

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08306

研究課題名(和文) 遷延する高血糖が膵細胞の分化転換を誘導する機序の解明

研究課題名(英文) Persistent hyperglycemia induces beta-to-pancreatic polypeptide cell transdifferentiation

研究代表者

田蔭 基行 (TAMAKI, Motoyuki)

徳島大学・先端酵素学研究所(糖尿病)・徳島大学専門研究員

研究者番号：60624400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食とストレプトゾトシンの少量投与によって作成した肥満糖尿病モデルマウスで、高血糖状態にさらされたβ細胞が他細胞に分化転換することを検討している。

膵細胞はPP細胞に分化転換することがlineage tracing法でわかってきており、そのメカニズムとしてPDX1・Nkx6.1・MafAなどの主要転写因子の発現減弱が関与していることを示してきた。しかしながらPPはPPファミリーのNPYやPYYと相同性が高く、市販の抗PPポリクローナル抗体論文では真にPP細胞を検出しているのかが疑問視され、PP-Creノックインマウスや抗PPモノクローナル抗体を作出し、さらなる検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：Persistent hyperglycemia decreases pancreatic β-cell function and survival. As a possible explanation for the reduced β-cell mass, previous reports suggested that non-β cells are increased in obese diabetic mice, although the origin of these cells remains to be elucidated. In this study, we investigated whether persistent hyperglycemia contributes to the increase in non-β cells, and whether this is due to the fate conversion of β cells. We employed genetically non-diabetic and lineage traceable mice, and fed them a high fat diet and treated them with a low dose of streptozotocin. The mice became hyperglycemic and obese, and their non-β cells were significantly increased similarly to that of the genetically obese diabetic mice. Interestingly, the increased pancreatic polypeptide (PP)-positive producing cells were found to originate from the pre-existing β cells.

研究分野：代謝内分泌学

キーワード：膵細胞 糖尿病 ランゲルハンス島

1. 研究開始当初の背景

遷延する高血糖は膵β細胞機能や生存、インスリン分泌を低下させることはよく知られている(1)。これは遷延する高血糖が酸化ストレス(2)、小胞体ストレス(3)、オートファジー機能不全を介することがこれまでに知られている(4)。2012年に膵β細胞特異的 FoxO1 ノックアウトマウスではβ細胞のアポトーシスのみならず、β細胞の脱分化や分化転換が膵β細胞量の減少に関与していることが示された(5)。さらに膵β細胞への分化に必要な遺伝子を強制発現させることで他の膵内分泌細胞から膵β細胞への分化転換が誘導されることや(6-8)、ジフテリア毒素による急激な膵β細胞死はα細胞からβ細胞への分化転換が誘導されることが知られている(9)。2014年には成人マウスでのタモキシフェン誘導による膵β細胞特異的 Pdx1 ノックアウトでは膵β細胞がα細胞に分化転換することが示されている(10)。これらの知見は代謝状態や遺伝子発現の外部からの介入が転写因子群に変化させ、成人膵内分泌細胞は脱分化・分化転換しうることを示している。特に肥満糖尿病マウスにおいて、膵β細胞と PP 細胞が増加していることは注目に値する(11,12)。

2. 研究の目的

このように成人マウスの膵β細胞の分化転換に関する報告はあるものの、生理的条件下での膵β細胞の分化転換は報告されていない。われわれは lineage tracing 法を用いて、低用量 STZ と高脂肪食を投与した C57BL6/J で膵β細胞から他内分泌細胞への分化転換がおこっていることを示す。

3. 研究の方法

動物・メスの db/db マウス (BKS.Cg-m+/+Leprdb/Jcl) と db/misty マウス (BKS.Cg-m+/m+/Jcl) は日本クレアより購入した。Rosa26-loxP-stop-loxP-EGFP:R26R(B6;129-Gt(ROSA)26Sor<tm2Sho>/J) マウス(13)は The Jackson Laboratory から購入した(以降 R26R マウスとして表記する)。C57BL6/J にバッククロスされた R26R マウスと RIP-Cre トランスジェニックマウスを掛け合わせることで RIP-Cre:R26R マウスを作成した(14)。本マウスは Ins2 プロモーターが活性化された細胞では継続して EGFP が発現することで、膵β細胞がその後どのような細胞に分化転換するのかを評価することができる。

