

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：72609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860759

研究課題名(和文) 膵島ニッチ障害シグナルネットワークの理解に基づいた糖尿病治療への挑戦

研究課題名(英文) Challenge for diabetes therapy based on understanding of stress signals in pancreatic islet niche

研究代表者

沖田 直之 (Okita, Naoyuki)

公益財団法人佐々木研究所・附属佐々木研究所・研究員

研究者番号：60453841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病の発症あるいは重篤化には、血糖や血中遊離脂肪酸による膵島障害による膵島ホメオスタシス機能の低下が寄与すると考えられている。本研究では、膵島障害シグナルネットワークの形成を細胞相互作用の変化に着目して理解するための研究基盤の構築を行った。その結果、「in vitro 細胞培養系を用いた過栄養ストレスシグナルの実験」「膵島様高次構造形成の最適化」「蛍光タンパク質標識による細胞起源追跡が可能かつテトラサイクリン制御性で遺伝子発現調節が可能な細胞株の樹立のためのプラスミドベクター作成」「糖尿病関連ペプチドホルモンのWestern blottingの感度改善」といった研究成果を得た。

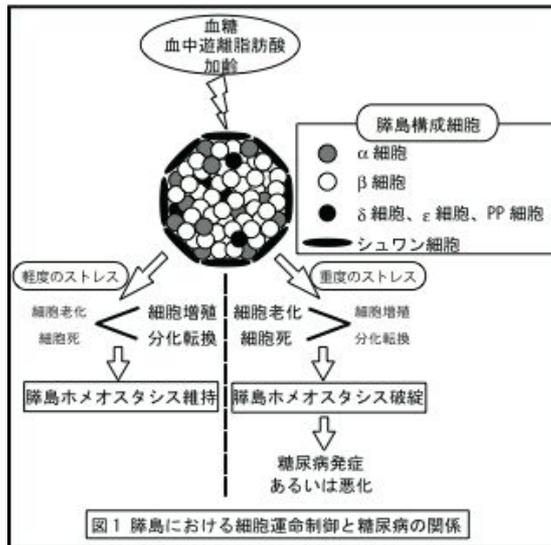
研究成果の概要(英文)：Decline of pancreatic islet homeostasis by nutrient stress is involved in the pathogenesis of type2 diabetes mellitus. In the present study, I established the research basis for understanding the signal network of pancreatic islet failure focused on cell-cell interaction. I obtained the results as shown below: difference among chronic nutrient stresses in beta cell line: optimization of pseudoislet formation: construction of plasmid vectors that possess tetracyclin-dependent gene regulatory system with cell marking system by fluorescence proteins: improved method of western blotting for Insulin and the other diabetes-associated peptide hormones.

研究分野：分子代謝制御学

キーワード：膵島 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、自己免疫による膵島障害を介したインスリン分泌不全を主因とする 1 型と、生活習慣の悪化による末梢組織におけるイ



ンスリン抵抗性の惹起、及び(もしくはそれに続く)高血糖あるいは高血中遊離脂肪酸による膵島障害を介したインスリン分泌不全を主因とする 2 型の 2 種類に大別される。今日の本邦において 2 型糖尿病の患者数(潜在的患者数も含む)は 1000 万人を超え、大きな社会問題となっており、1 型及び 2 型糖尿病に共通するインスリン分泌不全メカニズムの正確な理解に基づく、より効果的かつ効率的な根治療法の開発は急務である。

糖尿病研究分野において、膵島障害の原因としては、β細胞自体のストレス脆弱性という観点を中心にしてすすめられていた。本課題は、膵島ニッチにおける細胞間相互作用の重要性を考慮した場合に、同種細胞間(α細胞-α細胞やβ細胞-β細胞)あるいは異種細胞間(α細胞-β細胞)における細胞間情報伝達を介して障害シグナルの増幅あるいは緩衝が起こっているという仮説を考えるに至った。

