

令和元年6月3日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08488

研究課題名(和文) 膵島内 細胞間コミュニケーションにおける一次繊毛の役割

研究課題名(英文) The role of primary cilia on cell to cell communication in pancreatic islets

研究代表者

向 英里 (Mukai, Eri)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：60362539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵島内に存在する膵細胞は隣接した細胞間で機能的に同調し、必要に応じたインスリン分泌応答が発揮される。しかし、そのメカニズムは不明である。膵島内の細胞間における機能的同調作用に一次繊毛が関与している可能性を検討した。膵細胞株の単層培養におけるグルコース応答性インスリン分泌は擬膵島にすることで増強した。またソマトスタチンによるインスリン分泌抑制は、擬膵島で効果が増強していた。一次繊毛を欠損すると、擬膵島におけるソマトスタチンによるインスリン分泌抑制増強効果は減少した。したがって、隣接する細胞間での機能的同調作用に一次繊毛が関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の2型糖尿病では膵細胞からのグルコースによるインスリン分泌応答が選択的に低下していることから、厳密なインスリン分泌応答の制御機構の解明や糖尿病におけるインスリン分泌障害のメカニズムを明らかにすることは糖尿病の治療につながる。今回の検討により、これまで明らかにされていなかった細胞膜上の小器官である一次繊毛の新たな役割が明らかとなったことから、インスリン分泌機構の研究分野に新たな研究アプローチが開けたものと確信する。

研究成果の概要(英文)： Pancreatic b cells within islets synchronize functionally by cell to cell communication, therefore, necessary and enough insulin secretory response is observed. However, the regulatory mechanism has not been unclear. We investigated the involvement of primary cilia on synchronized secretory function of b cells within islets. Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) from pseudoislets of b cells was increased more than that from b cells in monolayer. Inhibitory effect of somatostatin on GSIS was augmented in pseudoislets compared with b cells in monolayer. Defect of primary cilia resulted in a decrease in inhibitory effect of somatostatin on GSIS in pseudoislets. These results indicate that primary cilia is involved in synchronized secretory function of b cells within islets.

研究分野：基礎医学、代謝学、生理学

キーワード：細胞間情報伝達 インスリン分泌 糖代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖の恒常性は膵臓細胞から分泌されるインスリンによって厳密に保たれているが、血糖上昇に応じた適切な時期かつ量のインスリン分泌が重要となる。我が国の2型糖尿病ではグルコースに対するインスリン分泌が選択的に低下しており、研究代表者らはこれまで糖尿病における膵細胞インスリン分泌不全の成因や糖尿病状態下での治療薬の有効性について明らかにしてきた。膵細胞は数千個の細胞が凝集して構成される内分泌器官である膵島として存在するが、*in vitro* で処理を施し単一細胞に分散させるとインスリン分泌能は極端に低下する。個々の細胞は機能的にヘテロな集団であり、凝集体になることで機能的同調作用が確立され、良好な分泌機能応答がもたらされると考えられる。しかしながら以前よりこの現象は認められているものの、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない。研究代表者らは以前、この細胞間機能同調作用にギャップ結合が関与していると想定し、細胞に主に発現するコネクシン36のドミナントネガティブ変異体ならびに正常体を過剰に発現させ、コネクシン36のインスリン分泌機能への関与について検討したところ、関与は認められたが大きいものではないという判断に至った。ギャップ結合のようなヘテロチャネルの場合、他のコネクシンの補完が推定されるので、コネクシン単一分子の機能的役割の解明は難しいと考えられる。生体組織内の細胞は細胞接着分子により強固で特異的に接着しているが、細胞の再凝集においてもこの細胞接着分子が関与している。細胞における細胞接着分子の発現を低下させると膵島内の細胞の配置や他の内分泌細胞との比率に変化が生じることから、細胞接着分子は細胞の分化や増殖、細胞極性、組織細胞構築配置に不可欠な存在であると言える。細胞極性形成には細胞接着分子のみならず、細胞膜上に1本生えたアンテナのような小器官である繊毛が中心的な役割を果たしている。一次繊毛(プライマリーシリア)は100年以上前からその存在が知られており、この一次繊毛の欠損や機能異常は嚢胞性腎疾患など糖尿病を含めた多岐にわたる遺伝子性疾患すなわち繊毛病(ciliopathy)を生じる。近年、Gタンパク質共役型受容体のいくつかがこの一次繊毛に局在することが知られていることなどから、一次繊毛は細胞外のシグナルを感知するセンサーとして機能し、化学および機械刺激や様々なシグナル分子を受容し細胞内へ伝達することがわかってきた。また最近の報告では、その繊毛膜状に細胞接着因子を発現し、細胞外マトリックスや隣接細胞に接着していることが明らかにされている。これらのことから、一次繊毛が隣接した細胞間の接着に関与し、何らかのパラクライン様のシグナル伝達を担っていると考えられる。膵島では一次繊毛関連遺伝子変異または欠損マウスにおいて、膵島の減少やインスリン産生低下などが報告されているが、分泌機能応答に対する一次繊毛の役割はわかっていない。また、膵島においてGPCRであるソマトスタチン受容体3が一次繊毛に局在していることが示されているが、その役割や生理的意義は不明である。以上のことから、本研究では、膵細胞における一次繊毛の役割について細胞間コミュニケーションという観点から機能学的ならびに形態学的に解析する。