Pdx1 ヘテロノックアウトマウスは Y. Kawaguchi (京都大学)より譲渡された。本マウスは Vanderbilt 大学の C. Wright により作成された(15)。研究プロトコルは順天堂大学と徳島大学の実験動物倫理委員会により承認されている。免疫組織染色 - 免疫組織染色はわれわれの標準的な方法で実施した(16)。抗体は以下のとおりである。guinea pig anti-insulin (Linco Research), mouse anti-glucagon (Sigma-Aldrich), rat anti-somatostatin (Abcam), rabbit anti-pancreatic polypeptide (Millipore), rabbit anti-GFP (Millipore), rabbit anti-MafA (Bethyl Laboratories), rabbit anti-Nkx6.1 (Sigma-Aldrich), rabbit anti-PDX1 (a kind gift

from Dr. C. Wright, (17)), rabbit anti-Neurogenin 3 (a kind gift from Dr. M. Sander, University of California, San Diego (13))。

糖尿病 RIP-Cre:R26R マウスの作成 - RIP-Cre:R26R マウスに対して 60%の高脂肪食 (Research Diet)を4週令より投与し、7週令で 133 mg/kg の STZ を投与した。随時血糖が 200-500mg/dl となっているものを選別し、血糖値が上記から外れるものは除外し、20週令になったものをその後の解析に用いた。各マウスの体重・血糖値を示す(Fig.1)。

統計解析 - 全てのデータは平均値±SEM で表示する。統計検定は対応のない t 検定を行った。P 値<0.05 で統計学的に有意差ありと判定した。

4. 研究成果

肥満糖尿病モデルマウス db/db マウスの膵島は、やせ型糖尿病モデルマウス Akita マウスなどに比べて小さいことが知られている(16)。過去の知見と同様に(11,12)、db/db マウスの膵島は db/misty や C57BL6/J と比較して多くの non-β細胞を認めた。過去の報告では膵β細胞数の減少は主に高血糖に伴う膵β細胞のアポトーシスによるものとされていたが(19)、一部の報告ではアポトーシス細胞数は db/db マウスでもほとんど増加していない(18,20)。

そこでわれわれは持続的な高血糖状態ではβ細胞から non-β細胞への分化転換がおこっているのではないかと考えた。その可能性を評価するためにわれわれは RP-Cre:R26R マウスを作成した。RIP-Cre:R26R マウスでは Ins2 の活性化にともなう Cre の発現が EGFP 上流の stop カセットを欠失させることにより、膵β細胞がその後どの細胞系譜に移行するのかを評価することができる(13)。さらにこのマウスを肥満2型糖尿病モデルマウスにするために、よく用いられている高脂肪食 STZ 投与モデルを用いた(21)。過去の報告にて複数回の STZ 投与は膵β細胞に対する自己免疫を賦活化し、1型糖尿病を発症させるとされるため(22)、STZ は単回投与法を採用した。STZ の投与量を検討するために 100, 133, 166, 200mg/kg の投与を試みた。その結果、133mg/kg の STZ 投与が最も適切であることがわかった。

こうして得られた高脂肪食 STZ 投与 RIP-Cre:R26R(HF/STZ)、高脂肪食単独 RIP-Cre:R26R(HF)、通常食 RIP-Cre:R26R(control)について血糖値と体重を評価した(Fig. 1A)。HF/STZ マウスの血糖値は HF あるいは control よりも有意に高かった。HF/STZ マウスの体重は HF マウスよりも軽かったが、control マウスよりは重く、結果として HF/STZ マウスは肥満2型糖尿病モデルマウスになっていると判断した。

免疫組織学的評価では HF/STZ マウスでは膵島の多くの細胞がインスリン陰性であった。Control, HF, HF/STZ の各マウスのインスリン陽性細胞面積率と試料回収時の血糖値には相関関係があり、血糖値が高ければ高いほど、インスリン陽性面積率が低いことが示された(Fig. 1B)。HF/STZ マウ

スのインスリン陽性面積率(%), 膵重量(mg), 膵島重量(mg)は有意に HF マウスよりも低かった(Fig. 1C)。HF/STZ マウスの膵島重量は control マウスよりも重かったが、インスリン陽性率は低かった(Fig. 1B and 2A)。要約すると HF/STZ マウスは肥満と高血糖をきたし、膵島は non β 細胞が増加しており、db/db マウスと同じような表現型を呈することを確認した。対照的に HF マウスでは肥満と軽度の耐糖能障害を示すものの、膵 β 細胞内のインスリン陽性細胞の比率は正常で non β 細胞の増加は認めなかった (Fig. 1B,2A-D)。

