TSC2KO でのみクロモグラニン A と Ptf1a の共陽性細胞が認められた(図 4)。また 10 週齢のマウスに関しても、クロモグラニン A・Ptf1a 染色を行ったところ、40 週齢と同様に β TSC2KO のみ共染していた。よって β TSC2KO の膵島では早期から内分泌細胞で Ptf1a が発現している。

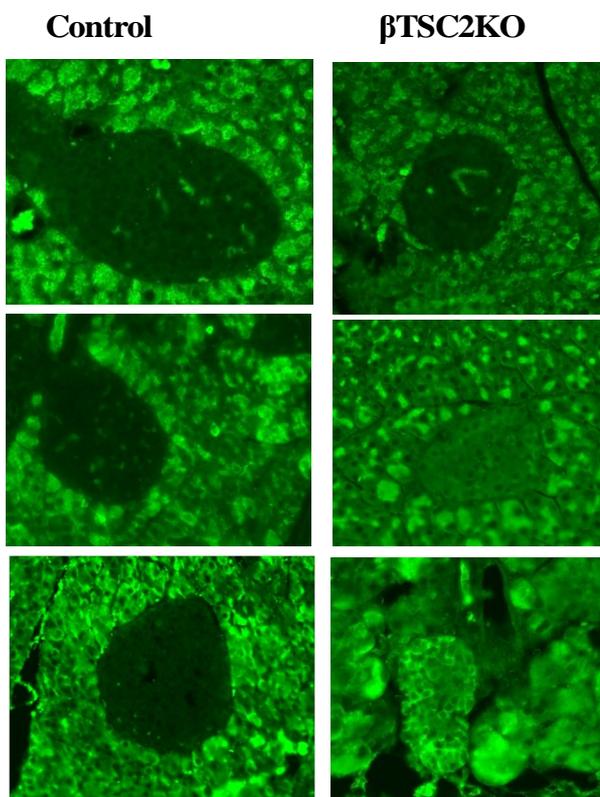
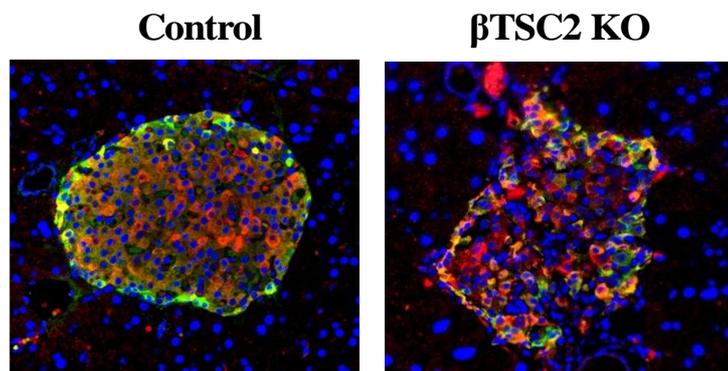
次にインスリンが発現した細胞でのみ YFP が継続的に発現する Lineage-tracing 法を用いて、 β 細胞の追跡を行った。10 週齢のマウスを YFP・Ptf1a 染色を行ったところ、Control では染め分けられたのに対し、 β TSC2KO では共染していた。また、45 週齢のマウスを YFP・アミラーゼ染色を行ったところ、Control では染め分けられたのに対し、 β TSC2KO では共染していた。よって、 β TSC2KO 膵島における Ptf1a 陽性、アミラーゼ陽性細胞は β 細胞由来と確認できた。

次に低週齢で起きていることを確認するべく、10 週齢 β TSC2KO の膵島を用いて、RNAseq を行った。すると、膵 β 細胞の成熟に関するマーカーが低下していた。なかでも転写因子である PDX1、NKX6.1、MafA に注目し、免疫染色を行った。Control と比較し、 β TSC2KO の膵島では、PDX1、NKX6.1、MafA の陰性細胞が増加していた。よって β TSC2KO の β 細胞では成熟マーカーが低下していると考えられた。

