

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15356

研究課題名(和文) 肝臓に由来する膵島細胞増殖制御因子の同定

研究課題名(英文) Identification of a liver-derived factor that regulates proliferation of islet alpha cells

研究代表者

林 良敬 (Hayashi, Yoshitaka)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：80420363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々が作成したグルカゴン遺伝子-GFPノックインマウス(グルカゴン遺伝子欠損モデル)は正常血糖値のもと、膵臓ランゲルハンス島細胞(GFPを発現する)の増殖亢進を示す。この細胞の増殖制御機構を解明するために腎被膜下移植実験を行い検証した結果、細胞の増殖は肝臓に起因する液性因子により制御されていることを明らかとした。この増殖制御因子の探索を行ったところ、特異的な液性因子の同定には至らなかった一方で、グルカゴン遺伝子欠損下における血中アミノ酸濃度の上昇が増殖促進に与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Homozygous glucagon-GFP knock-in mice, which is deficient in all the peptide derived from proglucagon, are normoglycemic and develop hyperplasia of GFP-positive islet alpha-like cells. To elucidate the regulatory mechanisms of alpha cell proliferation, subrenal capsule transplantation experiments were performed, and the result indicated that proliferation of alpha cells is regulated by a humoral factor(s) derived from liver. Although exploration to identify a specific humoral factor failed to identify such factors encoded by a specific gene, accumulating data suggested that hyperaminoacidemia under glucagon deficiency should be involved in accelerated proliferation of islet alpha cells.

研究分野：内分泌学

キーワード：グルカゴン アミノ酸 ノックアウトマウス 糖尿病 神経内分泌腫瘍

1. 研究開始当初の背景

多くの内分泌系細胞の機能と増殖は視床下部-下垂体系を介した頑強なフィードバック制御を受けている一方、血糖値制御において極めて重要な役割を果たす膵臓ランゲルハンス島の内分泌細胞の増殖制御機構はほとんど明らかとなっていなかった。

膵島 α 細胞より分泌されるグルカゴンの産生や作用が障害された動物モデルのほとんどが、血糖値の低下と α 細胞の過形成を示すのに対して、我々が作成した世界初かつ研究開始時点において唯一のグルカゴン遺伝子欠損動物である GCGKO (グルカゴン-GFP ノックインマウス) のホモ接合体は、正常血糖のもと α 細胞過形成を来す (Hayashi Y et al Mol Endocrinol 2009)。このことから、低い血糖値は α 細胞増殖の必要条件ではないことは明らかであった。

また、肝臓特異的にグルカゴン受容体を欠損するマウスが α 細胞過形成を示すことが報告された結果 (Longuet C et al Diabetes 2013)、肝臓におけるグルカゴン作用不全が α 細胞過形成の十分条件であること、逆に言えばグルカゴンが α 細胞の増殖を直接的に抑制するメカニズムは存在しないことが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

本研究では肝臓に由来する膵島 α 細胞増殖制御因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

既存の α 細胞モデル細胞 (αTC 細胞など) は、培養細胞株として樹立する過程で、生体内環境とは異なる環境の生存に適応した性質を持つ細胞群が選択されているため、α 細胞増殖制御因子のスクリーニングに用いる上で適切でない可能性がある。

グルカゴン遺伝子欠損動物 GCGKO における、GFP 陽性 α 細胞の過形成は加齢とともに進行し膵臓神経内分泌腫瘍 (pancreas neuroendocrine tumor: panNET) の形成に至ることが明らかとなっていたため、この腫瘍細胞を α 細胞増殖制御因子のスクリーニングに用いることとした。

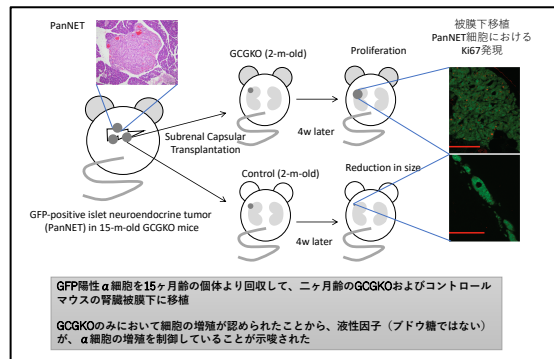
まず、増殖制御機構が液性因子によるものか、神経性のシグナルによるものかを明らかとするために、同細胞を GCGKO および対照個体の腎被膜下へ移植しその増殖を解析した。また培養細胞系においても同細胞に対して、GCGKO 血漿や GCGKO 肝臓において発現が増加または減少している分泌性蛋白質を添加することにより、その増殖が促進・阻害されるかを検証した。

一方、α 細胞の増殖制御因子は促進因子であれば GCGKO において発現が上昇し、抑制因子であれば逆に発現が低下することが予想

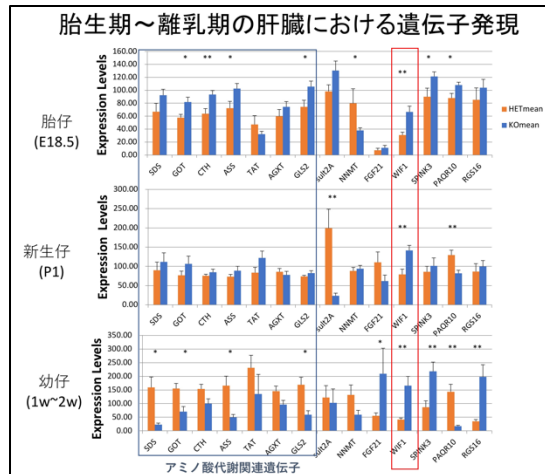
された。そこで、α 細胞の増殖亢進は出生時期よりみとめられる点に着目して、出生前後の肝臓における遺伝子発現を解析し、出生直前より発現に変化が認められる液性因子をコードする遺伝子を同定し、当該因子が α 細胞の増殖に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

panNET 細胞の腎被膜下移植実験においては、GCGKO に移植された panNET 細胞では細胞増殖マーカーである Ki67 を発現する細胞が 12.0±5.8% みとめられたのに対して、対照マウスに移植された細胞では Ki67 を発現するものはみとめられなかった。この結果から GCGKO の液性環境が panNET 細胞の増殖を促進していること、すなわち、GCGKO では α 細胞増殖促進因子が増加している、または α 細胞増殖抑制因子が低下していることが確認された (雑誌論文#8、下図)。



次に GCGKO の肝臓で発現が増加・現象している遺伝子が胎生期から新生児期、さらに離乳期にかけてどのような発現変動を示すかを解析した。その結果アミノ酸代謝酵素のように新生児期には遺伝子発現に差がない一方で幼仔期には発現低下が明瞭となる遺伝子がある一方、胎生末期より新生児期にいたるまで GCGKO 肝臓において発現が高い液性因子として Wnt Inhibitory Factor 1 (WIF1) を同定した (下図)。



そこで、WIF1 発現ベクターを構築して培養細胞に導入し、その培養上清を panNET 細胞に

添加したうえで細胞の増殖を解析したが、WIF1を含む培養上清は、明らかな細胞増殖促進活性を示さなかった。バキュロウイルスを用いて発現した WIF1 組換えタンパク質を用いた実験を行っても、培養上清と同様に、細胞増殖促進活性は認められなかった。以上より WIF1 が α 細胞増殖制御因子である可能性は低いと結論した。

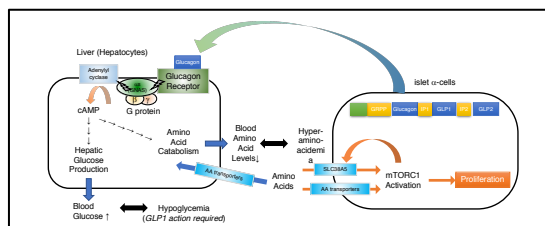
これまでも、我々は、GCGKO の肝臓においては、アミノ酸を糖新生の基質へと転換するセリンデヒドロラーゼなどのアミノ酸代謝酵素（異化酵素）遺伝子の発現が低下しているため、アミノ酸異化が停滞すること、さらにその結果として血中アミノ酸濃度が上昇することを明らかとして報告してきた (Watanabe C, Hayashi Y et al 2012 Diabetes)。前ページに示したデータのようにアミノ酸代謝関連遺伝子の GCGKO における発現変化は胎生期や新生児期にはみとめられない。一方、 α 細胞の増殖促進は出生時期にはすでに認められる。しかしながら、GCGKO と対照マウスの間の α 細胞数の差は、出生後も加速的に広がっていく。これらの結果から、アミノ酸自体が α 細胞の増殖促進因子の一つとして乳児期～離乳期以降に作用する可能性は十分に考えられた。

そこで、アミノ酸濃度が高い Leibovitz L-15 培地における panNET 細胞の生存・増殖を検証したところ、Dulbecco's Modified Eagle Medium 培地における培養よりも細胞生存率の改善傾向が認められ、高いアミノ酸濃度が α 細胞の生存・増殖に対して促進的に作用している可能性が示唆された。そこでさらに同培養系において 20 種類のアミノ酸のうちのいずれかが panNET 細胞の増殖に関与するかを絞り込むための実験を試行錯誤したが、明瞭な結果は得られなかった。

細胞培養系における実験においては明確な結果が得られなかったため、動物実験により、アミノ酸が panNET 細胞あるいは α 細胞の増殖制御因子である可能性を示唆する状況証拠を収集することとした。この目的のために、アミノ酸代謝に関わる遺伝子群の発現が、どのような日周変動を示すか、さらに、グルカゴンによるアミノ酸代謝制御にどのような細胞内シグナル伝達機構が関与するか、高蛋白質食負荷により血中アミノ酸濃度がどのような影響を受けるかに関する解析を行った。

その結果、グルカゴンがアミノ酸代謝の恒常性維持に極めて重要な役割を果たしていることが明確になってきた。これらの結果は部分的に雑誌論文#1 や学会等において発表するとともに (右上図)、現在論文準備中である。最近、海外のグループからもアミノ酸が α 細胞の増殖制御において重要であることを示す報告がなされており (Dean ED et al, Cell Metab 2017, Kim J et al, Cell Metab 2017)、アミノ酸が α 細胞の増殖因子として作用する可能性は、その詳細な機構は不明ながら、確実性を増している。一方、アミノ酸以外の増殖制御因子

が存在する可能性は、棄却されていないため、今後も α 細胞増殖制御因子の探索を進める必要は高いと考えられる。



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 9 件)

(1) Hayashi Y, Seino Y: Regulation of amino acid metabolism and alpha cell proliferation by glucagon. Journal of Diabetes Investigation 査読あり in press, 2018

(2) Suzuki K, Iwasaki K, Murata Y, Harada N, Yamane S, Hamasaki A, Shibue K, Joo E, Sankoda A, Fujiwara Y, Hayashi Y and Inagaki N*: Distribution and hormonal characterization of primary murine L cells throughout the gastrointestinal tract: Journal of Diabetes Investigation 査読あり 9: 25-32, 2018

(3) Maekawa R, Seino Y, Ogata H, Murase M, Iida A, Hosokawa K, Joo E, Harada N, Tsunekawa S, Hamada Y, Oiso Y, Inagaki N, Hayashi Y and Arima H: Chronic high-sucrose diet increases fibroblast growth factor 21 production and energy expenditure in mice. The Journal of Nutritional Biochemistry, 査読あり 49: 71-79, 2017

(4) Seino Y, Maekawa R, Ogata H, Hayashi Y. Carbohydrate-induced secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1. Journal of Diabetes Investigation, 査読あり 7 (suppl. 1):27-32, 2016

(5) Iida A, Seino Y, Fukami A, Maekawa R, Yabe D, Shimizu S, Kinoshita K, Takagi Y, Izumoto T, Ogata H, Ishikawa K, Ozaki N, Tsunekawa S, Hamada Y, Oiso Y, Arima H, Hayashi Y. Endogenous GIP ameliorates impairment of insulin secretion in proglucagon-deficient mice under moderate beta cell damage induced by streptozotocin. Diabetologia, 査読あり 59: 1533-1541, 2016

(6)林 良敬、高野悠子、前川龍也、清野裕介：グルカゴンの全身作用「増刊：新時代の臨床糖尿病学-より良い血糖管理をめざして-」日本臨床 査読なし 74(増1)：131-135, 2016

(7)Takagi Y, Kinoshita K, Ozaki N, Seino Y, Murata Y, Oshida Y, Hayashi Y: Mice deficient in proglucagon-derived peptides exhibit glucose intolerance on a high-fat diet but are resistant to obesity. PLoS One 査読あり 10(9): e0138322, 2015

(8)Takano Y, Kasai K, Takagishi Y, Kikumori T, Imai T, Murata Y, Hayashi Y: Pancreatic neuroendocrine tumors in mice deficient in proglucagon-derived peptides. PLoS One 査読あり 10(7): e0133812, 2015

(9)林 良敬：グルカゴンの真の特異的作用は何か？-グルカゴン作用欠損モデルの表現型-「特集：グルカゴン革命 -糖尿病の真の分子病態を追い！-」実験医学 査読なし 33(6):897-902, 2015.

