

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591330

研究課題名(和文) 誘導性細胞標識システムを利用した膵細胞分化・再生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of pancreatic beta-cell differentiation and regeneration using inducible cell labeling system

研究代表者

南 幸太郎 (MIYAMOTO, KOHTARO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80334176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、誘導性細胞標識システムを用いてマウスの膵細胞を選択的に標識し追跡することによってその運命追跡を行った。アロキサン糖尿病マウスにおけるヒトGLP-1受容体作動薬リラグルチドの作用をモデル系として、膵細胞の機能と量を改善する仕組みを解析した結果、GLP-1シグナルの活性化が増殖を促進して細胞死を抑制するが、新生は誘導しないことを見出した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we chased the fate of pancreatic beta cells by utilizing inducible cell labeling system. In alloxan-induced diabetic mice, the human GLP-1 receptor agonist liraglutide restored function and mass of beta cells. Liraglutide increased beta cell proliferation and decreased beta cell death, but did not induce neogenesis of beta cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病 糖代謝異常

1. 研究開始当初の背景

再生医療は、不可逆的な損傷を受けた組織・細胞を、何らかの方法で新たな組織・細胞で置換して治癒しようとするものである。糖尿病では、膵臓をまるごと再生する必要はなく、インスリンを分泌する膵β細胞さえ再生できれば、高血糖を是正して深刻な合併症を阻止することが可能であるので、再生医療に対する期待は大きい。膵β細胞はきわめて大量のインスリンを産生・蓄積し、血糖の上昇に伴い、必要に応じてインスリンを分泌する機能を有する高度に分化した細胞である。糖尿病の細胞移植治療に応用可能な再生膵β細胞は、実際の膵β細胞と質的にも量的にも同等の機能を獲得している必要があるにもかかわらず、過去の多くの再生膵β細胞に関わる研究では、新たに誘導された細胞のインスリン分泌機能の詳細についてはほとんど解析されてこなかった。研究代表者らは、膵島移植の副産物として大量に入手することができる膵腺房細胞に着目し、世界で初めて膵β細胞と質的には同等のインスリン分泌機能を有する細胞を *in vitro* で誘導することに成功した (Minami et al, PNAS, 102:15116, 2005; Okuno, Minami et al, AJP, 292:E158, 2007)。さらに、膵腺房細胞からインスリン分泌細胞への分化転換メカニズムの一端を解明する (Minami et al, JBC, 283:13753, 2008) とともに、ヒトの膵外分泌細胞からもインスリン分泌細胞が誘導できることも示した (Minami et al, JDI, 2:271, 2011)。しかし、これまでにデータが報告されたほぼ全ての再生膵β細胞は、実際のβ細胞と比較してインスリン産生能が低く、生理的刺激に対するインスリン分泌応答も不十分で、移植医療に用いるための実用的なレベルには達していないと判断される。これらの問題点を克服するために、実際の膵β細胞が分化過程でどのようにして精密なインスリン分泌機能を獲得するのかを理解することが不可欠であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、誘導性 Cre/loxP システムに基づく膵β細胞標識モデルマウスを用いて、その分化・増殖・再生過程を比較解析することによって、膵β細胞がどのようにインスリン分泌機能を獲得して成熟した細胞に分化・再生するのか、アロキササン糖尿病モデルにおけるヒト GLP-1 受容体作動薬リラグルチドの効果を解析することにより、その一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウスインスリン2遺伝子座にタモキシフェン誘導性に Cre を発現する遺伝子を導入したノックインマウス (Ins2-CreER) と、ROSA26 遺伝子座に YFP を導入したノックインマウス (R26R-YFP) を交配した Ins2CreER/R26R-YFP ダブルノックインマウス