先述のような β 細胞の変化の直接的な原因を探るため、 β TSC2KO に mTORC1 阻害剤であるラパマイシンを投与した。10 週齢で解剖し、クロモグラニン A・Ptf1a 染色、pS6・インスリン染色を行った。ddH₂O 投与群では、これまでの結果と同様、 β TSC2KO でのみクロモグラニン A と Ptf1a の共陽性細胞を認めた。しかし、ラパマイシンを投与し、mTORC1 活性が阻害された β TSC2KO 膵島では Ptf1a 発現が認められず、ddH₂O 投与 Control と類似した染色結果が得られた。60 週齢のマウス膵島を電子顕微鏡で詳細に解析したところ、 β TSC2KO の β 細胞では、インスリン顆粒の減少、膜状構造を伴う正体不明の顆粒、小胞体の拡張、ミトコンドリアの膨化などを認めた。

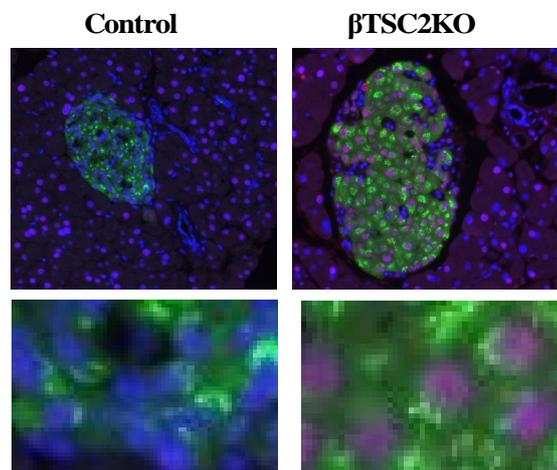


【図 2. 4Holumon(Insulin, Glucagon, somatostatin, PP/ Chromogranin A/DAPI 染色】
膵島内分泌 4 ホルモン発現の比較



【図 3. Amylase 染色】
10、40、60 週齢でのアミラーゼ発現の検討(20 倍率)

【図 4. ChromograninA/Ptfla/DAPI 染色】
40 週齢でのクロモグラニン A、Ptfla 発現の検討
(上段；弱拡大、下段；強拡大)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ihara Y, Asahara SI, Inoue H, Seike M, Ando M, Kabutoya H, Kimura-Koyanagi M, Kido Y.	4. 巻 69
2. 論文標題 Chlorogenic Acid and Caffeine in Coffee Restore Insulin Signaling in Pancreatic Beta Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kobe J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 E1-E8
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 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 Seike M, Asahara SI, Inoue H, Kudo M, Kanno A, Yokoi A, Suzuki H, Kimura-Koyanagi M, Kido Y, Ogawa W.	4. 巻 652
2. 論文標題 l-Asparaginase regulates mTORC1 activity via a TSC2-dependent pathway in pancreatic beta cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 121-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.02.035. Epub 2023	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 Han G, Takahashi H, Murao N, Gheni G, Yokoi N, Hamamoto Y, Asahara SI, Seino Y, Kido Y, Seino S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Glutamate is an essential mediator in glutamine-amplified insulin secretion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 920-930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13497.	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 Murata S, Ono R, Yasuda H, Tanemura R, Kido Y, Kowa H.	4. 巻 24
2. 論文標題 Effect of a Combined Exercise and Cognitive Activity Intervention on Cognitive Function in Community-dwelling Older Adults: A Pilot Randomized Controlled Trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phys Ther Res.	6. 最初と最後の頁 112 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1298/ptr.E10057.	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 Asakawa T, Onizawa M, Saito C, Hikichi R, Yamada D, Minamidate A, Mochimaru T, Asahara SI, Kido Y, Oshima S, Nagaishi T, Tsuchiya K, Ohira H, Okamoto R, Watanabe M.	4. 巻 56
2. 論文標題 Oral administration of D-serine prevents the onset and progression of colitis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 732-745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01792-1.	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 Asahara SI, Inoue H, Kido Y.	4. 巻 46
2. 論文標題 Regulation of Pancreatic β -Cell Mass by Gene-Environment Interaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes Metab J.	6. 最初と最後の頁 38-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4093/dmj.2021.0045.	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 Asahara S, Inoue H, Watanabe H, Kido Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Roles of mTOR in the Regulation of Pancreatic β -Cell Mass and Insulin Secretion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12050614	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	浅原 俊一郎 (Asahara Shun-ichiro) (00570342)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	

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