HF/STZ マウスで増加しているインスリン陰性細胞が膵 β 細胞由来かを調べるためにインスリンと GFP の共染色を行った(Fig. 2A)。その結果、インスリン陰性の細胞は GFP 陽性であり、これらの細胞は脱顆粒した β 細胞あるいは β 細胞が脱分化・分化転換した細胞であることがわかった。次に GFP と膵内分泌細胞であるグルカゴン・ソマトスタチン・PP で共染色を行った(Fig. 2B-D)。するとグルカゴンとソマトスタチンは GFP と共陽性にならなかったが、PP は GFP と共陽性となった。このことからインスリン陰性細胞は PP 細胞へと分化転換している可能性が示唆された。一方で HF マウスでは PP と GFP が共陽性となる細胞は認めなかった (Fig. 2B, E)。さらに興味深いことに PP とインスリンの共陽性細胞が db/db マウスと HF/STZ マウスでは認められた。PP・インスリン共陽性細胞はそのほかのマウスでは認めなかった (Fig. 2, F and G)。これらの所見は肥満単独ではなく、持続的な高血糖が加わることで β 細胞から PP 細胞への分化転換がおこる可能性を示唆していると考えられた。

また、これまでに遷延する高血糖では膵 β 細胞の主要な転写因子、Pdx1・Nkx6.1・MafA などの発現が減弱することが知られている(1)。われわれの検討においても HF/STZ マウスではこれらの発現は低下していた。PDX1 と Nkx6.1 の発現は HF/STZ マウスで低下していたが、HF マウスでは低下を認めなかった。MafA は control マウスでは低下していなかったが、HF/STZ マウス・HF マウスの両者で低下していた。次に GFP と PDX1 の共染色を行ったところ、HF/STZ マウスの GFP 陽性細胞の多くで PDX1 の発現が消失していた (Fig. 3A)。同様の所見は Nkx6.1 や MafA でも認めた。PDX1 は膵 β 細胞の生存・増殖・インスリン分泌機能の保持に重要な役割を果たす(15,17,23,24)。これらの所見に基づき、われわれは高血糖に伴う PDX1 などの主要転写因子の発現低下膵 β 細胞の細胞運命を変化させている可能性を考えた。われわれは以前の検討で PDX1 の cis-regulatory エレメントの欠損が PP 細胞数の増加につながることを報告している(17)。さらに膵の導管特異的 Pdx1 欠損マウスにおいて PP 細胞数が増加することも示されている(23)。そこでわれわれは Pdx1 ヘテロノックアウトマウス(15)における PP 細胞を観察した。Pdx1 ヘテロノックアウトマウスは軽度の耐糖能障害をきたすものの正常な発育を示す(25,26)。しかしながら PP 細胞と α 細胞数は顕著に増加していた(Figure 3B and 3C)。さらに興味深いことにインスリンとグルカゴンの

共陽性細胞は認めなかったが、インスリンと PP の共陽性細胞を多数認め、db/db マウスや HF/STZ マウスと同様の組織学的特徴を認めた (Figs. 2F-G and 3B)。これらの知見からわれわれは遷延する高血糖が PDX1 をはじめとする膵 β 細胞の主要転写因子の発現を減弱させ、膵 β 細胞から PP 細胞への分化転換がおこる可能性を考えた。最後にわれわれは PDX1 の発現低下が真に PP 発現を誘導するのかを検討するために、膵 β 細胞セルライン MIN6 に対する RNAi を用いた PDX1 ノックダウンの検討を行った。MIN6 細胞では通常 PDX1 と INS2 の mRNA・タンパクの発現を認めるものの PP の発現は認めない(Fig. 4A-D) (27)。しかしながら、RNAi を用いて Pdx1 をノックダウンした場合に 72 時間後に PP の発現を認めた。このことから PDX1 の発現低下単独でも PP の発現が誘導されることが示された。

