

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16411

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答を介した成体膵 細胞増殖分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of pancreatic beta cell proliferation via endoplasmic reticulum stress responses

研究代表者

村上 隆亮(Murakami, Takaaki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50904017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵 細胞増殖におけるATF6を中心としたERストレス応答関連因子の役割を解明するとともに、生体膵 細胞量に与える影響を明らかにすることを目的とする。これまで、膵部分切除の他に、高濃度グルコース条件下で培養した単離膵島ではATF6の活性化、BrdU陽性細胞の増加が報告されているが、膵島単位でない膵 細胞特異的な解析はほとんど行われておらず、ATF6の膵 細胞増殖誘導における役割を解明するためには膵 細胞特異的な実験系を用いる必要があった。申請者は膵 細胞単一細胞RNAシーケンスデータを基に、膵 細胞特異的なATF6 ノックアウトマウスを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、膵 細胞増殖におけるATF6を中心としたERストレス応答関連因子の役割を解明するとともに、生体膵 細胞量に与える影響とその分子機構を解明することである。本研究では、単一細胞RNAシーケンス解析データを基に、膵 細胞特異的なATF6 欠損マウスを作製した。このマウスを用いた膵 細胞量や膵 細胞増殖能の詳細な解析により、ATF6などERストレス応答経路を標的とし成体膵 細胞増殖を介した膵 細胞量保護効果を有する糖尿病治療の予防・治療法の創出に繋がる新規研究基盤構築への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the role of ER stress response-related factors, mainly ATF6, in pancreatic  $\beta$ -cell proliferation and its possible effects on the amount of living pancreatic  $\beta$ -cells. Although activation of ATF6 and increase of BrdU-positive cells have been reported in isolated islets cultured under high concentration glucose conditions as well as partial pancreatectomy, few islet-specific analyses of pancreatic  $\beta$ -cells have been conducted, and it was necessary to use a pancreatic  $\beta$ -cell-specific experimental system to clarify the role of ATF6 in inducing pancreatic  $\beta$ -cell proliferation. Therefore, it was necessary to use a pancreatic beta cell-specific experimental system to elucidate the role of ATF6 in inducing pancreatic beta cell proliferation. The applicant created a pancreatic  $\beta$ -cell-specific ATF6 knockout mouse based on pancreatic  $\beta$ -cell single cell RNA sequencing data.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病において、耐糖能異常が出現する段階から既に膵細胞量は減少しており、糖尿病診断時点では約 30%程度にまで減少していることが報告されている (Butler AE, et al. Diabetes 2003)。このため、膵細胞量を維持・回復させることは 2 型糖尿病の予防・治療法として有望な選択肢であるが、成人膵細胞はその大部分が増殖せず、膵細胞の増殖促進を標的とした治療法は実用化に至っていない。これまで、成体膵細胞のうち増殖細胞はごく少数である上、膵島細胞以外の複数の内分泌細胞から成るため、膵細胞特異的な増殖機構を調べることは困難であった。申請者の所属研究室では、膵細胞増殖誘導モデルである膵部分切除マウスにおける単一細胞 RNA シークエンスを行い、疑似時系列解析から膵細胞における増殖停止期から増殖期への遷移時に小胞体(ER)ストレス応答関連遺伝子群の発現が増強しており、ER ストレス応答が膵細胞増殖誘導に重要である可能性を見出した (Tatsuoka H, et al. iScience 2020)。この単一細胞 RNA シークエンス解析を基に、実際に、申請者は、膵部分切除マウス膵島において、Activating transcription factor (ATF) 6 の発現が術後短期間のみ上昇することを確認している。しかし、ATF6 など各 ER ストレス応答関連因子の膵細胞増殖における生理学的意義は明らかでなく学術的に興味深い。また、複数ある ER ストレス応答経路のうち ATF4 の下流では C/EBP homologous protein (CHOP)活性化によりアポトーシスが惹起されるため、ER ストレス応答関連因子の活性化が生体において最終的な膵細胞量保護効果をもたらすかは明らかでない。申請者は、独自に開発したプローブを用いた非侵襲的膵細胞量評価技術により、ER ストレス応答関連因子が膵細胞量に与える影響を縦断的に評価可能である。本研究では、成体での膵細胞増殖促進につながる分子機構を解明する。本成果を基に治療標的を探索・同定し、治療開発を展開すれば、膵細胞量保護戦略の構築に繋がる可能性があるため、医学的意義も極めて高いと考える。近年、高濃度グルコース下培養単離膵島を用いた報告にて、ATF6 など一定の ER ストレス応答の誘導が成体の膵細胞増殖には重要である可能性が示唆され (Sharma RB, et al. J Clin Invest. 2015)、ATF6 全身ノックアウトマウスでは高脂肪食摂餌下で耐糖能異常を呈することが報告されている (Usui M, et al. Metabolism 2012)。一方、膵細胞における ATF6 など ER ストレス応答関連因子の果たす役割を、他の膵内分泌細胞を含まない膵細胞特異的な実験系を用い増殖促進という視点で解析した報告はない。申請者の所属研究室では膵部分切除マウスの単一細胞 RNA シークエンスの疑似時系列解析から増殖膵細胞特異的な各 ER ストレス応答関連因子の発現様式に関する知見を有しており (Tatsuoka H, et al. iScience 2020)、本研究では、ER ストレス応答関連因子が、膵細胞増殖において果たす役割は何か、及び、膵細胞量維持・回復に寄与するのかを解明することを目指す。

### 2. 研究の目的

本研究では、膵細胞増殖における ATF6 を中心とした ER ストレス応答関連因子の役割を解明するとともに、生体膵細胞量に与える影響を明らかにすることを目的とする。これまで、膵部分切除 (Tatsuoka H, et al. iScience 2020)の他に、高濃度グルコース条件下で培養した単離膵島では ATF6 の活性化、BrdU 陽性細胞の増加が報告されている (Sharma RB, et al. J Clin Invest. 2015)が、膵島単位でない膵細胞特異的な解析はほとんど行われておらず、ATF6 の膵細胞増殖誘導における役割を解明するためには膵細胞特異的な実験系を用いる必要がある。申請者は膵細胞単一細胞 RNA シークエンスデータを基に、膵細胞特異的な ATF6 ノックアウトマウスをすでに作成している。ATF6 の isoform のうち ATF6 が Unfolded protein response (UPR)に重要な役割を果たすと考えられる (Thuerauf DJ, et al. J Biol Chem. 2007)が、膵細胞特異的な ATF6 ノックアウトマウスの報告は一切なく、本研究は膵細胞特異的な実験系を用いる点で独創的である。また、独自のイメージング技術基盤を活用し ER ストレス応答関連因子の膵細胞量に与える影響を解明しようとする点でも極めて独創性が高い。本研究では膵細胞特異的な増殖誘導における ATF6 の果たす役割やその分子機構を解明することが可能なため、膵細胞増殖を標的とした新規糖尿病治療法の開発・創薬につながる可能性がある。

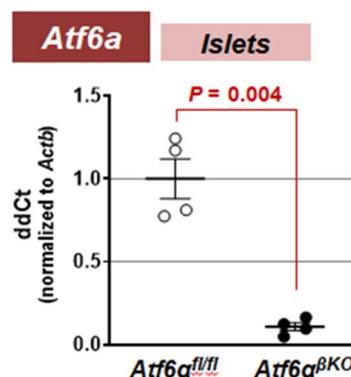
### 3. 研究の方法

本研究では、膵細胞増殖における ATF6 を中心とした ER ストレス応答関連因子の役割を解明するとともに、生体膵細胞量に与える影響を明らかにすることを目的とする。これまで、膵部分切除の他に、高濃度グルコース条件下で培養した単離膵島では ATF6 の活性化、BrdU 陽性細胞の増加が報告されているが、膵島単位でない膵細胞特異的な解析はほとんど行われておらず、ATF6 の膵細胞増殖誘導における役割を解明するためには膵細胞特異的な実験系を用いる必要があった。このため、申請者は膵細胞単一細胞 RNA シークエンスデータを基に、