### 2. 研究の目的

膵細胞における一次繊毛の機能学的および形態学的役割を解明するために、インスリン分泌機能において、特に細胞間の相互的な機能同調作用をもたらす高度な機能制御機構に一次繊毛がどう関わっているか、その制御機構について明らかにする。これらの検討により、膵細胞の一次繊毛の生理的意義を解明し、さらには糖尿病発症への関与について明らかにすることを旨とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 膵島内分泌細胞における一次繊毛の発現確認

一次繊毛は膵臓では外分泌細胞には発現せず膵島や胆管に発現していることが知られているので、まず膵島における一次繊毛の発現について、多重免疫染色を行い確認する。

膵細胞株MIN6細胞において、単層培養に比べ、凝集体を作らせた擬膵島のほうがはるかにグルコースに対する分泌応答が良い。研究代表者らが構築した擬膵島作製法は細胞を三次元ドロップ培養する方法で、これまでの手法より細胞数が規定できること、サイズが均一で球状であること、細胞間の接着が強固であることが利点である。MIN6細胞の単層培養において一次繊毛の発現を確認し、その後三次元ドロップ培養により作製する擬膵島において、その発現量および空間的発現位置の変化についてreal-time PCRや多重免疫染色で検討する。

#### (2) 一次繊毛のインスリン分泌機能への関与に関する検討

一次繊毛関連因子のうち発現量が多いあるいは変化が大きいものに関して、MIN6細胞のその因子をsi-RNAなどによりノックダウンし擬膵島を作製して、通常の擬膵島からのインスリン分泌応答と比較検討し、一次繊毛の分泌機能への関与を明らかにする。

#### (3) 一次繊毛におけるGPCR発現と分泌機能への影響に関する検討

MIN6細胞におけるパラクラインに関連する因子のGPCR(ソマトスタチン受容体など)の発現をreal-time PCRや多重免疫染色で検討することにより、一次繊毛上のGPCR発現を確認する。すでに確認できているソマトスタチン受容体に関して、ソマトスタチンによるインスリン分泌応答が一次繊毛関連因子をノックダウンすることにより変化するかどうかを単層培養ならびに

擬膵島からの分泌を検討することにより、GPCRの一次繊毛に存在する意義について明らかにする。

#### 4. 研究成果

まず、ラットやマウスの膵島組織ならびに膵細胞株 MIN6 細胞における一次繊毛の発現を免疫染色にて検討したところ、どちらにおいても一次繊毛の発現が確認された(図1)。また、一次繊毛関連因子および一次繊毛に局在するソマトスタチン受容体について、ラットより単離した膵島、ラット膵細胞株 INS-1 細胞単層培養および INS-1 細胞擬膵島での発現量の比較を real-time PCR で検討したところ、Bbs4, Ift88, Somatostatin receptor 3 において単層培養より擬膵島でその発現が亢進していることが示された(図2A)。一方、マウス膵細胞株 MIN6 細胞の単層培養と擬膵島での発現量を比較したところ、Ift88 において擬膵島での発現が更新している傾向がみられたが、それ以外は大きな差は認められなかった(図2B)。これらのことより、膵細胞が細胞集団塊となることで一次繊毛の発現自体には大きな影響を及ぼさないことが示された。