以上の内容をもって、学術雑誌に投稿をおこなっているが市販の PP 抗体は他の PP ファミリー NPY や PYY と抗原が交差するため、われわれの言う PP 細胞が真の PP 細胞であるということが認められていない。そこで、Ppy-Cre ノックインマウスや、抗 PP モノクローナル抗体を作成し、膵 β 細胞と PP 細胞のさらなる関係を現在検討している。

References

1. Guo, S., Dai, C., Guo, M., Taylor, B., Harmon, J. S., Sander, M., Robertson, R. P., Powers, A. C., and Stein, R. (2013) Inactivation of specific beta cell transcription factors in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 123, 3305-3316
2. Kawamori, D., Kaneto, H., Nakatani, Y., Matsuoka, T. A., Matsuhisa, M., Hori, M., and Yamasaki, Y. (2006) The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation. *J Biol Chem* 281, 1091-1098
3. Lipson, K. L., Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Nguyen, L. X., Foss, E., Bortell, R., Rossini, A. A., and Urano, F. (2006) Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 4, 245-254
4. Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., Kawamori, R., Fujitani, Y., and Watada, H. (2008) Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab* 8, 325-332
5. Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V., Sussel, L., and Accili, D. (2012) Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell* 150, 1223-1234
6. Dhawan, S., Georgia, S., Tschien, S. I., Fan, G., and Bhushan, A. (2011) Pancreatic beta cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. *Dev Cell* 20, 419-429

7. Collombat, P., Hecksher-Sorensen, J., Krull, J., Berger, J., Riedel, D., Herrera, P. L., Serup, P., and Mansouri, A. (2007) Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *J Clin Invest* 117, 961-970
8. Papizan, J. B., Singer, R. A., Tschén, S. I., Dhawan, S., Friel, J. M., Hipkens, S. B., Magnuson, M. A., Bhushan, A., and Sussel, L. (2011) Nkx2.2 repressor complex regulates islet beta-cell specification and prevents beta-to-alpha-cell reprogramming. *Genes & development* 25, 2291-2305
9. Thorel, F., Nepote, V., Avril, I., Kohno, K., Desgraz, R., Chera, S., and Herrera, P. L. (2010) Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 464, 1149-1154
10. Gao, T., McKenna, B., Li, C., Reichert, M., Nguyen, J., Singh, T., Yang, C., Pannikar, A., Doliba, N., Zhang, T., Stoffers, D. A., Edlund, H., Matschinsky, F., Stein, R., and Stanger, B. Z. (2014) Pdx1 Maintains beta Cell Identity and Function by Repressing an alpha Cell Program. *Cell Metab* 19, 259-271
11. Baetens, D., Stefan, Y., Ravazzola, M., Malaisse-Lagae, F., Coleman, D. L., and Orci, L. (1978) Alteration of islet cell populations in spontaneously diabetic mice. *Diabetes* 27, 1-7
12. Gapp, D. A., Leiter, E. H., Coleman, D. L., and Schwizer, R. W. (1983) Temporal changes in pancreatic islet composition in C57BL/6J-db/db (diabetes) mice. *Diabetologia* 25, 439-443
13. Mellitzer, G., Martin, M., Sidhoum-Jenny, M., Orvain, C., Barths, J., Seymour, P. A., Sander, M., and Gradwohl, G. (2004) Pancreatic islet progenitor cells in neurogenin 3-yellow fluorescent protein knock-add-on mice. *Molecular endocrinology* 18, 2765-2776
14. Tamaki, M., Fujitani, Y., Hara, A., Uchida, T., Tamura, Y., Takeno, K., Kawaguchi, M., Watanabe, T., Ogiwara, T., Fukunaka, A., Shimizu, T., Mita, T., Kanazawa, A., Imaizumi, M. O., Abe, T., Kiyonari, H., Hojyo, S., Fukada, T., Kawauchi, T., Nagamatsu, S., Hirano, T., Kawamori, R., and Watada, H. (2013) The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *The Journal of clinical investigation* 123, 4513-4524
15. Offield, M. F., Jetton, T. L., Labosky, P. A., Ray, M., Stein, R. W., Magnuson, M. A., Hogan, B. L., and Wright, C. V. (1996) PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122, 983-995
16. Tamaki, M., Fujitani, Y., Uchida, T., Hirose, T., Kawamori, R., and Watada, H. (2009) Downregulation of ZnT8 expression in pancreatic beta-cells of diabetic mice. *Islets* 1, 124-128
17. Fujitani, Y., Fujitani, S., Boyer, D. F., Gannon, M., Kawaguchi, Y., Ray, M., Shiota, M., Stein, R. W., Magnuson, M. A., and Wright, C. V. (2006) Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for Pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation. *Genes & development* 20, 253-266
18. Tamaki, M., Fujitani, Y., Uchida, T., Hirose, T., Kawamori, R., and Watada, H. (2010) Combination treatment of db/db mice with exendin-4 and gastrin preserves b-cell mass by stimulating b-cell growth and differentiation. *J Diabetes Investig* 1, 172-183
19. Wang, Q., and Brubaker, P. L. (2002) Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia* 45, 1263-1273
20. Uchida, T., Nakamura, T., Hashimoto, N., Matsuda, T., Kotani, K., Sakaue, H., Kido, Y., Hayashi, Y., Nakayama, K. I., White, M. F., and Kasuga, M. (2005) Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice. *Nat Med* 11, 175-182
21. Mu, J., Woods, J., Zhou, Y. P., Roy, R. S., Li, Z., Zycband, E., Feng, Y., Zhu, L., Li, C., Howard, A. D., Moller, D. E., Thornberry, N. A., and Zhang, B. B. (2006) Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes* 55, 1695-1704
22. Kiesel, U., and Kolb, H. (1982) Low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes is under the genetic control of the major histocompatibility complex in mice. *Diabetologia* 23, 69-71
23. Guo, L., Inada, A., Aguayo-Mazzucato, C., Hollister-Lock, J., Fujitani, Y., Weir, G. C., Wright, C. V., Sharma, A., and Bonner-Weir, S. (2013) PDX1 in ducts is not required for postnatal formation of beta-cells but is necessary for their subsequent maturation. *Diabetes*
24. Miyatsuka, T., Kaneto, H., Shiraiwa, T., Matsuoka, T. A., Yamamoto, K., Kato, K., Nakamura, Y., Akira, S., Takeda, K., Kajimoto, Y., Yamasaki, Y., Sandgren, E. P., Kawaguchi, Y., Wright, C. V., and Fujitani, Y. (2006) Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. *Genes & development* 20, 1435-1440
25. Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606-609
26. Lenzen, S. (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216-226
27. Nakashima, K., Kanda, Y., Hirokawa, Y., Kawasaki, F., Matsuki, M., and Kaku, K. (2009) MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones. *Endocr J* 56, 45-53

