

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450471

研究課題名(和文)消化管内分泌細胞におけるIA-2ファミリー蛋白質の役割

研究課題名(英文)The role of IA-2 family proteins in the endocrine cells of gastrointestinal tract

研究代表者

五味 浩司(GOMI, Hiroshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90293240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：IA-2ファミリー蛋白質が発現する消化管内分泌細胞をげっ歯類で同定し、細胞成熟度との関連性を示唆した。小腸上皮細胞をex vivo酵素消化で回収後、フォグリンの発現を確認し、消化管内分泌細胞マーカーとしての可能性を示した。連携研究者の鳥居博士(群馬大学)が作製した膵細胞特異的フォグリンノックアウトマウスを解析し、定常時の細胞増殖性に変化がないことやホルモン顆粒のプロテオリシスへの関与を示した。フォグリン結合分子、セクレトグラニンIII(Sg3)の全身的な発現組織を鳥類で解析し、Sg3がプロセッシングにより成熟化するペプチドホルモンや生理活性アミン産生細胞で特異的に発現していることを示した。

研究成果の概要(英文)：IA-2 family proteins (phogrin and IA-2) were identified by immunohistochemistry in the digestive tract of rodents. The difference in expression profile between phogrin and IA-2 seems to be associated with cell maturity or proliferation. The possibility of phogrin as a gastrointestinal endocrine cell marker was suggested from the expression analysis of the intestinal epithelial cells after recovering from ex vivo enzyme digestion. Involvement of phogrin in the proteolysis of insulin granules and no significant change in cell proliferation at steady-state without continuous secretory stimulus were shown by analyzing the tissue of the pancreatic β -cell-specific phogrin KO mouse provided from cooperation researcher, Dr. S. Torii (Gunma Univ.).

A systemic expression profile of secretogranin III (Sg3), one of the phogrin-binding molecule, was analyzed in chicken. Sg3 was specifically expressed in cells that contain mature peptide hormones by prohormone-processing and bioactive amines.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：IA-2ファミリータンパク質 消化管内分泌細胞 フォグリン 分泌顆粒 ペプチドホルモン セクレトグラニン 膵細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) IA-2 ファミリー蛋白質は、フォグリンおよびその相同分子である IA-2 からなり、ペプチドホルモンを含有する内分泌顆粒に局在し、機能している膜蛋白質である。このファミリー蛋白質は、元々1型糖尿病の自己抗原として見つかった分子である背景をもつことから、IA-2 ファミリー分子の発現様式や機能の解析については、膵島組織における知見が蓄積している。

(2) 連携研究者の鳥居らを含む国内外のこれまでの研究から、IA-2 ファミリー蛋白質は1型糖尿病発症への直接的関与は認められてはいないが、膵細胞の増殖促進やホルモン顆粒の細胞内安定化といった生理学的機能への関与が示されている他、下垂体や膵島といった代表的な内分泌組織の細胞や神経組織でその発現が明らかにされている。また、全身性の遺伝子ノックアウトマウスの解析から、神経内分泌機能と関連した複数のフェノタイプとして、膵切除後の膵細胞の増殖に障害があること、膵細胞のインスリン含量の減少、下垂体ゴナドトロフの黄体形成ホルモンの産生低下などが見出されている。

(3) 消化管は消化器官としての生理機能のみならず、身体で最も広範囲に及ぶ内分泌組織であるという側面を有するが、一般的な内分泌腺とは異なり、明確な腺組織を形成せず、異なるホルモンを産生・分泌する細胞が粘膜上皮中に各々単独で分布している。これまでに少なくとも1ダース以上の種類の消化管ホルモンが見出され、それらの機能は広範囲に及んでいる。

(4) これまでに申請者らは、IA-2 ファミリー蛋白質に特異的な抗体(鳥居ら, Diabetes, 58:682, 2009)を用いて、これらの蛋白質がラットの下垂体や膵島のみならず消化管内分泌細胞において発現していることを見出した。しかしながら、消化管内分泌細胞における解析は非常に限られた情報しかなく、マウス胃のソマトスタチン分泌細胞での発現が確認されているにすぎない。

2. 研究の目的

(1) 消化管内分泌細胞における IA-2 ファミリー蛋白質の発現は、これらの分子が消化管内分泌細胞のマーカーとしても有効である可能性が高い。そこで本研究では、ラット・マウスの消化管組織に着目し、消化管内分泌細胞において、IA-2 ファミリー蛋白質が発現する内分泌細胞の同定を行ない、フォグリンと IA-2 の機能的差異あるいは相補的な役割があるのかを明らかにする。

(2) IA-2 ファミリー蛋白質の細胞表面抗体を用いて消化管内分泌細胞を分離し、特異的培養細胞の樹立を目指すために必要な基礎

的知見を得る。

(3) フォグリン欠失内分泌細胞の解析に関して、連携研究者である鳥居博士によって作製されたフォグリンのゲノム上に相同組換え法により loxP 配列を有するコンディショナル系統に膵細胞特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスを交配させることにより得た膵細胞でフォグリン遺伝子を欠失させた細胞を解析し、フォグリンが膵細胞機能にどのように関わっているのかについて知見を得る。

(4) ペプチドホルモン産生細胞におけるホルモン顆粒に局在するフォグリンと相互作用を示すタンパク質の発現解析を行い、フォグリンの機能発現との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) フォグリンおよび IA-2 のポリクローナルおよびモノクローナル抗体を用い、マウス消化管および膵島組織における発現解析を免疫組織化学的に解析し、IA-2 ファミリー蛋白質を発現する内分泌細胞の同定を行う。

(2) フォグリンの消化管内分泌細胞マーカーとしての可能性と腫瘍化抗原を導入後に細胞株の樹立が可能かを検討する目的で、マウスの小腸上皮細胞の *ex vivo* 酵素消化し、回収細胞の同定を行う。

(3) 連携研究者の鳥居博士より、フォグリンノックアウトマウスの膵組織の提供を受け、フォグリン欠失下の内分泌細胞の形態学および生化学的解析を行う。

(4) ペプチドホルモン産生細胞において発現しており、フォグリンとの相互作用が知られているタンパク質であるセクレトグラニン III の発現様式を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 鳥居博士が作製したフォグリンと IA-2 に対するウサギポリクローナル抗体は2つの分子を特異的に識別することができるので、この性質を利用して、フォグリンと IA-2 が発現する消化管内分泌細胞の種類をラット消化管において免疫組織化学的に同定した。IA-2 ファミリー蛋白質は各種消化管ホルモンに対する抗体との二重染色によって唯一グレリンとの共発現は認められなかったが、その他多種のホルモンとは共発現を認めた。フォグリンと IA-2 間ではソマトスタチン、インクレチン (GLP-1, GIP) およびグルカゴン発現細胞の割合が IA-2 において低いことを明らかとなった(五味ら, J. Histochem. Cytochem., 61:156, 2013, Feb.)。また、マウスの消化管組織については、フォグリンのウサギポリクローナル抗体 (MAT2) を用いて解析を行い、ラット消化管組織における所見

とほとんど同等の結果を得た。セロトニン、ソマトスタチンおよびコレキストキニン発現細胞では、ほぼ全ての細胞においてフォグリンのホルモンとの共発現を認められたが、グルカゴン、GLP-1 および GIP 発現細胞では、共発現の程度が弱いまたは認められない細胞もあり、およその陰性率は、グルカゴンで 40%、GLP-1 で 60%、GIP で 90%であった。同様の所見は膵島でも認められた。これらの結果から、フォグリンの発現は細胞の成熟度あるいは増殖性などと関連しているものと考えられた。一方、これらの現象が IA-2 との発現とどのような関連性があるのかについて検討するために、フォグリンのモノクローナル抗体を用いた解析を試みたが、ブアン固定後のパラフィン切片では、MAT2 抗体のような十分なシグナルを検出することが出来なかった。凍結切片を用いた解析では、弱いシグナルを検出できたが、非特異的反応を示す細胞との分離が困難であり、より厳密な解析には至らなかった。

(2) フォグリンの消化管内分泌細胞マーカーとしての可能性と腫瘍化抗原を導入後に細胞株の樹立が可能かを検討する目的で、マウスの小腸上皮細胞の *ex vivo* 酵素消化し、回収細胞の同定を行った。回収した細胞を固定後、抗体との反応性を検討したところ、蛍光抗体標識法によって陽性反応を示す細胞が多く認められたが、詳細に解析したところ、リンパ性の中心乳び腔内に由来する形質細胞が多く混入していることが判明した。そのため内分泌細胞をより効率的に回収するための条件を検討したところ、消化条件により、上皮細胞塊の分散と形質細胞の混入の程度に差が認められた。上部小腸を切出し後、消化酵素トリプシン溶液を注入し、腸管両端部を結紮し、5 分間の 37 加温による消化条件が最も良好であった。回収後の上皮細胞を細胞染色によって解析したところ、フォグリン陽性シグナルは比較的強く、一部の細胞でグルカゴン（モルモット 1 次抗体）との共発現を検出できたが、セロトニン（マウス 1 次抗体）では形質細胞との識別が困難であった。これら結果は、細胞の分散状態と抗体結合活性の問題を含んでいるが、抗体で磁気ビーズなどの担体を標識することで、フォグリン発現細胞の分離が可能であることを示唆する。

(3) 連携研究者である群馬大学鳥居博士が作製した膵細胞特異的フォグリン遺伝子ノックアウトマウスの膵組織の提供を受け、解析を実施した。これまでにフォグリンは、膵細胞において分泌顆粒へのインスリンの選別輸送に関わっている点や、高グルコース刺激時の細胞増殖に関与しているということが示唆されている。そこで、インスリン、IA-2、Rab27a、細胞増殖マーカータンパク質（PCNA）、カテプシンに対する各抗体を用いて、ホルモン含有、顆粒輸送、ホルモン分解

および細胞増殖性などを指標に、免疫組織化学的に解析した。また、コラゲナーゼ法により膵組織より膵島を単離後、イムノプロット法によりタンパク質発現についても解析した。抗 PCNA 抗体を用いた組織学的解析結果から、糖あるいは高脂肪食といった負荷をかけていない定常時では、膵外分泌部と同様に、膵細胞における増殖性変化の亢進は認められなかった。また、IA-2、Rab27a、カテプシン D は膵島において発現が認められたが、ノックアウトと野生型マウスの間で顕著な差は認められなかった。しかしながら、単離膵島のタンパク質発現の解析では、IA-2、カテプシン、Rab27a の発現はノックアウトマウスで明らかな変化は認められなかったが、カテプシンのサブタイプにおいて発現量の増加が認められた。これらの結果から、フォグリンの膵細胞の増殖性への関わりはインスリン分泌あるいはインスリンシグナルに関連する現象であることが示唆された。また、カテプシンの発現変化は、膵細胞内の顆粒のプロテオリシスに関わるフォグリンの作用があるのではないかと推測される。

(4) フォグリンノックアウトマウスの消化管内分泌細胞および膵島の免疫組織化学的解析と電顕解析については、一般解析において分泌顆粒の数と形成あるいは分解系に注目して、ブラインド法により解析を進めている。また、マイルドな固定条件下（0.2%グルタルアルデヒド濃度）で LR-White 樹脂包埋の紫外線重合標本を作成し、レクチン組織化学についても検討している。

(5) フォグリンと相互作用し、ペプチドホルモンの分泌顆粒への輸送を担う分子の 1 つであるセクレトグラニン III については、鳥類組織中の発現分布を免疫組織化学的に明らかにした。これまで、げっ歯類でその発現が明らかにされていた膵島、下垂体および副腎以外の組織として、上皮小体、鰓後体および消化管内分泌細胞で特異的に発現していた。各種ホルモン抗体を用いた共発現解析により、セクレトグラニン III はプロホルモンとして合成された後、プロセッシング酵素の働きにより成熟化されるペプチドホルモンやセロトニンなどの生理活性アミンを産生する細胞で発現していることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kouichi Mizuno, Takuji Fujita, Hiroshi Gomi, Tetsuro Izumi, Granophilin exclusively mediates functional granule docking to the plasma membrane, *Scientific Reports*, 査読有, Vol.6, No. 23909, 2016, pp.1-12, DOI: 10.1038/srep23909

Hiroshi Gomi, Satomi Morikawa, Naoki

Shinmura, Hiroaki Moki, Tadashi Yasui, Azuma Tsukise, Seiji Torii, Tsuyoshi Watanabe, Yoshinori Maeda, Masahiro Hosaka, Expression of secretogranin III in chicken endocrine cells: its relevance to the secretory granule properties of peptide prohormone processing and bioactive amine content, Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 査読有, Vol.63, No.5, 2015, pp.350-366, DOI: 10.1369/0022155415575032

〔学会発表〕(計 1 件)

Hiroshi Gomi, Chisato Kubota-Murata, Seiji Torii, Immunohistochemical analysis of IA2 family of protein-tyrosine phosphatases in rat gastrointestinal endocrine cells, The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, September 11, 2013, Pacifico Yokohama (Kanagawa, Yokohama)

〔その他〕

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~vethome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五味 浩司 (GOMI, Hiroshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：9 0 2 9 3 2 4 0

(2) 連携研究者

鳥居 征司 (TORII, Seiji)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：4 0 3 1 2 9 0 4