2. 研究の目的

2 型糖尿病の発症あるいは重篤化には、膵島の老化や血糖や血中遊離脂肪酸による膵島障害による膵島ホメオスタシス機能の低

下が寄与すると考えられている。本研究では、膵島の高次細胞凝集塊としての微小環境(膵島ニッチ)の重要性に着目し、各膵島構成細胞、特に血糖調節に重要な細胞及び細胞が膵島ニッチとして、どのような障害シグナルネットワークを形成するのかを膵島の老化に伴う細胞相互作用の変化に着目して、主に培養細胞を用いて解析を行った。

3. 研究の方法

1) 膵β細胞株における培地中グルコース及び脂肪酸濃度のコントロールによる糖尿病様病態の模倣

現在、糖尿病研究分野においてもっとも汎用されているβ細胞株は大阪大学の宮崎純一教授らによって樹立された MIN6 及びその下位クローン化株である。本研究では、グルコース誘導性の Insulin 分泌応答に優れており、長期培養下でも比較的表现系が安定しているとされる MIN6-m9(神戸大学・清野進教授より分与)及び MIN6-c4(大阪大学・宮崎純一教授より分与)について維持培地中のグルコース濃度の違いによる、Proinsulin 及び Insulin の細胞内外の含有量やグルコース刺激による培地への Insulin 分泌能を指標に、糖尿病病態モデルとして解析していくのにより適切な細胞株を選定した。続いて、当該選定細胞において、高グルコースあるいは高脂肪酸培養状態において、直接的なストレスマーカー(最終糖化産物、過酸化脂質等)や Insulin 以外の種々の糖尿病関連因子のタンパク質発現レベル、局在変化等について実験系の確立及び検証を行った。

11) 膵島様高次構造(pseudoislet)形成の最適化

培養細胞株において pseudoislet を形成させるには、細胞外マトリックスをコーティングした培養ディッシュや浮遊細胞培養用ディッシュでの静置培養、振盪培養など様々な方法が報告されてきた。しかし、同一条件で

比較した論文がなかったため、どの培養法が再現よく pseudoislet を形成させることができるかを検討した。

III) 蛍光タンパク質標識による細胞起源追尾が可能かつテトラサイクリン制御性で遺伝子発現調節が可能なβ細胞株の樹立のためのプラスミドベクター作成

Tet 調節性転写活性化因子 (rtTA) 発現ベクター (過剰発現系) として pRetroX-Tet-On Advanced ベクター、Tet 調節制転写抑制因子 (tTS) 発現ベクター (発現抑制系) として、pQC-tTS-IN ベクターをバックボーンとして用いて、改変ベクターを作成した。詳細としては、各基本ベクターの IRES と Neomycin 耐性遺伝子の間に TaKaRa 社の In-fusion 技術を用いて膜局在型単量体化 EGFP (mem-mEGFP) もしくは膜局在型単量体化 Venus (mem-mVenus) P2A 配列を挿入した。ついで安定的な発現を担保するために、3' LTR 配列中にクロマチンインスレーター配列 IS2 を挿入した。

IV) Insulin 及びその他糖尿病関連ペプチドホルモンの Western blotting の感度改善

Proinsulin と比較して Insulin の WB の感度が悪いことがこれまでの実験から判明していた。一般的な Insulin の定量は専ら ELISA によってされていたが、ELISA は特異性の判定に難しい面があり、WB など他の方法でも解析することが推奨されてきているため、Insulin の WB での感度低下の原因の究明とプロトコールの変更による改善を試みた。さらに、当該プロトコールがその他の糖尿病関連ペプチドホルモンへの汎用性があるかも合わせて検証を行った (方法の詳細は特許出願前のため未記載)。