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田蒔 基行 (TAMAKI, Motoyuki)
徳島大学・先端酵素学研究所 (糖尿病)
徳島大学専門研究員
研究者番号 60624400

(2) 研究分担者

藤谷 与士夫 (FUJITANI, Yoshio)
群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号 30433783

Fig. 1

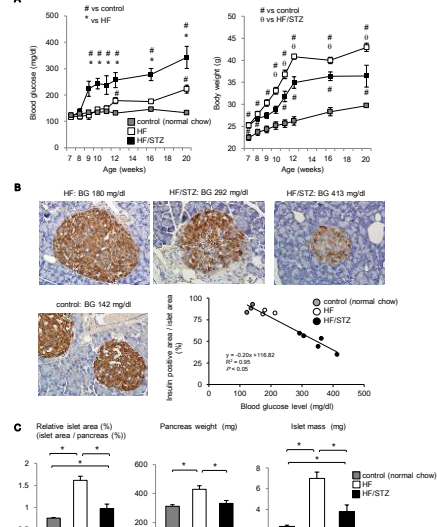


Fig. 1 HF/STZ mice as obese diabetic model

(A) Blood glucose levels (left) and body weights (right) of control (gray, n = 8), HF (white, n = 6), and HF/STZ mice (black, n = 7). (B) Representative images of insulin immunostained pancreas sections of control, HF, and HF/STZ mice. Brown: insulin. Blood glucose levels (BG) at the time of tissue harvest are indicated. The chart shows the insulin positive area / islet area (%) of control (gray circles), HF (white circles), and HF/STZ mice (black circles). (C) Bar graphs indicating islet area / pancreas (%), pancreas weight (mg), and islet mass (mg) of control (gray bars, n = 9), HF (white bars, n = 5), and HF/STZ mice (black bars, n = 10). Data are means \pm SEM. *, #, \square , $P < 0.05$, unpaired *t*-test.