[学会発表] (計 18 件)

①林 良敬：糖尿病グルカゴン主因論を再考する：グルカゴンの真の特異的生理作用は何か？第 34 回中国地区インスリン研究会、2018.1 岡山

②林 良敬：基調講演：アミノ酸代謝制御ホルモンとしてのグルカゴン シンポジウム侵襲下の各疾患における除脂肪体重とタンパク質必要量 第 21 回日本病態栄養学会年次学術集会、2018.1 京都

③林 良敬：グルカゴンとアミノ酸による α 細胞増殖制御、学術講演会-細胞から糖尿病を考える- 2017.9. 東京

④林 良敬：グルカゴンによる α 細胞増殖の制御とアミノ酸代謝 Islet Biology '17、2017.7. 東京

⑤林 良敬、清野祐介、飯田淳史、深見亜矢子、前川龍也、杉山知里、高木佑輔、木下圭太、尾崎信暁、有馬 寛：グルカゴン作用不全とインクレチン シンポジウム インクレチンの可能性について探る 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.5. 名古屋

⑥林 良敬：グルカゴンの特異的生理作用はアミノ酸代謝と α 細胞増殖の制御である シンポジウム Hot topics 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.5. 名古屋

⑦前川龍也、高野悠子、清野佑介、村瀬正敏、有馬 寛、林 良敬：高蛋白質食負荷は、グルカゴン分泌増加を介して肝臓のアミノ酸代

謝を規定する 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.5. 名古屋

⑧小林雅樹、菊池 司、稲垣貴之、三重野園理、宮地 淳、林 良敬、佐々木務、北村忠弘新規開発測定系を用いた血糖変化に伴うグルカゴン変動の再検証 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.5. 名古屋

⑨林 良敬：グルカゴンの真の特異的生理作用は何か：グルカゴン遺伝子欠損動物モデルが明らかにしたこと 朝日生命成人病研究所 第 167 回分泌セミナー 2017.2 東京

⑩Hayashi Y: Glucagon is a regulator of amino acid metabolism and α cell proliferation. Japan Diabetes Innovation Summit 2016 2016.11. (Kyoto, Japan)

⑪林 良敬：グルカゴン遺伝子欠損マウスが明らかにするグルカゴン作用 第 4 回北関東グルカゴン研究会、2016.8. 東京

⑫林 良敬：グルカゴンの特異的作用：代謝制御と膵島内分泌細胞増殖制御 第 28 回「糖尿病と血管合併症 up-to-date」、2016.6 大阪

⑬前川龍也、清野祐介、尾方秀忠、飯田淳史、村瀬正敏、城尾恵里奈、鈴木和代、原田範雄、細川香里、丹羽靖浩、泉本貴子、恒川 新、濱田洋司、林 良敬、稲垣暢也、有馬寛：高炭水化物食の慢性摂取における GIP 分泌と作用に対する検討第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016.5. 京都

⑭飯田淳史、清野祐介、前川龍也、村瀬正敏、矢部大介、清水 忍、秋田貴子、恒川 新、濱田洋司、林 良敬、稲垣暢也、有馬寛：DPP-4 阻害薬は、グルカゴン欠損下では膵 β 細胞障害時においても、GIP によるインスリン分泌増強を介して耐糖能を改善させる第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016.5. 京都

⑮小林雅樹、井田隆徳、菊池 司、林 良敬、佐々木務、北村忠弘：新規開発測定系を用いた血糖変化に伴うグルカゴン分泌動態の解析 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016.5. 京都

⑯林 良敬：シンポジウム “アミノ酸研究の新展開：細胞シグナルとしての動的制御機構” BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学大会合同大会、2015.12 神戸

⑰林 良敬：細胞増殖と代謝の制御におけるグルカゴンの特異的作用、第一回生体調節研究所内分泌代謝シンポジウム、2015.11. 前橋

⑱ SEINO Yusuke, IIDA Atsushi, FUKAMI Ayako, OZAKI Nobuaki, HAYASHI Yoshitaka:

Glycemic control by islet-derived GIP:
Analysis of mice deficient in the
glucagon gene. -シンポジウム “膵ホルモン
から考える血糖制御破綻のメカニズム-
Revisit of islet endocrine function and
its dysfunction- “- 第58回日本糖尿病学
会年次学術集会、2015.5. 下関

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 良敬 (HAYASHI YOSHITAKA)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号：80420363

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者