スを作成した。6週齢の雄性 Ins2-CreER/R26R-YFP マウスに、タモキシフェンを2週間かけて5回投与し膵β細胞を標識した。その10日後、尾静脈よりアロキササンを60 mg/kg の用量で投与し、翌日の血糖値が300 mg/dl 以上のマウスを実験に用いた。アロキササン投与翌日 (Day 0) から、体重1 kg あたり200 μg のリラグルチドを30日間一日一回皮下投与し、コントロール群として生理食塩水を投与した。リラグルチドは糖尿病治療薬としてすでに市販されており、インスリン分泌促進作用に加えて膵β細胞に対する保護作用、増殖作用があることが示唆されている。体重、摂餌量、血糖値、血清インスリンおよび血清グルカゴンを経時的に測定するとともに、Day 0、Day 15 および Day 30 で膵臓を摘出して免疫組織化学的検討を行った。膵β細胞量、YFP 標識率、細胞死、細胞増殖を定量化した。また経口糖負荷試験により膵β細胞機能の評価を行った。

4. 研究成果

アロキササン投与後、コントロール群では30日間に渡って体重増加が抑制された。リラグルチドの連日投与によっても体重に有意な差は生じなかった (図1A)。一方、摂餌量はリラグルチド群でコントロール群と比較すると、全体として低下する傾向が認められた (図1B)。随時血糖値はアロキササン投与翌日には600 mg/dl 前後まで急激に上昇し、コントロール群ではその後も持続的な血糖値の上昇が認められた。リラグルチド群においては血糖値の上昇が抑制され、17日目以降ではコントロール群と比較して有意に低い血糖値を示した (図1C)。血清インスリン値はリラグルチド群でコントロール群と比較して15日目では高い傾向を示し、30日目には有意に高値を示した (図1D)。

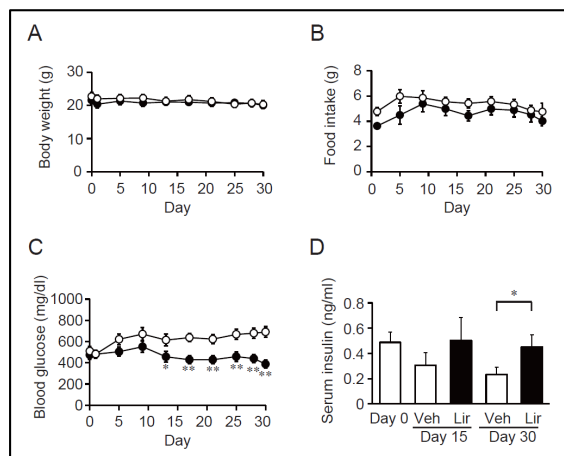


図1. 体重(A)、摂餌量(B)、随時血糖値(C)、血清インスリン値(D)の変化

*P<0.05; **P<0.01 (t-test)

アロキササン投与マウスでは経口糖負荷試験におけるインスリン分泌不全に伴う耐糖能の著しい低下が認められるが、リラグルチ

ドの投与によってインスリン分泌反応が回復し、耐糖能も改善した(図2)。

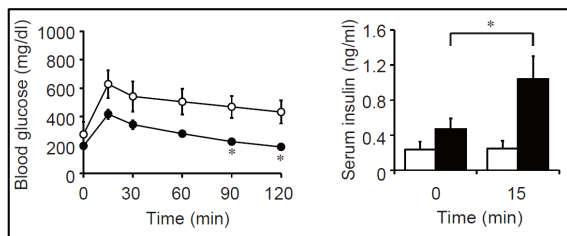


図2. 経口糖負荷試験における血糖値とインスリン値の推移

*P<0.05 (t-test)

血中のインスリン濃度の増加は、膵β細胞からのインスリン分泌量の増加のみならず、膵β細胞自体の量の増加によっても生じ得る。本研究では、膵β細胞量に着目して検討を加えた。膵β細胞量は膵臓全体の面積に対するインスリン陽性細胞部分の面積の割合に、膵臓の重量を乗じることによって算出した。その結果、膵β細胞量は、リラグルチド群においてコントロール群と比較して、15日目では増加傾向を、30日目では有意に高い値を示した(図3)。この結果は、リラグルチドが膵β細胞量を増加(あるいは維持)することによって、血清インスリン値を増加させた可能性を示唆している。

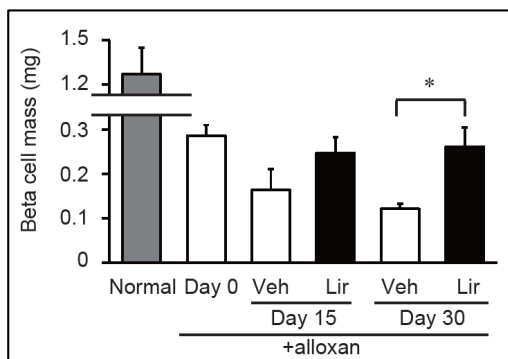


図3. 膵β細胞量

*P<0.05 (t-test)

膵細胞量が増加したメカニズムとして、1) 既存の膵β細胞の自己複製、2) 膵β細胞の細胞死と、3) 非β細胞(幹/前駆細胞など)からの新生について解析することとした。まず、既存の膵β細胞の自己複製に対するリラグルチドの影響を、Ki67の免疫染色によって評価した。コントロール群では、Ki67陽性の膵β細胞(インスリン陽性細胞)は0.2%程度であったが、リラグルチド投与15日目では4倍近くまで有意に増加した(図4)。

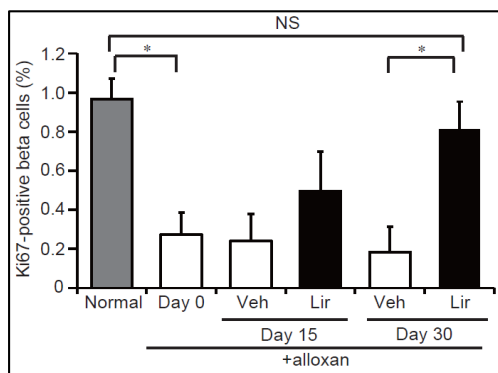


図4. 膵β細胞の増殖

*P<0.05 (t-test)

次に、膵β細胞の細胞死をTUNEL法によって検討した。その結果、TUNEL陽性の膵β細胞の割合はコントロール群では約2.5%に達したが、リラグルチド群では有意に低い値を示した(図5)。このことからリラグルチドは、アロキサン糖尿病マウスモデルにおいて、膵β細胞の細胞死を強く抑制することが判明した。

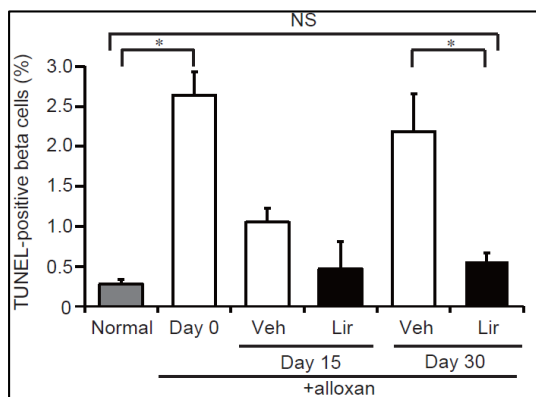


図5. 膵β細胞の細胞死

*P<0.05 (t-test)

さらに、非β細胞(幹/前駆細胞など)からの新生に対するリラグルチドの効果を検討した。この目的のため、YFPで標識された膵β細胞の割合の推移を解析した。Ins2-CreER/R26R-YFPマウスでは、タモキシフェンの投与によってインスリンを発現する細胞(膵β細胞)でのみYFPを発現することができる。タモキシフェン投与直後のYFP標識膵β細胞の割合を基準として、追跡後にその割合が減少した場合には、もともとインスリンを発現していなかった細胞がインスリンを発現するようになった、すなわち新生が生じたと判断できる。一方、標識率の変化がなかった場合には、新生は生じておらず、自己複製のみで細胞量が増加したものと推測できる。実際にYFPとインスリンの二重免疫染色を行ったところ、リラグルチド投与前には、約33%の膵β細胞がYFP標識されていた。コントロール群、リラグルチド群ともに30日後に至っても、その標識率に有意な変化

は認められなかった(図6)。以上の結果から、アロキサン糖尿病マウスモデルにおいては、リラグルチド投与によって膵β細胞の新生はほとんど生じないものと考えられた。

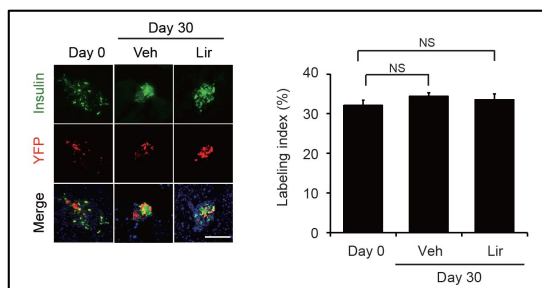


図6．膵β細胞の新生

アロキサンは膵細胞に取り込まれると酸化ストレスを発生して細胞障害を引き起こすことが知られている。また、持続的な高血糖も膵細胞における酸化ストレスを増大させる。実際に、本研究で用いたマウスでも酸化ストレスマーカーである4-HNEの増加が認められた。リラグルチドを30日間連日投与すると、アロキサンと高血糖で引き起こされた膵細胞の酸化ストレスを軽減することが明らかとなった(図7)。この時、膵細胞の機能と量の維持に關与する転写因子であるPdx1とFoxO1の発現も回復することが認められ、リラグルチドがアロキサンと高血糖によって障害された膵細胞を正常化していることが示唆された。

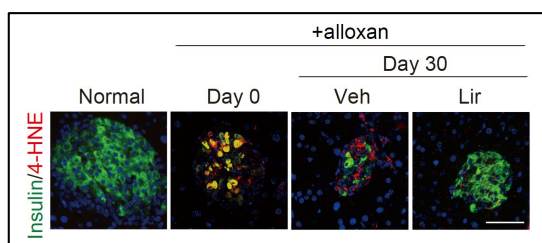


図7．膵島における酸化ストレスの検出

糖の再吸収阻害作用を持つ利尿薬のフロリジンをを用いると、インスリン作用などの影響なく血糖値をコントロールすることができる。そこで、フロリジンによってリラグルチドと同様の血糖コントロールを行って、膵細胞への効果を検討したが、糖負荷後のインスリン分泌機能も膵細胞量も回復することはなかった。したがって、リラグルチドの膵細胞に対する効果は、血糖値の改善による二次的な影響だけでは説明することはできず、直接的な作用があると考えられた。さらに、本研究で認められたリラグルチドの効果は、薬剤投与終了後少なくとも2週間は持続することが判明した。

以上の結果から、GLP-1受容体作動薬であるリラグルチドは、アロキサン糖尿病マウスにおいて、膵細胞の量と機能を持続的に正

常化し糖尿病状態を改善することが示唆された。さらに本研究では、膵β細胞を選択的かつ不可逆的に蛍光標識するマウスモデルを用いて、初めて膵β細胞の自己複製と非β細胞からの新生を区別してGLP-1受容体作動薬の効果解析することができた。その結果、少なくとも本研究で用いた条件下ではリラグルチドは、膵β細胞の新生に対して有意な効果を発揮しないことが示された。今後、膵β細胞内でどのような変化が生じて細胞増殖や細胞保護に結びついているのかを詳細に検討するとともに、インスリン分泌機能に対する効果についても十分な解析を実施することが、膵細胞機能の獲得、維持機構を理解するうえで重要である。

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12件)

英文(査読有)

- 1) Tamura K, Minami K, Kudo M, Iemoto K, Takahashi H, Seino S. Liraglutide improves pancreatic beta cell mass and function in alloxan-induced diabetic mice. *PlosOne*, in press (Co-corresponding Author)
- 2) Nukaya D, Minami K, Hoshikawa R, Yokoi N, Seino S. Preferential gene expression and epigenetic memory of induced pluripotent stem cells derived from mouse pancreas. *Genes Cells*, in press (Co-corresponding Author)
- 3) Ghenni G, Ogura M, Iwasaki M, Yokoi N, Minami K, Nakayama Y, Harada K, Hastoy B, Wu X, Takahashi H, Kimura K, Matsubara T, Hoshikawa R, Hatano N, Sugawara K, Shibasaki T, Inagaki N, Bamba T, Mizoguchi A, Fukusaki E, Rorsman P, Seino S. Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion. *Cell Rep*, 9(2):661-673, 2014
- 4) D'Hoker J, De Leu N, Heremans Y, Baeyens L, Minami K, Lavens A, Chintinne M, Stangé G, Magenheimer J, Swisa A, Martens G, Pipeleers D, van de Castele M, Seino S, Keshet E, Dor Y, Heimberg H. Conditional hypovascularization and hypoxia in islets does not overtly influence adult beta cell mass and function. *Diabetes* 62(12):4165-4173, 2013
- 5) Seino Y, Miki T, Fujimoto W, Lee EY, Takahashi Y, Minami K, Oiso Y, Seino S. Cephalic phase insulin secretion is K_{ATP} channel-independent. *J Endocrinol*, 218(1):25-33, 2013