1

Fig. 2

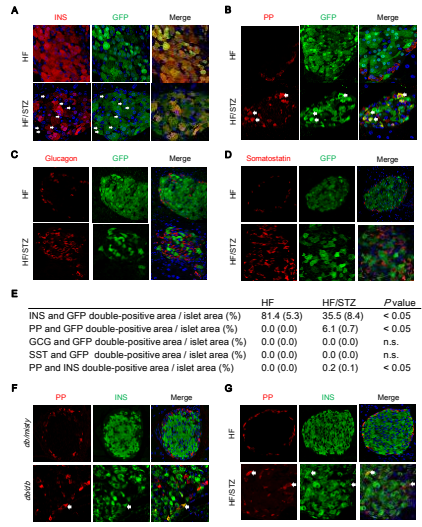


Fig. 2 Cell fate analysis of the islets of HF/STZ mice.

(A, B, C, D) Insulin (INS), PP, glucagon, somatostatin, and GFP expression in HF and HF/STZ mice. Red: INS, PP, Glucagon, and Somatostatin; green: GFP; blue: DNA stained with DAPI. Arrows indicate INS-positive and GFP-negative cells (A), and PP and GFP double-positive cells (B). (E) The ratio of INS, PP, Glucagon, Somatostatin, and GFP double-positive cell area / islet area (%) and PP and INS double-positive area / islet area (%) in HF and HF/STZ mice. (F, G) PP and INS expression in *abn/abn*, HF, and HF/STZ mice. Red: PP; green: INS; blue: DNA stained with DAPI. White arrows indicate PP and insulin double-positive cells. Data are means (SEM). $P < 0.05$, unpaired *t*-test.

2

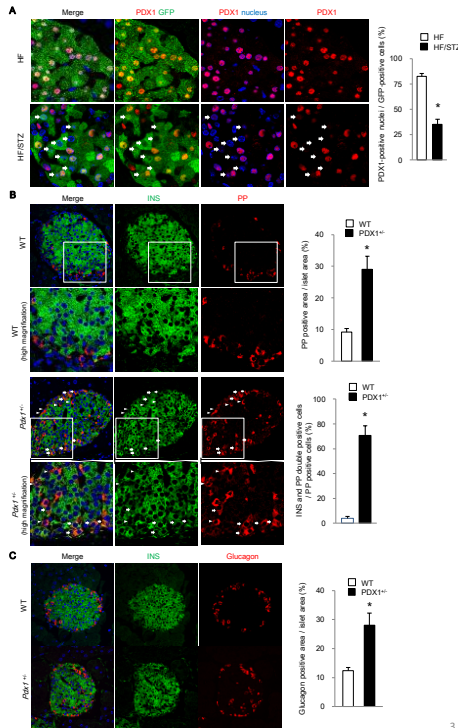


Fig. 4

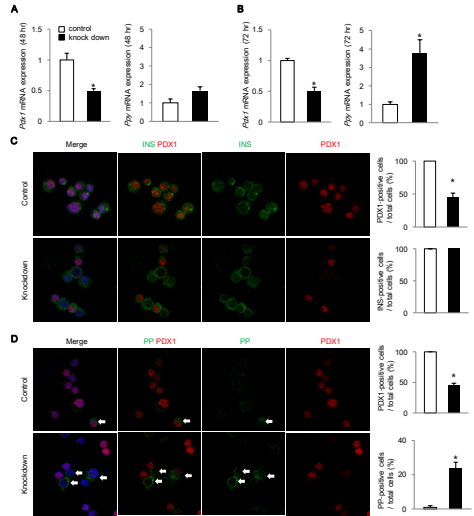


Fig. 4 Enhanced PP expression induced by Pdx1 mRNA knockdown.

(A, B) *Pdx1* mRNA knockdown in MIN6 cells. *Pdx1* and *Ppy* mRNA were measured by RT-PCR at 48 hr (A) and 72 hr (B) after *Pdx1* mRNA knockdown (n = 6 in each group). Bar graph showed relative expression of *PDX1* and *Ppy* in control (white) and knock down (black) cells. (C) PDX1 and insulin staining in MIN6 cells. (D) PDX1 and PP staining in MIN6 cells. White arrows indicate PP-expressing cells. Green: insulin (INS), red: PDX1 and blue: nuclei stained with DAPI. Data are shown as means \pm SEM. *, $P < 0.05$, unpaired *t*-test.

3

4