

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21198

研究課題名(和文) 膵細胞脱分化機構解明に基づく糖尿病治療の研究

研究課題名(英文) The investigation of the mechanism of beta cell dedifferentiation aiming for new therapy of diabetes mellitus

研究代表者

椎木 幾久子(阿望幾久子)(SHIINOKI, Kikuko)

山口大学・医学部・助教(寄附講座等)

研究者番号：60609692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Wolfram症候群は膵細胞の消失によりインスリン依存性糖尿病を発症する。分子病態として原因遺伝子WFS1の機能障害により引き起こされる小胞体ストレス及び酸化ストレス亢進が想定されている。本研究では、Wfs1欠損マウスの膵細胞は内分泌前駆様細胞に脱分化し、その一部は膵細胞に分化転換することを明らかにした。これらの膵細胞の変容は、ストレス応答分子Txnipを欠損させたWfs1:Txnip二重欠損マウスにおいて抑制され、糖尿病の発症が抑制された。本研究は、膵細胞脱分化が主因となり糖尿病を発症する疾患モデルを初めて明確に示すとともに、新規治療標的を同定した。

研究成果の概要(英文)：Wolfram syndrome, caused by the WFS1 gene mutations, is characterized by insulin-dependent diabetes mellitus. Genetically determined pancreatic cell loss results from augmented ER and oxidative stresses. This study revealed that in the Wfs1-deficient mice cells become dedifferentiated and revert to endocrine progenitor-like cells, and a subset of them takes cell fate. It was also demonstrated that genetic inhibition of Txnip, which is a stress response molecule involving in various cellular processes, maintains cell identity and completely prevents diabetes progression in the Wfs1-deficient mice. In this study, for the first time, we clearly showed a disease model that caused diabetes mainly due to cell dedifferentiation, and identified a novel therapeutic target.

研究分野：分子病態学

キーワード：糖尿病 膵細胞 脱分化 Wfs1

1. 研究開始当初の背景

近年、2型糖尿病は日本においても急増中である。中でも、その進展には進行性の細胞の機能低下、細胞量の減少が重要な役割を演じている。しかしながら、膵細胞不全の成因は十分には解明されておらず、そのため有効な治療法も確立されていない。

遺伝性多系統神経内分泌変性疾患である Wolfram 症候群はインスリン依存性糖尿病を主徴とする。疾患モデル *Wfs1* 欠損マウスでは、膵細胞が進行性に減少し、インスリン分泌不全に基づく糖尿病を来す。*WFS1* 蛋白は小胞体機能維持に関与しており、*Wfs1* 欠損膵島では高血糖を呈する以前より小胞体ストレス及び酸化ストレスが増大する。細胞内ストレスの増幅が *Wfs1* 欠損による膵細胞障害の本質的な原因と考えられるが、その詳細は十分には解明されていない。

申請者の予備的検討では、*Wfs1* 欠損による細胞消失の原因は細胞数の減少ではなく、未分化な細胞に変容し細胞としての性質を失っている可能性が示唆された。それらは脱分化した細胞であると考えられ、近年細胞脱分化は糖尿病における細胞不全の主要なメカニズムの1つであることが明らかになりつつある。しかしながら、その制御機構や病態における意義は不明である。

2. 研究の目的

Wfs1 遺伝子欠損マウスがストレス下における細胞脱分化を伴う細胞不全モデルであることを示し、膵細胞機能不全における細胞脱分化のより普遍的な意義を明らかにする。同時に、細胞脱分化を標的とした膵細胞保護に基づく2型糖尿病治療戦略の創出を目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Wfs1* 欠損マウスにおける膵細胞脱分化の解明

Wfs1 欠損マウスで認められる細胞消失が、脱分化に基づくものであることを明らかにするため、YFP で永久標識した細胞の運命追跡を行った。具体的には、*Wfs1* 欠損マウスと Rosa26 lox-stop-lox YFP マウスおよび RIP-Cre マウスを交配し、*Wfs1*^{-/-};Rosa26-YFP;RIP-Cre を作出する。このマウスでは、細胞が特異的に YFP で標識されるため追跡調査を行うことが可能である。このマウスより採取した膵組織切片を用いて、インスリンあるいは膵内分泌細胞分化マーカーに対する抗体による免疫組織染色を行い細胞がその性質を失っていく過程を組織学的に評価した。

(2) 細胞変容における高血糖の意義の解明
Agouti 変異 (*A^y/a*) の導入により過食・肥満をきたし、*Wfs1* 欠損マウスより早期に高血糖を呈する *Wfs1*^{-/-}; *A^y/a* マウスにおいて、細胞非依存的 (SGLT2 阻害剤投与) に高血糖を是正した。高血糖が細胞変容に及ぼす影響

