

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461330

研究課題名(和文)隣接する細胞間のコミュニケーションによる膵島機能制御

研究課題名(英文)Functional regulation of pancreatic islets by cell to cell communication

研究代表者

向 英里(MUKAI, ERI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60362539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓細胞は、細胞凝集体である膵島を構成することで必要量のインスリン分泌が発揮される。その高度な機能制御機構を細胞間のギャップ結合が担っていると想定し、細胞におけるギャップ結合を介した情報連絡メカニズムについて検討した。シグナル伝達解析ツールの構築とその解析により、隣接する細胞への分泌シグナル伝播が確認できた。またそのシグナルは心筋細胞のように強くかつ持続性のある伝播ではなかった。コネクシン36は分泌機能に関与していたが、今回用いた遺伝子発現抑制系では十分ではなく新たな発現制御系で検討する必要性がわかった。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic beta cells form islets of Langerhans and the feature is needed for integrated insulin secretory responses. We hypothesized that gap junction between neighboring beta cells plays a role in the integrated secretory regulation and studied the mechanism of signal transduction through gap junction. By construction of analysis tools of signal transduction between beta cells, propagation of signal transduction to neighboring cells could be detected. The propagation was not strong and lasting like cardiac myocytes. Connexin 36 was shown to be responsible for secretory function, but the inhibition of its expression by present experimental system seems to be weak. Therefore, new system for regulation of the expression are needed for analysis of gap junction.

研究分野：基礎医学

キーワード：細胞間情報伝達 インスリン分泌 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

生体組織内の細胞は個々に孤立したのではなく、巧みな相互作用によってその機能役割を發揮している。細胞間の情報を直接連絡するギャップ結合はあらゆる組織細胞に存在し、心臓拍動や感覚受容調節、代謝連関などさまざまな細胞集団の協調活動維持において重要な役割を担っている。糖代謝の恒常性は膵島細胞からのインスリン分泌により厳密に保たれている。膵細胞は血糖値の上昇により細胞内に取り込まれるグルコースが代謝されることによりインスリンを分泌する。膵島は数千個の細胞が凝集して構成される内分泌器官であり、in vitro で膵島を酵素処理などにより個々の細胞に分散させると、インスリン分泌能は極端に低下する。このことは、インスリン分泌機能において個々の細胞のグルコース代謝のみならず、膵島内での細胞間の相互的な機能同調作用が不可欠であり、それにより高度な機能制御機構が賦与されていると考えられる。しかしながら以前からこの現象は認められているものの、そのメカニズムについては未だ明らかにされていない。

ギャップ結合の基本構造はコネクソンとよばれる膜タンパク六量体が膜内で輪状に形成されたものであり、このコネクソンヘミチャネルが隣接する細胞のヘミチャネルと結合してギャップ結合が形成される。コネクソンを形成するコネクシンには類似構造のファミリーが存在し、膵細胞には主にコネクシン 36 が発現している。膵細胞のコネクシン 36 の発現を低下させると、グルコースによるインスリン分泌が低下することが報告されているが、コネクシン 36 を過剰発現させても同様の現象が起こり、コネクシン 36 のインスリン分泌に対する機能についてはよくわかっていない。また、その後のコネクシン 36 欠損マウスの解析によると、コネクシン 36 がグルコースによるインスリン分泌応答に参与していることは明らかであるが、その詳細な制御メカニズムについては不明なままである。実際、コネクシン単一欠損マウスの解析では必ずしも明確な形態学的ならびに機能学的障害が生じない場合が多く、他のコネクシンの補完が推定されるので、ギャップ結合のようなヘテロチャネルは単一欠損マウスの解析ではその機能役割を解明することが難しい。このように、細胞における特にインスリン分泌という機能におけるコネクシン 36 の役割については、不明な点が数多く残されている。一方、形態学的観点から細胞の成熟や細胞量の規定に対するコネクシン 36 の関与についても諸説あり、一定の見解を見ない。糖尿病の進行に応じて膵細胞量の減少が認められるが、そのような細胞死に対するギャップ結合の関与は明らかではなく、さらに糖尿病では膵島内での細胞の局在が消失し、他の内分泌細胞と散在した状態になることが知られてい

るが、その原因究明は手つかずのままである。以上のように、ギャップ結合の細胞における役割についてはほとんど解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

膵細胞のインスリン分泌における高度な機能制御機構を細胞間のギャップ結合が担っていると想定し、本研究で膵細胞におけるギャップ結合を介した情報連絡メカニズムを明らかにする。また機能学的な制御機構のみならず、形態学的な観点から細胞量の規定や膵島内での細胞の局在に対するギャップ結合の関与について検討し、膵細胞におけるギャップ結合の生理的意義を明らかにする。さらには糖尿病発症への関与について解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 膵島細胞間のシグナル伝達解析ツールの構築