次に、インスリン分泌機能について、MIN6 細胞の単層培養と擬膵島で比較検討した。単層培養でみられるグルコース応答性インスリン分泌は、擬膵島にすることでよりその機能が高まることが確認された(図3A)。また、ソマトスタチンによりグルコースによるインスリン分泌増強は抑制されるが、その抑制が単層培養でみられるものより擬膵島での抑制の方がより低濃度でみられ、効果が増強していることが明らかとなった(図3B)。さらに、一次繊毛微小管重合を阻害するノコダゾールで処理した後、同様にインスリン分泌機能を検討した。単層培養においては、ノコダゾール処理によりグルコースによる分泌増強やソマトスタチンによる分泌抑制には変化がなかった(図4A)。一方、擬膵島においてはノコダゾール処理により、グルコースによるインスリン分泌増強は減少する傾向を示し、またソマトスタチンによる分泌抑制は大きく減少することが明らかとなった(図4B)。したがって、膵細胞は細胞集団塊になることでインスリン分泌機能が増強すること、一次繊毛上にその受容体が局在するソマトスタチンによる抑制が増強すること、さらに一次繊毛の形成を阻害するとその効果が減少することが明らかとなり、隣接する細胞間での機能的同調作用に一次繊毛が関与していることが示された。

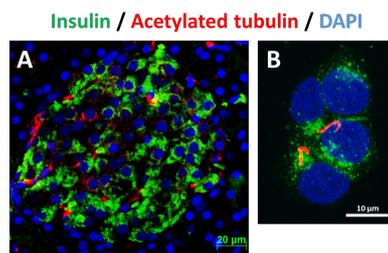


図1. 膵島(A)およびMIN6細胞(B)における一次繊毛の発現

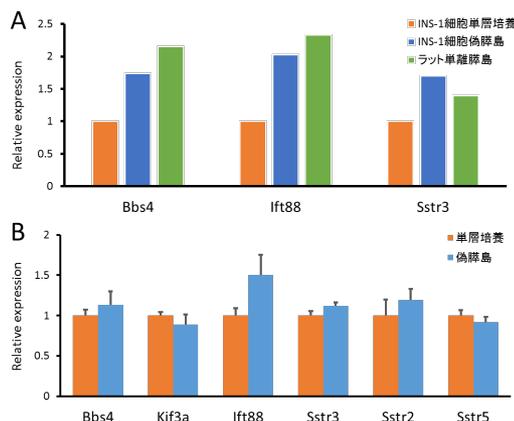


図2. ラット(A)およびマウス(B)の膵島とβ細胞における一次繊毛の発現

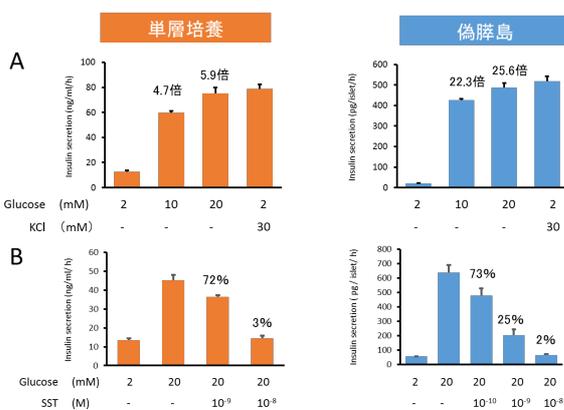


図3. 単層培養と擬膵島におけるグルコース応答性インスリン分泌(A)とソマトスタチンによる抑制(B)の比較

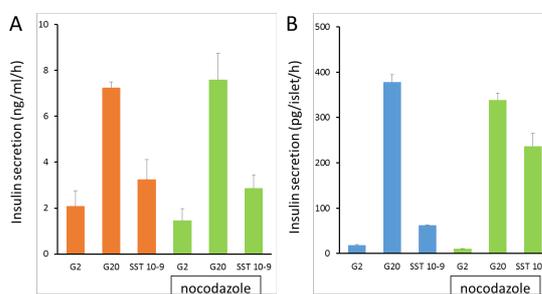


図4. 単層培養(A)と擬膵島(B)におけるインスリン分泌に対する一次繊毛欠損の効果

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

(1) Kimura H, Ogawa Y, Fujimoto H, Mukai E, Kawashima H, Arimitsu K, Toyoda K, Fujita N, Yagi Y, Hamamatsu K, Murakami T, Murakami A, Ono M, Nakamoto Y, Togashi K, Inagaki

N, Saji H. Evaluation of 18F-labeled exendin(9-39) derivatives targeting glucagon-like peptide-1 receptor for pancreatic  $\alpha$ -cell imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018. 26(2): 463-469. 査読有  
doi: 10.1016/j.bmc.2017.12.007.

(2) Ogura K, Ogura M, Shoji T, Sato Y, Tahara Y, Yamano G, Sato H, Sugizaki K, Fujita N, Tatsuoka H, Usui R, Mukai E, Fujimoto S, Inagaki N, Nagashima K. Oral Administration of Apple Procyanidins Ameliorates Insulin Resistance via Suppression of Pro-Inflammatory Cytokine Expression in Liver of Diabetic ob/ob Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016. 64(46):8857-8865. 査読有  
doi: 10.1021/acs.jafc.6b03424

〔学会発表〕(計 12件)

(1) Takuma Nagata, Takumi Shimada, Tetsuya Okuyama, Mikio Nishizawa, Eri Mukai. White-skinned sweet potato stimulates insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress. 2019

(2) 浜口海人、深田壮太郎、長田拓馬、向英里、食後血糖値に対する低強度運動の抑制効果と BCAA の補強効果、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

(3) 島田拓実、Dinia R. Dwijayanti、長田拓馬、小山湧也、森川卓登、西澤幹雄、向英里、膵細胞からのインスリン分泌に対するゴーヤー抽出物脂溶性成分の増強効果、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

(4) 小山湧也、島田拓実、森川卓登、向英里、膵細胞インスリン分泌の増強機構における PKA と PKC のクロストーク、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

(5) 浜口海人、工藤雄博、向英里、低強度運動による食後血糖値の抑制効果と分岐鎖アミノ酸による補強効果、第 73 回日本体力医学会大会、2018 年

(6) 森川卓登、岡崎菜津乃、櫻井麻衣子、向英里、低強度運動の食後血糖値抑制効果とそれに高強度運動を加えた場合の抑制持続効果、第 73 回日本体力医学会大会、2018 年

(7) 小山湧也、田中咲帆、山上絵里、向英里、上肢および下肢でのチューブ運動による食後血糖値の抑制効果、第 73 回日本体力医学会大会、2018 年

(8) 浜口海人、岡崎菜津乃、田中咲帆、田中新理、小山湧也、島田拓実、長田拓馬、森川卓登、工藤雄博、向英里、エルゴメーターおよびチューブを用いた低強度運動による食後血糖値の抑制効果、第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、2018 年

(9) 工藤雄博、池上尊之、橋本里奈、向英里、里見潤、糖負荷後の血糖値に対する強度の異なる運動の効果について、第 72 回日本体力医学会大会、2017 年

(10) 工藤雄博、池上尊之、橋本里奈、向英里、里見潤、低強度運動が食後血中グルコース濃度に及ぼす影響、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017 年

(11) 向英里、Mechanism of pancreatic  $\beta$  cell failure from studies of several diabetic model mice、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年

(12) 佐藤広規、長嶋一昭、小倉雅仁、佐藤雄一、田原裕美子、小倉かさね、山野言、杉崎和、藤田直尚、龍岡久登、臼井亮太、向英里、藤本新平、稲垣暢也、Src は膵細胞グルコキナーゼ細胞内局在変化を介してグルコース代謝およびインスリン分泌調節に関与する、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし