

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659472

研究課題名（和文）

非妊娠時におけるセロトニンを介した膵β細胞増殖制御の可能性の探索

研究課題名（英文）

Regulation of the pancreatic beta-cell proliferation during non-pregnant period.

研究代表者

綿田裕孝 (WATADA HIROTAKA)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60343480

研究成果の概要(和文)：妊娠期には、インスリン抵抗性の悪化に伴い、膵β細胞容量がごく短期間のうちに代償的肥大をきたす。申請者らは、この妊娠期の代償的膵β細胞量増加に中心的な役割をはたすメカニズムとして、セロトニン産生を介する膵β細胞増殖機構を報告した(Kim H. et al Nat Med 16:804-808, 2010)。このシグナル経路が、妊娠時以外で機能することは、今まで報告されていないが、我々は最近Rip(rat insulin promoter)-Creマウス(Magnuson (Vanderbilt University)作製)では定常状態においても膵ラ氏島にセロトニンが高発現していることを見出した。この機序の解明に関して、他の膵β細胞にCreが強発現する。Rip-Cre line (Herrera P. (University of Geneva)ら作製)やPDX-1-Cre line (Gu G. (Vanderbilt University)ら作製)を入手し、各マウスの膵β細胞におけるセロトニンの発現を調べたが、これらのマウスの膵β細胞には、セロトニンの発現が認められなかった。そこで、Rip-Cre (Magnuson) lineにおけるCreのIntegration site近傍の遺伝子発現の変化がこれらの変化を生んでいる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：During pregnancy, the increase of pancreatic beta cell mass is observed to compensate for insulin resistance. In this regard, we reported that increased production of serotonin in pancreatic beta cells elicits the proliferation of pancreatic beta cells (Kim H. et al Nat Med 16:804-808, 2010), however there have been no reports showing the expression of serotonin in pancreatic beta cells in non-pregnant period. Recently, we found the expression of serotonin in pancreatic beta cells in RIP (rat insulin promoter)-Cre mouse generated by Dr. Magnuson's group in non-pregnant period. However, we found no serotonin expression in beta cells in another line of RIP-Cre mice generated by Dr. Herrera's mice and PDX-1 Cre mice. These results suggest that the change of the expression of the gene located near the integration site of Cre in RIP-Cre mouse generated by Dr. Magnuson's group may cause the change of the expression of serotonin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常、膵β細胞、セロトニン、妊娠

1. 研究開始当初の背景

妊娠時は、様々なホルモン分泌動態の変化の結果、母体にインスリン抵抗性が出現する。母体は、このインスリン抵抗性を代償するために、膵β細胞の機能と細胞数を増加させる。しかし、妊娠時におけるこの膵β細胞容積増加の分子メカニズムは長らく不明であった。

申請者らは、最近、妊娠マウス及び非妊娠マウスの膵ラ氏島に発現する遺伝子量を網羅的に解析し、妊娠マウスの膵ラ氏島ではセロトニン合成酵素である Tryptophan Hydroxylase (Tph) の発現が増加することを見出した。この機序と意義を解明したところ、最終的に、妊娠期に血中で増加するプロラクチンが膵β細胞に作用し、セロトニン合成酵素である Tryptophan Hydroxylase (Tph) の発現を増加させる。その結果、膵β細胞内でトリプトファンを原料としてセロトニンが産生、分泌され、これが膵β細胞にオートクライン、パラクライン的に作用し、少なくとも一部には、5-HT_{2b} 受容体の活性化を介して、膵β細胞の増殖が亢進するという一連のシグナルカスケードが妊娠期の膵β細胞容積増加反応を司っていることを解明した (Kim H. et al Nat Med 16:804-808, 2010)。