を組織学的に解析した。

(3) 細胞脱分化に関わる因子の同定

Wfs1 欠損膵島ではストレス応答分子 Thioredoxin-interacting protein (Txnip) の発現が顕著に亢進している。*Wfs1*:*Txnip* 二重欠損マウスおよび *Wfs1*^{-/-}; *Txnip*^{-/-}; *Rosa26-YFP*; *RIP-Cre* マウスを作出し、Txnip 欠損による細胞脱分化への影響を組織学的に評価した。また、単離膵島を用いて mRNA・タンパク質発現およびメタボローム解析、細胞内エネルギー代謝活性の測定を行った。

4. 研究成果

(1) *Wfs1* 欠損マウスにおける膵細胞脱分化の解明

細胞の運命追跡において、3週齢では野生型、*Wfs1* 欠損マウス共に YFP 陽性細胞のほぼ全てがインスリン陽性であった。*Wfs1* 欠損マウスが高血糖発症前 20週齢では、インスリン顆粒が減少あるいは消失した YFP 陽性細胞が増加し、その一部にグルカゴンの発現を認めた。この時、成熟細胞分化能維持に重要な MafA 陽性細胞が著減し、膵内分泌前駆細胞マーカーの Neurogenin3 陽性細胞が出現した。すなわち、*Wfs1* 欠損細胞は膵内分泌前駆様細胞に脱分化し、さらには細胞から細胞へ運命転換することが明らかとなった。これらの現象は高血糖発症後 40週齢でより顕著となった。*Wfs1* 欠損マウスにおいて細胞脱分化と病態進展との関連が示唆される。

(2) 細胞変容における高血糖の意義の解明

Wfs1^{-/-}; *A^y/a* マウスに対して細胞非依存的に高血糖を是正した結果、インスリン陽性細胞量の回復とともにグルカゴン陽性細胞の増加が抑制された。しかし、MafA 及び Neurogenin3 の発現には影響がなく、グルコース応答性インスリン分泌も回復しなかった。すなわち、細胞脱分化は高血糖から独立した現象であり、細胞脱分化と *Wfs1* 欠損のより直接的な関連が推察される。

(3) 細胞脱分化に関わる因子の同定

Wfs1 欠損膵島では小胞体及び酸化ストレスの亢進を認め、このことと脱分化誘導との関わりが推察される。細胞は通常より ATP 需要が高く、加えて *Wfs1* 欠損細胞ではストレス応答による一層の ATP 消費亢進が推察され、10-12週齢 *Wfs1* 欠損マウスの膵島では、解糖系中間代謝物及びピルビン酸が増加する。しかし、アセチル CoA 及びクエン酸の低下を認め、すなわち TCA 回路が減弱しており、その結果 ATP 含量が低下した。*Wfs1*:*Txnip* 二重欠損マウスでは、これらのエネルギー代謝の改善とともに細胞の脱分化が抑制されており、細胞量が維持された。50週齢までの観察において *Wfs1*:*Txnip* 二重欠損マウス全個体において糖尿病の発症が抑制された。ストレス病態での細胞内エネルギー代謝障害と脱分化誘導との関連における Txnip の

役割とその制御による脱分化抑制の可能性が示唆された。

本研究では、Wolfram 症候群では 細胞脱分化が中心病態となり糖尿病を発症することが明らかとなった(図)。

細胞脱分化が主因となり糖尿病を発症する疾患モデルを初めて明確に示すとともに、細胞内ストレスによる脱分化誘導機構の解明に基づき新規治療標的を同定した。Wolfram 症候群は特異な疾患であるが、*WFS1* 遺伝子は 2 型糖尿病遺伝子としても認知されており、細胞不全の成因には共通する部分も多い。そのため、本研究成果は 2 型糖尿病における 細胞の病態理解にも貢献すると考えられる。



図. Wolfram症候群における膵β細胞不全の病態

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 2 件)

Kondo M, Tanabe K, Amo-Shiinoki K, Hatanaka M, Morii T, Takahashi H, Seino S, Yamada Y, Tanizawa Y. Activation of GLP-1 receptor signaling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome. *Diabetologia*. 査読有, In press, 2018.

Tanabe K, Amo-Shiinoki K, Hatanaka M, Tanizawa Y. Interorgan crosstalk contributing to β -cell dysfunction. *J Diabetes Res*. 査読有, 2017:3605178, 2017. DOI: 10.1155/2017/3605178

[学会発表](計 18 件)

椎木幾久子. Wolfram 症候群をモデルとした細胞内ストレスによる膵 細胞可塑性制御の解明. 第 61 回日本糖尿病学会学術集会, 2018

椎木幾久子, 田部勝也, 幡中雅行, 谷澤幸生. *Wfs1* 欠損による膵 細胞のエネルギー代謝不全と脱分化. 第 21 回日本病態栄養学会年次学術集会, 2018

Yukio Tanizawa, Kikuko Amo-Shiinoki, Katsuya Tanabe, Masayuki Hatanaka, Risa Harano, Hiroshi Masutani. ER and oxidative stresses induce and *Txnp1* knock-out prevents β -cell dedifferentiation and failure in Wolfram Syndrome. IDF Congress 2017, 2017