4. 研究成果

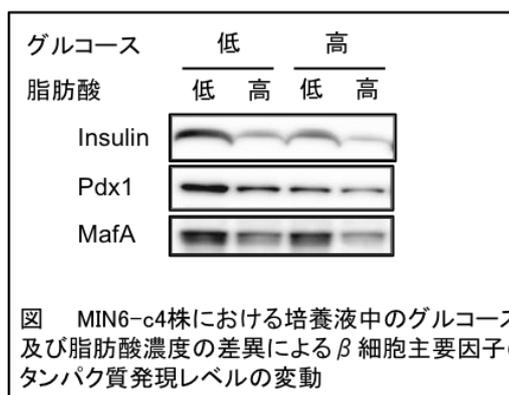
1) 隣β細胞株における培地中グルコース及び

脂肪酸濃度のコントロールによる糖尿病様病態の模倣

維持培地中のグルコース濃度を 11.1 mM (通常血糖)、16.7 mM (軽度高血糖)、25 mM (高血糖)、50 mM (重度高血糖) の 4 点準備し、各培養条件下での細胞内及びグルコース刺激による Proinsulin 及び Insulin 量をウエスタンブロッティングによって確認した。

m9 株の細胞内 Proinsulin 及び Insulin 量はグルコース濃度の変化に影響を受けずほぼ一定であり、グルコース刺激による培地中への Insulin 分泌は、維持培地中グルコース濃度が高くなるにつれて増加した。

c4 株は細胞内 Proinsulin 量はグルコース濃度の変化に影響を受けずほぼ一定であったが、Insulin 量は 11.1 mM のときに最も高く、16.7 mM 以上のときには低下した。さらに、グルコース刺激による培地中への Insulin 分泌は、11.1 mM から 25 mM までは増加したが 50 mM では顕著に低下した。以上の結果より、高グルコース条件による Insulin 枯渇が観察された c4 株のほうが、細胞の疲弊を模倣するのに適していると考え



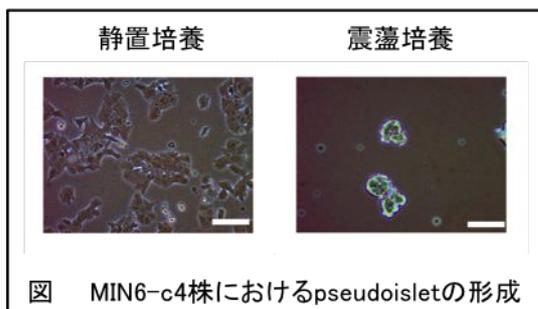
え、今後の解析に使用することとした。

さらに、糖尿病病態を模倣するために、c4 株を用いて、通常培養培地中へのグルコースや脂肪酸の持続添加実験を行い、細胞の主要因子である Pdx1 及び MafA のタンパク質発現の挙動を確認した。その結果、興味深いことに、Pdx1 はいずれの栄養因子の添加によっても、発現低下を示した一方で、MafA は脂肪

酸の添加においてのみ顕著な発現低下がみとめられた。Pdx1、MafA は 細胞のマスターレギュレーターとして認知されており、遺伝子組換えマウスを用いた形質変化に関する報告がなされている。Pdx1 や MafA の下方制御は 細胞の 細胞(正確には glucagon 分泌細胞)へ、分化転換を誘導することが示されている (Gao et al. Cell Metab 2014, Nishimura et al. Diabetologia 2015, Schaffer et al. PLoS Genet 2013)。すなわち、このように Pdx1 と MafA の過栄養ストレス応答に乖離が認められることは、糖尿病における 細胞の形質変化の観点で非常に重要な知見である。