細胞間伝達シグナル発信細胞、受容細胞の作製

本来細胞に内在していない刺激・応答システムを細胞株 MIN6 細胞に導入することにより隣接した細胞へのシグナル伝達を直接的に解析するため、細胞間伝達シグナルを発信する細胞(A 細胞)と受容する細胞(B 細胞)を作製する(図1)。すなわち、A 細胞には内因性に発現していない受容体やトランスポーターを遺伝子導入し、そのリガンドや通過分子で刺激することにより特定の細胞にのみシグナルを発火させる。一方、B 細胞には機能に応じたモニター遺伝子を導入する。

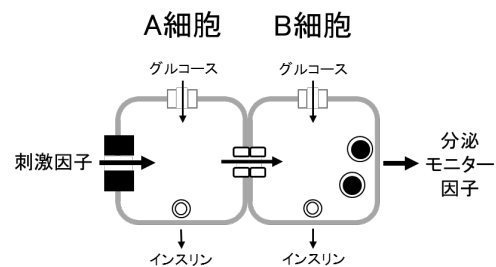


図1 細胞間シグナル伝達解析ツール

A 細胞、B 細胞の混合擬膵島によるシグナル伝達の解析

擬膵島作製法を用いて A 細胞と B 細胞を混合培養して擬膵島を作製し、細胞間のシグナル伝達を調べるため A 細胞への刺激により B 細胞から機能分泌がみられるかどうかモニター分子分泌を ELISA にて確認する。

(2) 擬膵島におけるギャップ結合の機能の解明

コネクシン 36 ドミナントネガティブ変異体発現細胞、コネクシン 36 過剰発現細胞の作製

細胞間シグナル伝達にギャップ結合が

関与しているかどうかを検討するため、A 細胞と B 細胞にそれぞれコネクシン 36 ドミナントネガティブ変異体を発現ならびにコネクシン 36 を過剰発現させた細胞を作製する。

コネクシン 36 のインスリン分泌機能への関与

上記の細胞にて混合擬膵島を作製し分泌実験システムを用いて解析することにより、コネクシン 36 によるギャップ結合が細胞間シグナル伝達に関与しているかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 膵島 細胞間のシグナル伝達解析ツールの構築

細胞間伝達シグナル発信細胞、受容細胞の作製

細胞間伝達シグナルを発信するための A 細胞へ導入する遺伝子として Sodium-dicarboxylate cotransporter 1(NaDC-1)を、シグナルを受容する B 細胞へ導入する遺伝子として分泌をモニターするヒト成長ホルモン(GH)を候補に選び、NaDC-1 ならびに GH 安定発現細胞株を確立した。succinate により NaDC-1 安定発現細胞株でインスリン分泌が増強され、また GH 安定発現細胞株はグルコース刺激に応じてインスリンと相関的に GH が分泌された。

A 細胞、B 細胞の混合擬膵島によるシグナル伝達の解析

MIN6 細胞を三次元ドロップ培養することにより擬膵島を作る手法を構築し、既報の手法に比べ、細胞数が規定できるかつサイズが均一、球状で相互の細胞接着が良好の擬膵島を高効率に作製する手法を確立した。この擬膵島からのグルコースによるインスリン分泌は、MIN6 細胞の単層培養に比べ、はるかに応答が良いことが示された。次に A 細胞と B 細胞を混合培養して擬膵島を作製し、細胞間のシグナル伝達を調べるため A 細胞への刺激により B 細胞から分泌がみられるかどうか GH 分泌を ELISA にて確認したところ、A 細胞と B 細胞を 1:1 の細胞量で混合した擬膵島で A 細胞刺激物質により B 細胞からの GH 分泌が確認された。A 細胞と B 細胞が 1:4 で混合した擬膵島では、B 細胞からの分泌はやや減弱し(図 2) 発火する細胞が一部でも存在すれば隣接している細胞に効率よく

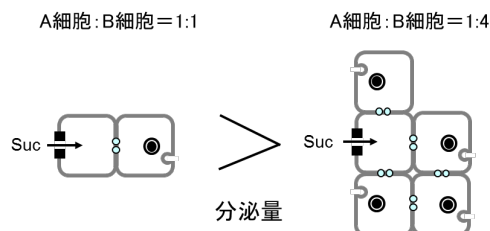


図2 シグナル伝達量の違い

伝わるという仮説は否定的であった。

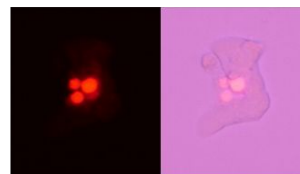
またさらに、刺激・発信と受容・分泌を両方備え持つ細胞(NaDC-1&GH 安定発現細胞株)は、周りに刺激・発信細胞(NaDC-1 安定発現細胞株)が存在すると通常の分泌応答を示すが、周りが刺激・発信することができない細胞(非遺伝子導入 MIN6 細胞)で囲まれると、分泌応答が極度に抑制されるという興味深い結果も明らかとなった。すなわち、発火しない細胞により silencing される可能性が考えられた。

(2) 擬膵島におけるギャップ結合の機能の解明

細胞間シグナル伝達にギャップ結合が関与しているかどうかを検討するため、まず A 細胞と B 細胞にそれぞれコネクシン 36 ドミナントネガティブ変異体(Cx36-G61A-FLAG)を発現させた細胞を作製した。これまでと同様に混合擬膵島を作製し分泌能を検討したところ、分泌抑制が顕著には認められなかった。さらに、別のコネクシン 36 ドミナントネガティブ変異体(Cx36-C231S-FLAG)を作製し、同様に検討したところ、やはり分泌に大きな影響を与えないという結果ではなかった。

これらのコネクシン 36 変異体の細胞膜への発現は Western blotting にて確認できたものの、ドミナントネガティブとして機能しているかどうかを確認するため、ギャップ結合通過色素分子を細胞内にマイクロインジェクションして隣接した細胞に色素が伝播するかどうかをモニターする方法を立ち上げた。その検討により、コネクシン 36 ドミナントネガティブ変異体を導入した細胞では、色素通過がやや抑制されていることが確認できたが、顕著な差ではないことが明らかとなった(図 3)。

MIN6-WT



MIN6-Cx36-DN(G61A)

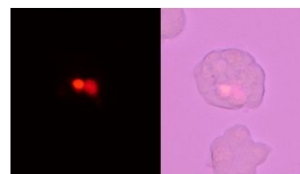


図3 色素分子伝播の違い

以上の検討により、コネクシン 36 が分泌機能に関与している可能性は見出せたが、コネクシン 36 の関与を検討する方法として、

ドミナントネガティブ変異体を用いた検討では極度に発現を抑制できる系ではないことが明らかとなった。したがって、より発現を抑制することができる新たな系で検討する必要があることがわかった。

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) Sato H, Nagashima K, Ogura M, Sato Y, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Sugizaki K, Fujita N, Tatsuoka H, Usui R, Mukai E, Fujimoto S, Inagaki N. Src regulates insulin secretion and glucose metabolism by influencing subcellular localization of glucokinase in pancreatic β -cells. *Journal of Diabetes Investigation*. 2016. 7(2):171-178. 査読有
doi: 10.1111/jdi.12407.

(2) Morita A*, Mukai E*, Hiratsuka A, Takatani T, Iwanaga T, Lee EY, Miki T. *: equally contributed. Distinct effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor and glucagon-like peptide-1 receptor agonist on islet morphology and function. *Endocrine*. 2016. 51(3):429-439. 査読有
doi: 10.1007/s12020-015-0733-4.

(3) Mukai E, Ohta T, Kawamura H, Lee EY, Morita A, Sasase T, Miyajima K, Inagaki N, Iwanaga T, Miki T. Enhanced vascular endothelial growth factor signaling in islets contributes to β cell injury and consequential diabetes in spontaneously diabetic Torii rats. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014. 106(2):303-311. 査読有
doi: 10.1016/j.diabres.2014.08.023.

(4) Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N. Palmitate induces reactive oxygen species production and β -cell dysfunction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase through Src signaling. *Journal of Diabetes Investigation*. 2014. 5(1):19-26. 査読有
doi: 10.1111/jdi.12124.

(5) Kimura H, Matsuda H, Fujimoto H, Arimitsu K, Toyoda K, Mukai E, Nakamura H, Ogawa Y, Takagi M, Ono M, Inagaki N, Saji H. Synthesis and evaluation of ^{18}F -labeled mitoglinide derivatives as positron emission tomography tracers for β -cell

imaging. *Bioorganic & Medical Chemistry*. 2014. 22(13):3270-3278. 査読有
doi: 10.1016/j.bmc.2014.04.059.

〔学会発表〕(計14件)

(1) 森田亜州華、向英里、平塚文乃、高谷具純、李恩瑛、三木隆、DPP-4 阻害薬と GLP-1 受容体作動薬の膵 細胞量制御の違い - 膵 細胞傷害/再生マウスによる検討 -、第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、京都大学医学部創立百周年記念施設「芝蘭会館」(京都府京都市) 2015 年 2 月 13 日

(2) Mukai E, Morita A, Hiratsuka A, Takatani T, Lee EY, Miki T. Dual roles of a DPP-4 inhibitor on cytoprotection and proliferation of pancreatic β -cells in a mouse model of β -cell injury/regeneration. 50th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Vienna(Austria), 2014/9/18

(3) Ogura K, Nagashima K, Shoji T, Sato Y, Tahara Y, Yamano G, Sato H, Sugizaki K, Fujita N, Ogura M, Mukai E, Fujimoto S, Inagaki N. Chronic Administration of Apple Procyanidins Ameliorate Insulin Resistance through the Suppression of Inflammation in Diabetic ob/ob Mice. 74th Scientific Sessions of American Diabetes Association, San Francisco(USA), 2014/6/15.

(4) 森田亜州華、向英里、平塚文乃、高谷具純、李恩瑛、三木隆、DPP-IV 阻害薬による膵 細胞死抑制と増殖促進-膵 細胞傷害/再生マウスを用いた検討、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2014 年 5 月 22 日

(5) 小倉かさね、長嶋一昭、庄司俊彦、佐藤雄一、田原裕美子、山野言、佐藤広規、杉崎和、藤田直尚、小倉雅仁、向英里、藤本新平、稲垣暢也、林檎由来プロシアニジン類長期投与による ob/ob マウスにおけるインスリン抵抗性改善機序の検討、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2014 年 5 月 22 日

(6) 佐藤雄一、藤本新平、向英里、佐藤広規、田原裕美子、小倉かさね、山野言、杉崎和、小倉雅仁、長嶋一昭、稲垣暢也、パルミチン酸は Src 活性化による NADPH オキシダーゼ由来 ROS 産生増加を介して膵 細胞機能を低下させる、第 28 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市) 2014 年 2 月 14 日

(7) Mukai E. Role of endogenous ROS in pancreatic β -cell dysfunction. 2013

International Conference on Diabetes and Metabolism & 5th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, Seoul(Kolea), 2013/11/7.

(8) Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N. Palmitate induces ROS Production and β -cell dysfunction by activating NADPH oxidase via Src signaling. 2013 International Conference on Diabetes and Metabolism & 5th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, Seoul(Kolea), 2013/11/8.

(9) Ogura K, Nagashima K, Shoji T, Sato Y, Tahara Y, Yamano G, Sato H, Sugisaki N, Fujita N, Ogura M, Mukai E, Fujimoto S, Inagaki N. Chronic administration of apple procyanidins ameliorate insulin resistance in diabetic ob/ob mice. 2013 International Conference on Diabetes and Metabolism & 5th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, Seoul(Kolea), 2013/11/8.

(10) 向英里、太田毅、河村治清、李恩瑛、森田亜州華、笹瀬智彦、稲垣暢也、岩永敏彦、三木隆司、VEGF シグナル阻害は SDT ラットにおける 細胞傷害と糖尿病発症を抑制する、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、ホテル日航熊本他、(熊本県熊本市) 2013 年 5 月 17 日

(11) 佐藤雄一、藤本新平、向英里、佐藤広規、田原裕美子、小倉かさね、山野言、杉崎和、小倉雅仁、長嶋一昭、稲垣暢也、パルミチン酸は Src 活性化を介して NADPH オキシダーゼ(NOX)由来の活性酸素種(ROS)産生を増加させて膵 細胞機能低下をもたらす、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、ホテル日航熊本他、(熊本県熊本市) 2013 年 5 月 16 日

(12) 田原裕美子、藤本新平、杉崎和、小倉かさね、佐藤広規、山野言、佐藤雄一、向英里、小倉雅仁、長嶋一昭、稲垣暢也、Thioredoxin binding protein-2(TBP-2)が膵 細胞で果たす役割についての検討、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、ホテル日航熊本他、(熊本県熊本市) 2013 年 5 月 16 日

(13) 佐藤広規、長嶋一昭、佐藤雄一、小倉雅仁、山野言、田原裕美子、小倉かさね、杉崎和、向英里、藤本新平、稲垣暢也、Src はグルコキナーゼ活性調節を介して膵 細胞 KATP チャネルに直接作用してインスリン分泌を惹起する、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、ホテル日航熊本他、(熊本県熊本市) 2013 年 5 月 17 日

(14) 小倉かさね、長嶋一昭、庄司俊彦、佐藤雄一、田原裕美子、山野言、佐藤広規、杉崎和、小倉雅仁、向英里、藤本新平、稲垣暢也、リンゴ由来プロシアニジン類による糖尿病モデルマウスにおける抗糖尿病作用の検討、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、ホテル日航熊本他、(熊本県熊本市) 2013 年 5 月 18 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向 英里 (MUKAI Eri)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：6 0 3 6 2 5 3 9

(2) 研究分担者

三木 隆司 (MIKI Takashi)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：5 0 3 0 2 5 6 8

(3) 連携研究者

なし