- 6) Minami K. GATA transcription factors: new key regulators in pancreas organogenesis. (Commentary) *J Diabetes Invest* 4(5):426-427, 2013 (Corresponding Author)
- 7) Minami K. Searching for stem cells in the adult pancreas: A futile effort? (Editorial) *J Diabetes Invest* 4(4):331-333, 2013 (Corresponding Author)
- 8) Minami K., Seino S. Current status of regeneration of pancreatic β -cells. *J Diabetes Invest* 4(2):131-141, 2013 (Co-corresponding Author)

和文 (査読無)

- 9) 南幸太郎: 膵再生、肝胆膵 70(3):441-446, 2015
- 10) 南幸太郎: 膵臓の分化・再生研究の最前線、日本消化器学会誌 111(8):1543-1549, 2014
- 11) 南幸太郎: 膵腺房細胞から膵細胞への分化転換、胆と膵 35(4): 333-338, 2014
- 12) 南幸太郎: 膵 β 細胞の機能分化と再生誘導、腎と透析 75(2): 263-267, 2013

[学会発表] (計 2 4 件)

国際学会

- 1) Minami K., Nukaya D, Hoshikawa R, Yokoi N, Seino S. Preferential expression of liver specific genes and epigenetic memory of induced pluripotent stem cells derived from mouse exocrine pancreas. 10th IDF-WPR Congress 2014/6th AASD Scientific Meeting (Suntec, Singapore), 2014.11.21
- 2) Tamura K, Minami K., Takahashi H, Kudo M, Seino S. Effect of liraglutide on beta-cell mass and function in alloxan diabetic mice. 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Vienna, Austria), 2014.9.18
- 3) Tamura K, Minami K., Takahashi H, Kudo M, Kitanoya H, Seino S. Evaluation of the effect of liraglutide on beta cell fate in alloxan diabetic mice by tamoxifen-inducible Cre/loxP system. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Barcelona, Spain), 2013.9.25
- 4) Ghani G, Iwasaki M, Ogura M, Yokoi N, Shibasaki T, Minami K., Seino S. Induction of cAMP responsiveness by formation of pseudoislets. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto (Kyoto, Japan), 2013.4.25

- 5) Kudo M, Minami K., Tamura K, Kitanoya H, Iemoto K, Takahashi H, Seino S. Effect of liraglutide on pancreatic beta-cell mass in alloxan induced diabetic mice. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto (Kyoto, Japan), 2013.4.25
- 6) Tamura K, Minami K., Kudo M, Kitanoya H, Nakamura K, Seino S. Elucidation of postnatal pancreatic beta-cell fate using Ins2-CreER/R26R-YFP double knock-in mice. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto (Kyoto, Japan), 2013.4.23
- 7) Minami K., Kitanoya H, Tamura K, Kudo M, Takahashi H, Seino S. Expression of gastrin in pancreatic islets of a mouse model of beta cell regeneration. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress/4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (Kyoto, Japan), 2012.11.27
- 8) Tamura K, Minami K., Iemoto K, Nakamura K, Seino S. Elucidation of pancreatic beta-cell fate after birthusing Ins2-CreER/R26R-YFP double knock-in mouse. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress/4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (Kyoto, Japan), 2012.11.27
- 9) Ghani G, Iwasaki M, Ogura M, Yokoi N, Shibasaki T, Minami K., Seino S. Critical role of malate-aspartate shuttle in induction of incretin responsiveness by formation of pseudoislets. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress/4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (Kyoto, Japan), 2012.11.27
- 10) Minami K., Kitanoya H, Takahashi H, Seino S. Induction of gastrointestinal hormones in pancreatic islets of a mouse model of beta cell regeneration. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Berlin, Germany), 2012.10.4
- 11) 柴崎忠雄、吾甫尔江艾尼、マヒラアシム、岩崎真宏、星川律子、横井伯英、南幸太郎、清野進：膵細胞の3次元化によるインクレチン/cAMP 応答性の誘導、第87回日本生化学会大会(京都) 2014.10.16
- 12) 南幸太郎：膵細胞の可塑性と再生医療への応用可能性、第4回細胞再生医療研究会(神戸) 2014.7.27
- 13) 南幸太郎、糠谷大樹、前田治代、星川律子、横井伯英、清野進：マウス膵外分泌