II) 膵島様高次構造 (pseudoislet) 形成の最適化

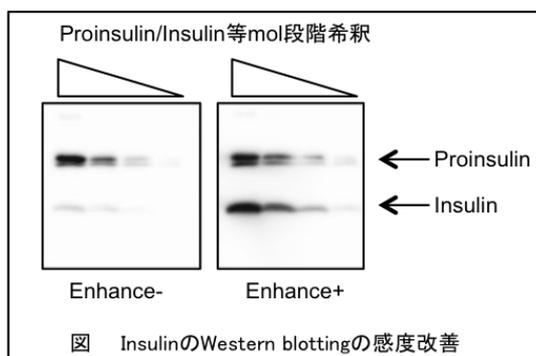
collagen や gelatin といった細胞外マトリックスコートディッシュ、Lipidure のようなリン脂質コートディッシュ、浮遊細胞用ディッシュ (静置、震盪培養) での pseudoislet 形成能を比較したところ、最も再現よく (大きさが均一) pseudoislet を形成したのは浮遊細胞用ディッシュにて震盪培養を行ったときであることが判明した。



III) プラスミドの作成まで完了した。

IV) ブロッキング後のメンブレンに、種々の作業を行うことで、Proinsulin に関しては2倍程度、Insulin に関しては 10-30 倍の感度を上昇させることに成功した。また、Proinsulin と Insulin のタンパク量 (mol)

比と化学発光シグナル比は 1:1 で安定的に検



出が可能となった。また、この方法を用いて MIN6c4 の細胞内 Insulin 含量を定量したところ、10 ug/mg total protein となり既報 (6 ug/mg total protein) とほとんど変わらない定量値を得ることができた。また、Insulin アナログ、Glucagon、GLP1、Somatostatin、Pancreatic polypeptide、Ghrelin 等、その他の糖尿病関連ペプチドホルモンもこの追加処理を行うことで、かなり化学発光シグナルが改善できることも実験的に証明した。

総括

本研究により、過栄養ストレス下での 細胞単独での応答に関する知見が集積された。また、細胞間相互作用を解析する上で重要な、蛍光タンパク質標識による細胞起源追尾が可能かつテトラサイクリン制御性で遺伝子発現調節が可能なβ細胞株の樹立のためのプラスミドベクターも完成し、pseudoislet 形成の最適化も行うことができた。現在、これらのツールを用いてさらなる検討を行っている。さらに、特筆すべきは「糖尿病関連ペプチドホルモンの Western blotting 変法による検出」に関しての研究成果である。現在、特許出願処理中であり、手続き完了後学術論文として発表する予定である。

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3件)

1. **Okita N**, Tsuchiya T, Fukushima M, Itakura K, Yuguchi K, Narita T, Hashizume Y, Sudo Y, Chiba T, Shimokawa I, Higami Y. Chronological analysis of caloric restriction-induced alteration of fatty acid biosynthesis in white adipose tissue of rats. *Experimental Gerontology* 63. 59-66, 2015.
2. Hatachi G, Tsuchiya T, Miyazaki T, Matsumoto K, Yamasaki N, **Okita N**, Nagashima A, Higami Y, Nagayasu T. Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor (PJ34) Reduces Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Transplantation* 98, 618-624, 2014.
3. **Okita N (Corresponding author)**, Ishikawa N, Oku M, Nagai W, Suzuki Y, Mizunoe Y, Matsushima S, Mikami K, Okado H, Sasaki T, Higami Y. Inhibitory effect of p53 in mitochondrial content and function during adipogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446, 91-97, 2014.

〔学会発表〕(計1件)

1. **Okita N**, Matsushima S., Nagai W., Higami Y.
Novel regulatory mechanism of PARP1 protein mediated by MDM2 inhibitors. The International Postgraduate Conference 2016, Noda, Japan, 2016

〔図書〕(計1件)

1. Mizunoe Y, Sudo Y, **Okita N**, Higami Y. Autophagy in adipose tissue, *AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity,*

Infection, and Aging (Edited by Hayat MA), Elsevier, 2016

2. **Okita N**, Shibata A. Section 15. Other determinants of sensitivity, *PARP Inhibitors for Cancer Therapy* (Edited by Curtin N, Sharma R), Springer, 2015

6 . 研究組織

(1)研究代表者

沖田 直之 (OKITA NAOYUKI)

公財) 佐々木研究所・附属佐々木研究所・研究員

研究者番号 : 60453841