このシグナル経路の普遍性、すなわち、このシステムが妊娠以外の局面においても膵β細胞増殖に関与しうるかどうか、興味もたれる点である。そうした中で我々は、偶然にも膵β細胞において Cre を発現するマウス (Rip-Cre) の膵β細胞がセロトニンを高発現していることを見出した。この事実は、このシグナル経路の少なくとも一部が非妊娠時の膵β細胞においても活性化しうることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、セロトニンを介した膵β細胞量調節機構が非妊娠時においても機能する可能性を探るとともに、Rip-Cre モデルと妊娠モデルの相違を解析することにより、セロトニンを介した膵β細胞増殖シグナル経路の詳細を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Rip-Cre マウスがセロトニンを高発現するメカニズムの解明

以下の写真に示すように、我々は最近

Rip (rat insulin promoter)-Cre マウスでは定常状態においても膵ラ氏島にセロトニンが高発現していることを見出した。

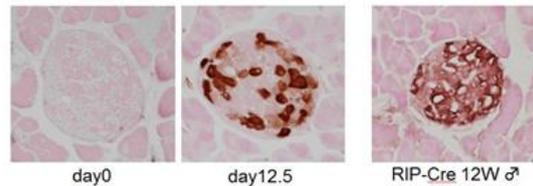


図 1: 膵ラ氏島の Serotonin 染色左から順に非妊娠の母マウス, 妊娠 12.5 日の母マウス, Rip-Cre マウス (12 週齢) の膵組織を抗セロトニン抗体を用いて染色した。

これに関して、他の Rip-Cre line (Herrera P. (University of Geneva) ら作製) や PDX-1-Cre line (Gu G. (Vanderbilt University) ら作製、このラインでも膵β細胞に Cre が強発現する。) を入手し、各マウスの膵β細胞におけるセロトニンの発現量を調べる。その結果、全ての line にセロトニンの発現が認められる場合には、Cre 自体が未だ、明らかにされていないメカニズムにより Tph1 遺伝子の発現を誘導している可能性が考えられる。このメカニズムを更に解明する目的で、膵β細胞株や単離膵島に Cre を強制発現し、セロトニン合成が認められるかを観察する。この際、このメカニズムの背景には、膵β細胞である種の蛋白質を過剰発現させることによる、たとえば ER ストレス等の誘導が、セロトニン産生を活性化している可能性もあることは常に考慮する。すなわち、その他のタンパクの強制発現というコントロールは必ず設置する。

一方、Rip-Cre (Magnuson) のみにセロトニンの発現が認められる場合には、この line における Cre の integration site を同定し、その Integration site の近傍の遺伝子を同定する。

申請者らは、すでに、Rip-Cre (Magnuson) を homozygote にすると、耐糖能が極めて悪化することを見出しており、Cre の integration site 近傍の遺伝子が Tph 遺伝子の発現調節にかかわる遺伝子であると同時に、膵β細胞機能維持に必須な遺伝子である可能性があると考えている。

2) Rip-Cre マウスと妊娠マウスを比較し、

セロトニン合成促進から膵β細胞増殖にいたるシグナル伝達経路、すなわち、プロラクチン→プロラクチン受容体→Tph↑→セロトニン分泌↑→5-HT2b 受容体→細胞増殖↑の相違を詳細に検討し、その結果、非妊娠時の膵β細胞増殖に最低限必要な分子を同定する。

申請者らは、これまでも、Rip-Cre マウスの膵β細胞容積を Wild type のものと比較し膵β細胞容積に変化が認められないことを見出している。したがって、セロトニンが発現するのみでは、膵β細胞容積増加はおこらないことは、確認している。したがって、膵β細胞容積増加には、その他のシグナルの増強が必要であることがわかる。

そこで、Rip-Cre マウスと妊娠マウスの単離膵ラ氏島を用いた実験や組織染色を用いることで、セロトニン分泌↑→5-HT2b 受容体→細胞増殖↑にかかわるタンパク発現、遺伝子発現を比較し、その違いを解析する。予測としては、野生型マウスの膵β細胞では、その増殖に関与しうる特異的なセロトニン受容体 (5-HT2b 受容体等) が発現していない可能性が最も考えやすいが、その他、それに、関わる因子のタンパク発現、遺伝子発現も検討する。その結果、プロラクチン→プロラクチン受容体→Tph↑→セロトニン分泌↑→5-HT2b 受容体→細胞増殖↑系の欠陥因子が明らかになれば、その遺伝子を膵β細胞に恒常的に発現するトランスジェニックマウスと膵β細胞に Tph1 を恒常的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、これらのマウスを掛け合わせることで膵β細胞容積増加が認められるかどうかを解明する。

活性化させ、肺動脈血管平滑筋細胞の増殖に関与することが報告されている。また、我々は、非妊娠時と妊娠 12.5 日目のマイクロアレイのデータの比較で、5-HT1b 受容体発現が妊娠期に増加することも確認している。さらに妊娠期間中の変化は認めないものの、膵島に SERT が発現していることも確認している。

4. 研究成果

Rip-Cre マウスの膵ラ氏島を単離し、Tph1, Tph2 の発現レベルを定量的PCR法を用いて評価したところ、コントロールの C57BL/6 マウスの膵島に比し、有意に高い Tph 遺伝子の発現が観察された。以上の観察より、Rip-Cre マウスでは定常状態においても、少なくとも Tph↑ → セロトニン分泌↑ という経路が活性化されていることが明らかとなった。

その後、これに関して、他の Rip-Cre line (Herrera P. (University of Geneva)ら作製) や PDX-1-Cre line (Gu G. (Vanderbilt

University)ら作製、このラインでも膵β細胞に Cre が強発現する。)を入手し、各マウスの膵β細胞におけるセロトニンの発現量を調べた。その結果、他のラインにはセロトニンの発現は認めず、Rip-Cre (Magnuson) のみにセロトニンの発現が認められた。そこで、現在、Cre の integration site の同定を行っているところである。

この研究の途中で mouse insulin promoter driven GFP トランスジェニックマウスを入手したため、このマウスの膵β細胞におけるセロトニン発現を調べると興味深いことに、セロトニンの発現が認められた。したがって、確立から考えると、Integration site の問題ではなく、不明なメカニズムで膵β細胞にセロトニンの発現が認められることが明らかとなった。したがって、研究方法 (2) に関しては、十分な検討を行うことができなかった。

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5件)

1. 豊福優希子, 綿田裕孝: 妊娠による膵β細胞機能、容積変化のメカニズム. 内分泌・糖尿病・代謝内科, 32:197-203, 2011
2. 綿田裕孝, 豊福優希子, 内田豊義: セロトニンによる妊娠時の膵β細胞機能・容積変化のメカニズム. 実験医学, 29:1226-1232, 2011
3. 綿田裕孝, 豊福優希子, 内田豊義: 妊娠に伴う膵β細胞増殖のメカニズム. Diabetes Journal: 糖尿病と代謝, 39:193-199, 2011
4. 豊福優希子, 内田豊義, 綿田裕孝: 妊娠時の膵β細胞機能における新知見. Daiabetes Frontier, 23:407-412, 2012
5. 豊福優希子, 内田豊義, 綿田裕孝: 膵β細胞の分子増殖: 妊娠時の膵β細胞. Islet equality, 1:20-24, 2012

[学会発表] (計1件)

1. 豊福優希子, 内田豊義, 藤谷与士夫, 田蒔基行, 小宮幸次, 河盛隆造, 綿田裕孝: 妊娠期の膵β細胞増殖とセロトニン. 第84回日本内分泌学会学術集會口演 2011. 4. 21-23

[その他]

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/taisya_naibunpitsu/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綿田裕孝 (WATADA HIROTAKA)

順天堂大学・医学研究科・教授

研究者番号：60343480

(2) 研究分担者

豊福 優希子 (TOYOFUKU YUKIKO)

順天堂大学・医学研究科・研究員

研究者番号：70598078