椎木幾久子, 田部勝也, 幡中雅行, 谷澤幸生. *Wfs1* 欠損マウスにおける膵 細胞不全の病態形成に対する代謝ストレスの意義. 第 38 回日本肥満学会, 2017

田部勝也, 椎木幾久子, 幡中雅行, 谷澤幸生. Wolfram 症候群において膵 細胞脱分化は糖尿病の成因として重要である. 第 32 回日本糖尿病合併症学会, 2017

椎木幾久子, 田部勝也, 幡中雅行, 谷澤幸生. *Wfs1* 欠損による膵 細胞のエネルギー代謝不全と脱分化. 第 67 回日本体質医学会総会, 2017

Kikuko Amo-Shiinoki, Katsuya Tanabe, Masayuki Hatanaka, Risa Harano, Hiroshi Masutani, Yukio Tanizawa. Genetic deficiency of *Txnp1* prevents diabetes progression in the mouse model of Wolfram syndrome. American Diabetes Association's 77th Scientific Sessions, 2017

椎木幾久子, 田部勝也, 幡中雅行, 近藤学, 西村渉, 木村徳宏, 星井嘉信, 池田栄二, 水上浩哉, 八木橋操六, 佐藤吉彦, 駒津光久, 谷澤幸生. ヒトの糖尿病において細胞脱分化は 細胞不全に関連する. 第 60 回日本糖尿病学会学術集会, 2017

田部勝也, 椎木幾久子, 幡中雅行, 谷澤幸生. Wolfram 症候群において膵 細胞脱分化は糖尿病の成因として重要である. 第 90 回日本内分泌学会学術総会, 2017

椎木幾久子, 田部勝也, 幡中雅行, 谷澤幸生. Wolfram 症候群モデルマウスでは膵 細胞脱分化を来す. 第 66 回日本体質医学会総会, 2016

¹¹ Kikuko Shiinoki, Katsuya Tanabe, Masayuki Hatanaka, Manabu Kondo, Yukio Tanizawa. Beta cell dedifferentiation plays a central role in beta cell failure in a model of Wolfram syndrome. American Diabetes Association's 76th Scientific Sessions, 2016

¹² 椎木幾久子, 田部勝也, 幡中雅行, 近藤学, 谷澤幸生. *Wfs1* 欠損マウスにおける膵 細胞脱分化とその意義の解明. 第 59 回日本糖尿病学年次学術集会, 2016

¹³ 椎木幾久子, 田部勝也, 幡中雅行, 秋山勝, 谷澤幸生. *Wfs1* 欠損マウスにおける膵 細胞脱分化とその意義の解明. 第 27 回分子糖尿病学シンポジウム, 2015

¹⁴ Katsuya Tanabe, Kikuko Amo-Shiinoki, Masayuki Hatanaka, Syota Kagawa, Yukio Tanizawa. *Wfs1*-deficiency causes β -cell dedifferentiation associated with enhanced ER stress and oxidative stress, independently of hyperglycemia. KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology, 2015

¹⁵ Yukio Tanizawa, Kikuko Shiinoki, Katsuya Tanabe, Masayuki Hatanaka. *Wfs1*-deficiency causes beta-cell dedifferentiation associated with

enhanced ER stress and oxidative stress, independently of hyperglycemia. 7th AASD Scientific Meeting and Annual Scientific Meetings of the Hong Kong Society of Endocrinology, Metabolism and Reproduction. 2015

¹⁶ Kikuko Shiinoki, Katsuya Tanabe, Masayuki Hatanaka, Yasuharu Ohta, Yukio Tanizawa. Wfs1-deficiency causes beta-cell dedifferentiation associated with enhanced ER stress and oxidative stress, independently of hyperglycemia. American Diabetes Association's 75th Scientific Sessions, 2015

¹⁷ Kikuko Shiinoki, Katsuya Tanabe, Masayuki Hatanaka, Yasuharu Ohta, Yukio Tanizawa. Wfs1-deficiency compromises beta cell identity and results in loss of beta cell failure. The 2nd Japan-Korea Diabetes Forum, 2015

¹⁸ 椎木幾久子, 田部勝也, 幡中雅行, 永尾優子, 太田康晴, 谷澤幸生. WFS1 欠損脾島における膵細胞脱分化機構の解析. 第 58 回日本病態栄養学会年次学術集会, 2015

〔図書〕(計 3 件)

椎木幾久子, 田部勝也, 谷澤幸生. 医学出版. 月刊糖尿病 Vol.9 No.7, 2017, 110(36-44)

田部勝也, 松永仁恵, 椎木幾久子, 谷澤幸生. 医学出版. 月刊糖尿病 Vol.9 No.8, 2017, 110(45-53)

椎木幾久子, 田部勝也, 谷澤幸生. 科学評論社. 内分泌・糖尿病・代謝内科 第 44 巻第 2 号, 2017, 174(170-174)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎木 幾久子 (SHIINOKI, Kikuko)
山口大学・医学部・助教(寄附講座)
研究者番号: 60609692