膵 細胞特異的 ATF6 ノックアウトマウス(Rip-Cre; ATF6 floxed)を作成する。ER ストレス 応答因子である ATF6 の膵 細胞量保護への寄与を明らかにするため、生体での膵 細胞特異的 ATF6 欠損マウスである Rip-Cre; ATF6 floxed マウスと littermate マウスを用い、通常食及び高脂肪食摂餌下で、SPECT/CT による非侵襲的膵 細胞イメージング技術を用い、縦断的膵 細胞量評価を行う。膵 細胞での ATF6 発現の有無ならびに高脂肪食負荷の有無による膵 細胞量への経時的な影響を詳細にモニタリングするため、10 週間程度、同一マウス個体において、111 インジウム標識 Exendin-4 derivative プローブ SPECT/CT を繰り返し撮像し、膵 細胞量変化を非侵襲的に解析する。観察期間中、体重、摂餌量、経口ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験を行う。これにより、膵 細胞量と代謝との経時的な関係を評価し、高脂肪食負荷による膵 細胞量変化における ATF6 による ER ストレス応答の意義を明確化する。また、縦断的検討において Rip-Cre; ATF6 floxed マウスと littermate マウスの膵 細胞量の乖離が最も大きいと考えられる時期を選択し、各群のマウス膵切片を用いたインスリン染色による膵 細胞量の算出に加え、抗 MIB1・PCNA 抗体、TUNEL 染色によりそれぞれ膵 細胞における増殖・アポトーシスを評価する。これにより、生体膵 細胞量保護標的因子としての、ATF6 を介した ER ストレス応答の意義を明確化する。その上で、ATF6 を介した ER ストレス応答を標的とする化合物スクリーニング、膵 細胞量保護効果評価を検討する。

#### 4. 研究成果

膵 細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する RIP-Cre マウスと、ATF6 floxed マウスを交配し、膵 細胞特異的 ATF6 ノックアウトマウス(Rip-Cre; ATF6 floxed)を作成した(図)。この膵 細胞特異的 ATF6 ノックアウトマウスは、雌雄ともに明らかな異常を認めずに出生し、成長に関しても大きな問題を認めなかった。通常食摂餌下ではコントロールマウスに比し、体重や随時血糖、グルコース負荷による耐糖能に有意な差を認めなかった。また、膵病理における評価においても、インスリン免疫染色評価に基づく膵 細胞量、ならびに膵 細胞における BrdU 陽性細胞率や TUNEL 陽性細胞率にも、膵 細胞特異的 ATF6 ノックアウトマウスとコントロールマウスの間で有意な差を認めなかった。このため、膵 細胞特異的 ATF6 ノックアウトマウスは、通常食摂餌下では、膵 細胞の増殖やアポトーシスに大きな影響を認めず、膵 細胞量にも影響を及ぼさないものと考えられた。



今後、ATF6 の成体膵 細胞増殖に対する役割を明らかにするために、膵 細胞特異的 ATF6 ノックアウトマウスに各種手法(膵部分切除、インスリン受容体ブロッカー投与、高脂肪食摂餌、妊娠)で膵 細胞増殖誘導を行い、膵 細胞増殖率の評価を行う。ならびに、ER ストレス 応答因子である ATF6 の膵 細胞量保護への寄与を明らかにするため、膵 細胞特異的 ATF6 ノックアウトマウスを高脂肪食摂餌下で飼育し、高脂肪食負荷下での膵 細胞量および膵 細胞の増殖・アポトーシスへの ATF6 欠損の影響について評価を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Botagarova Ainur, Murakami Takaaki, Fujimoto Hiroyuki, Fauzi Muhammad, Kiyobayashi Sakura, Otani Daisuke, Fujimoto Nanae, Inagaki Nobuya	4. 巻 37
2. 論文標題 Noninvasive quantitative evaluation of viable islet grafts using 111In exendin 4 SPECT/CT	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202201787RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fauzi Muhammad, Murakami Takaaki, Yabe Daisuke, Inagaki Nobuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Current understanding of imeglimin action on pancreatic cells: Involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 186 ~ 188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fauzi Muhammad, Murakami Takaaki, Fujimoto Hiroyuki, Botagarova Ainur, Sakaki Kentaro, Kiyobayashi Sakura, Ogura Masahito, Inagaki Nobuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Preservation effect of imeglimin on pancreatic -cell mass: Noninvasive evaluation using 111In-exendin-4 SPECT/CT imaging and the perspective of mitochondrial involvements	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.1010825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------