- 細胞からの iPS 細胞の樹立と特性解析、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会(大阪) 2014.5.22
- 14) 田村香楠子、南幸太郎、高橋晴美 工藤麻耶、北野谷寿人、清野 進：アロキササン糖尿病マウスにおけるリラグルチドの膵 細胞に対する効果、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 (大阪) 2014.5.22
- 15) 吾甫尔江艾尼、横井伯英、星川律子、山口拓郎、岩崎真宏、小倉雅仁、南幸太郎、柴崎忠雄、清野進：膵 細胞におけるグルタミン酸動態の代謝フラックス解析、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会(大阪) 2014.5.24
- 16) Ogura M, Iwasaki M, Gheni G, Minami K, Yokoi N, Shibasaki T, Seino S. The role of malate-aspartate shuttle-derived glutamate in incretin-potentiated insulin secretion. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 2013.5.16
- 17) 田村香楠子、南幸太郎、工藤麻耶、北野谷寿人、中村維文、家本啓佑、清野進：Ins2-CreER/R26R-YFP ダブルノックインマウスを用いた出生後における新生膵細胞の運命追跡、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 2013.5.16
- 18) 工藤麻耶、南幸太郎、田村香楠子、北野谷寿人、家本啓佑、高橋晴美、清野進：アロキササン誘導糖尿病マウスの膵β細胞に対するリラグルチドの効果、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 2013.5.16
- 19) 吾甫尔江艾尼、岩崎真宏、小倉雅仁、柴崎忠雄、南幸太郎、清野進：膵β細胞間相互作用によるインクレチン/cAMP シグナル応答性の誘導、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 (横浜) 2012.5.19
- 20) 小倉雅仁、岩崎真宏、吾甫尔江艾尼、南幸太郎、横井伯英、柴崎忠雄、清野進：リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルはインクレチンによるインスリン分泌増強に必須である、インクレチン研究会 (京都) 2013.4.20
- 21) 小倉雅仁、岩崎真宏、吾甫尔江艾尼、南幸太郎、柴崎忠雄、中山泰宗、原田和生、馬場健史、三木隆司、宮崎純一、福崎英一郎、清野進：膵 細胞におけるインクレチン/cAMP シグナルとグルコース代謝の相互作用、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 (横浜) 2012.5.19
- 22) 田村香楠子、南幸太郎、中村維文、家本啓佑、清野進：Ins2-CreER/R26R-YFP ダブルノックインマウスを用いた出生後における膵 細胞の特性分析、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 (横浜) 2012.5.19
- 23) 松原稔哉、三田綾子、南幸太郎、細岡哲也、北澤莊平、高橋健一、田守義和、横井伯英、西村紀、清野進：Progranulin (PGRN): インスリン抵抗性を惹起する新規アディポカイン、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 (横浜) 2012.5.17
- 24) 南幸太郎、清野進：タモキシフェン誘導性細胞標識システムを用いた膵 細胞の運命追跡、第 85 回日本内分泌学会学術総会 (名古屋) 2012.4.21
- 〔図書〕(計 2 件)
- 1) Seino S, Shibasaki T, Minami K. β-cell biology of insulin secretion. International Textbook of Diabetes Mellitus (ITDM), 4th edition. Edited by: Ele Ferrannini, Paul Zimmet, Ralph DeFronzo and George Alberti, Wiley-Blackwell pp.96-107, 2015
- 2) 南幸太郎：膵島の再生医療の実現へ向けて、「膵島の再生医療」 石井秀始編、診断と治療社 pp.136-141, 2015
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
南 幸太郎(MINAMI KOHTARO)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80334176
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし