

令和元年5月27日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08520

研究課題名(和文) 糖恒常性を担う膵細胞の反復性増殖と可塑性獲得のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of repetitive proliferation and plasticity acquisition of pancreatic beta cells: prerequisites for the maintenance of glucose homeostasis

研究代表者

三木 隆司 (MIKI, Takashi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50302568

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)：膵島の量と質の低下は糖尿病発症の主因である。この機序を解明する目的で、膵細胞特異的に細胞を誘導しその後の再生を解析する「膵島再生マウス」と膵細胞株の移植により膵細胞が過剰な状態を誘導する「擬膵島移植マウス」の2つのモデルを用いて膵島再生機構を解析した。解析の結果、膵島再生マウスでは反復性増殖が可能な細胞が膵島内に出現し、擬膵島移植マウスでは膵細胞過剰に応じて膵細胞に細胞死と脱分化が誘導されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病では、膵島量減少が発症に先行して出現し、発症後も進行する。しかし、現行の糖尿病治療薬では膵島の量と質の回復は期待できない。一方、もし膵島量の減少阻止や回復が可能になれば、これらが糖尿病の根治治療になる可能性がある。このような糖尿病の生成治療の確立には、膵島量の制御機構の解明が不可欠である。本研究により解明された膵島量調節機構は、将来の膵島再生による糖尿病治療法の確立に向けた学術的な基盤を与えるものであると考えている。

研究成果の概要(英文)：Deterioration of pancreatic islets in terms of their quantity and quality is the major cause for developing diabetes mellitus. To clarify its pathophysiology, we have established two lines of mouse models; islet regeneration mice and pseudoislet-transplanted mice. Islet regeneration mice were generated so as to express diphtheria toxin receptor specifically in pancreatic β -cells, whereas pseudoislet-transplanted mice were generated by transplanting pseudoislets made from pancreatic β -cell line MIN6 cells. Analyses of islet regeneration mice revealed that highly proliferative cells appeared in the islet after pancreatic β -cell depletion. In the pseudoislet-transplanted mice, pancreatic β -cells exhibited increased apoptosis and de-differentiation in the face of excessive exogenous pancreatic β -cells. These results indicated that quantity and quality of pancreatic β -cells is maintained through elaborate sensing of the demand of pancreatic β -cells in vivo.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 膵細胞 再生医学 インスリン

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

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は慢性の高血糖を特徴とする代謝疾患であるが、近年、膵島量の進行性の減少が発症の主因であることが示された。膵細胞量は、細胞死と細胞増殖の両者が均衡を保つことにより維持されており、健常人では膵細胞の細胞分裂によって膵島量が生涯に渡り保たれている。すなわち、ヒト成人でも膵細胞に膵島量を維持するに足る分裂能を有していると考えられる。一方糖尿病患者で膵島量維持が破綻する機序はほとんど分かっていない。特に、生体での膵細胞の幹/前駆細胞の存在の有無、膵島量の感知機構、膵細胞の増殖制御機構など、膵細胞量維持の根幹を成す現象についてはほとんど解明されていない。我々は膵細胞再生の解析に特化した新規膵島再生マウス (Morita, *Endocrine* 2016) を用いて膵島量の調節機構を解析し、その過程で、再生中の細胞分裂数を測定したところ、「分裂しない細胞数」は再生が進んでも減少しないことに気づいた。これは「膵細胞量は、成熟膵細胞のランダムな細胞分裂によって維持される (Nature, 2004)」という定説と矛盾しており、膵細胞の幹/前駆細胞の存在が示唆された。我々はこの仮説に基づきさらに解析を進め、再生膵島内に繰り返し細胞分裂を示す膵前駆細胞が存在することを見いだした。もし膵細胞の増殖を促進し、糖尿病患者の膵島量を回復させることができれば糖尿病を根治出来る可能性もある。そこで我々は、膵島量の制御機構の解析に特化したマウスモデルを用いて、膵前駆細胞の解析・同定と膵細胞の量の感知機構と増殖と分化の制御機構の解明を目指した。また、膵細胞は外分泌腺が大部分を占める膵臓の中に膵島という島状の細胞塊を形成して存在している。個々の膵島は互いに分散して存在しているが、それにもかかわらず、正常状態では各個体の膵島量はほぼ一定に維持されている。従って、膵細胞の量は何らかの機序で感知されその変化により膵島再生などが制御されていることが推測されるが、この感知機構は全く不明である。そこで、生体での膵細胞の量の感知機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

上記の通り、膵島量の制御機構は現在も多くが不明である。しかし、膵島量を非侵襲的に測定する方法は確立されておらず、ヒト研究で膵島量の制御機構を解析することは極めて困難である。すなわち、現時点では動物モデルを用いた実験を行い、摘出膵臓を用いて膵島量を形態学的に測定するのが唯一の解析法である。そこで我々は、膵島量の制御機構をマウスで解析する実験系を立ち上げた。具体的には、膵細胞に細胞死を誘導した後に活発な膵島再生が誘導されるマウス (膵島再生マウス) と膵細胞株である MIN6 細胞を 3 次元培養し作製した擬膵島を移植したマウス (擬膵島移植マウス) を用いて、膵島量の維持機構と、その破綻による糖尿病発症機序の解明を目指した。特に、解析の過程で膵島内に反復性の増殖を示す膵前駆細胞が存在することを見出した。そこで本研究で、(1)膵前駆細胞の増殖誘導の局所シグナル、(2)生体の膵島量感知機構、(3)膵細胞の生存維持機構と他の内分泌細胞へ分化する可塑性の獲得機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膵島再生マウスの解析

膵島再生マウスは膵細胞特異的にジフテリア毒素受容体を発現するマウスである (Morita, *Endocrine*, 2016)。このマウスに 8 週齢時にジフテリア毒素を投与し、膵細胞に細胞死を誘導し、その後の膵再生現象を観察した。膵島の再生過程を分子生物学的に解析する目的で、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法 (LCM 法) で再生膵島を回収する実験系の立ち上げを目指した。回収した再生膵島から mRNA を抽出し、膵細胞の細胞増殖、分化、再生に関連する遺伝子の発現を qPCR 法により定量解析した。

(2) 擬膵島移植マウス (SRT マウス) の解析

生体の膵島量調節メカニズムを解析する実験方法として、通常は、上記の膵島再生マウスや膵垂全摘マウスの様に「人為的に膵島量を減じて、その後の代償性の膵島再生を観察する」アプローチが取られる。我々はこれとは逆の発想で、過剰量の膵島量を付与した場合の膵島の変化を解析することにした。すなわち、膵細胞の機能を維持した腫瘍細胞株である MIN6 細胞を 3 次元培養し作製した擬膵島を、8 週齢のマウスの腎被膜下に移植 (SRT) した。このマウス (SRT マウス) を、移植後に様々なタイミングでサンプリングし、膵島の変化を解析した (図 1)。

(3) 膵細胞株 MIN6 細胞を用いた解析

SRT マウスの解析の結果、このマウスでは下記の通り、活発な細胞死が誘導されることが明らかになった。そこで、この細胞死誘導の分子メカニズムを解明する目的で、膵細胞株である MIN6 細胞を用いて、細胞の生存への関与が予想される因子を加えて、Dojindo の Cell Counting Kit-8 により細胞生存率を計測し、小胞体ストレスの関与を CHOP の遺伝子発現解析で評価した。

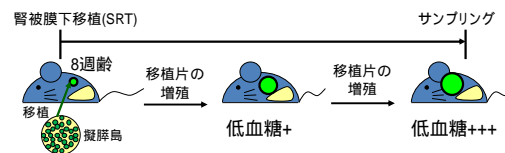


図1 擬膵島移植(SRT)マウス実験プロトコル

4. 研究成果

(1) 膵島再生マウスの解析

膵島再生マウスではジフテリア毒素投与による膵細胞死誘導後に活発な膵島再生が観察された。我々は、その分子機構を解析するには再生中の膵島を単離する必要があると考えた。当初、コラゲナーゼ法による酵素消化法による膵島単離による解析を行ったが、再生中の膵島は形態が大きく変化しており、従来のコラゲナーゼ法ではほとんど回収できなかった。また、回収される膵島は、野生型マウスで見られるようなサイズが大きく球形の形状を有するものが多く見られた。このことから、恐らくコラゲナーゼ法による膵島単離では、何らかの原因

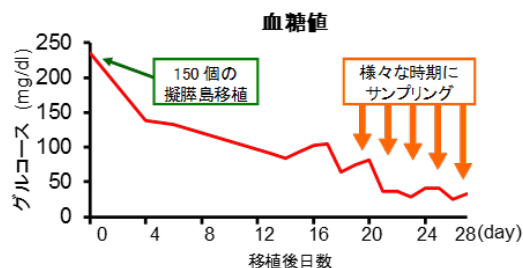


図2 SRTマウスの血糖変化

で、傷害を受けなかった膵島が選択的に回収されている可能性が強く疑われた。そこで我々は、膵島再生現象を解析するためには、破壊の程度が強い膵島も含めて膵島を単離する必要があると考えた。この目的に最も適した方法は、組織の薄切切片から顕微鏡下で膵島周囲をレーザー光で焼灼して、膵島を回収するレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法 (LCM 法) である。そこで、LCM 法による膵島単離を立ち上げる実験系の確立を目指した。ところが、膵臓は極めて RNase が豊富で、再生膵島は量的に極めて少ないため、様々なプロトコールの調整が必要であった。最終的に qPCR を施行することが可能な量と質の mRNA を再生膵島から抽出することが可能となった。LCM 法による膵島単離は今後様々な研究に応用可能であり、今後我々の技術が役立つことを期待したい。

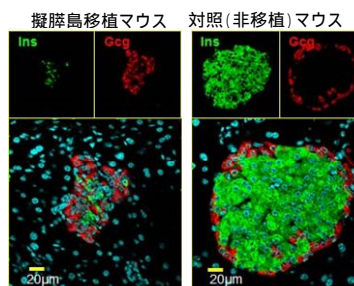


図3 SRTマウスの膵島の組織像

次に膵島再生マウスの再生膵島を LCM 法で回収し、種々の遺伝子発現を解析した。すると、遺伝子発現の変化はマウス個体により大きく異なることが明らかになった。

その原因を解析した結果、個々のマウスで膵細胞のジフテリア毒素による細胞死の誘導の程度に差があることが明らかになった。そのばらつき自体の原因は解明できていないが、本実験を効率良く進展させるために、細胞死誘導が要綱な個体を識別できることが必要であった。解析の過程で、十分な膵細胞死を誘導できた雄マウスではジフテリア毒素投与後に一過性の高血糖が誘導されることが明らかになり、我々は以降の全ての実験を雌マウスから雄マウスに変更して行った。すなわち、ジフテリア毒素投与後に血糖上昇が見られた雄マウスのみを解析に用いるプロトコールへと変更した。その後、膵島再生マウスの再生膵島の遺伝子発現を解析し、ジフテリア毒素投与後6日後に、インスリンの減少と細胞分裂マーカーである Ki67 の増加と共に、いくつかの未熟な膵細胞の存在を示唆する遺伝子の発現の増加を認めた。さらに我々は、膵島再生マウスとは別のモデルとして膵垂全摘マウスの膵島の遺伝子解析も行い、膵垂全摘マウスの膵島では Ki67 の増加は見られるものの、未熟な膵細胞のマーカー遺伝子の発現は変化せず、膵島の再生の様式には多様性が見られることが明らかになった。

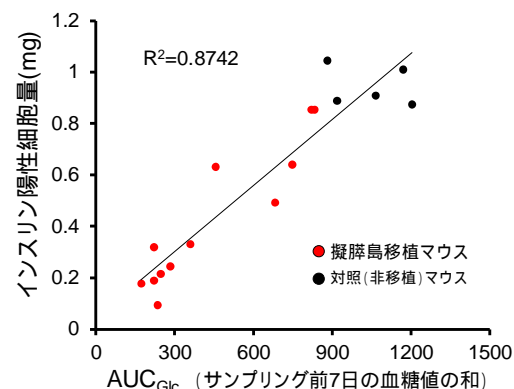


図4 SRTマウスの血糖値と膵細胞量の関係

(2) SRT マウスの解析

SRT マウスの血糖変動

我々は、過剰な膵島量を付与するマウスモデルとして SRT マウスを考案し、このマウスの膵島の変化を解析した。SRT マウスは移植後の膵細胞株の増殖により次第に低血糖を示した。図2に典型的な1例の経過を示すように進行性の低血糖を示した(図2)。そこで、種々のタイミングでマウスをサンプリングし、膵島の形態を解析した。

SRT マウスの膵島の組織像

SRT マウスの膵島の形態を観察したところ、高度な低血糖が持続した個体では、膵島のヘマトキシリン・エオジン染色像で膵島は萎縮し不整形を示した。そこで、SRT マウスの膵島をインスリンとグルカゴンの免疫染色を施行したところ、インスリン陽性の膵細胞数が減少し、インスリン染色性も減弱していた(図3)。これらの結果から、異所性に擬膵島を移植し膵島量を過剰にすると、内在性の膵細胞が減少することが明らかになった。膵細胞減少の機序を解

析する目的で、SRT マウスのサンプリング前 7 日の随時摂食時の血糖値の総和を計算し、マウスの膵島内のインスリン陽性細胞量との関係を調べてみたところ、両者の間には正の相関がみられ、血糖値の低下に伴い膵細胞量が減少することが明らかになった(図4)。このことから、血糖値が何らかの機序で感知され、膵島量が規定されていることが明らかになった。

さらに我々は、低血糖状態が持続すると膵島量が減少する機序に膵細胞死の亢進が関与しているのではないかと考え、SRT マウスの膵細胞における TUNEL 陽性細胞を計測した(図5)。すると、高度な低血糖が持続(AUC_{Glc}が300以下)したマウスでは膵細胞にアポトーシスが誘導されていることが明らかになった。一方、アポトーシスの頻度は、図3に示す膵細胞量の減少とは異なり、比較的軽度な低血糖状態では誘導されないことが明らかになり、低血糖状態での膵細胞量減少とアポトーシス誘導はそれぞれ別の機序を介して惹起されていることが明らかになった。

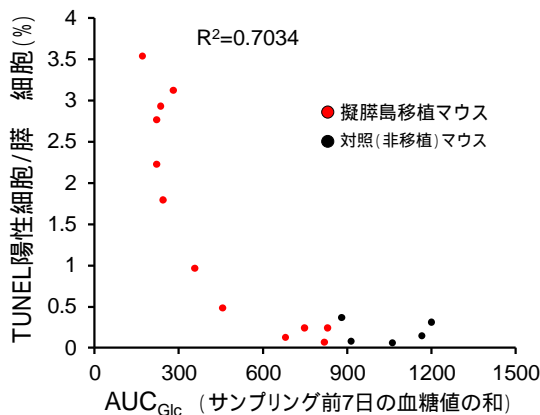


図5 SRTマウスの血糖値とアポトーシスの関係

(3) 膵細胞株 MIN6 細胞を用いた解析

次に我々は、高度低血糖を発症した擬膵島移植マウスの膵細胞で顕著なアポトーシスが誘導された機序を、分子レベルで解明する目的で、MIN6 細胞を用いた解析を行った。擬膵島移植マウスの病態を考慮し、アポトーシスの原因として、著明な低血糖自体の関与、低血糖により膵細胞の K_{ATP} チャネルの開口を介した脱分極の関与、低血糖により膵細胞からのインスリン分泌減少を介した膵島局所のインスリン濃度低下の関与を疑った。それぞれを検討する目的で、低濃度グルコース濃度培地での細胞培養、K_{ATP} チャネル開口薬である Diazoxide の添加、インスリン受容体アンタゴニストである HMNPA の添加、を行い、細胞生存率と小胞体ストレスマーカーである CHOP の発現を解析した(図6)。その結果、低濃度グルコース濃度培地での細胞培養では CHOP の発現は明らかに増加したものの、細胞の生存率の低下はごく軽度であり、低血糖が膵細胞の死を促進したことを示唆する結果は得られなかった。また、Diazoxide の添加は CHOP の発現をむしろ明らかに低下させ、細胞死も誘導しなかったことから、膵細胞の脱分極は細胞死の原因とはなっていないと考えられた。一方、HMNPA の添加により、CHOP 発現は軽度増加しただけであったが、著明な細胞死が誘導された。これらの結果から、低血糖によるインスリン分泌停止が膵島局所のインスリン濃度の低下を介し、膵細胞のアポトーシスが誘導されていると考えられた。

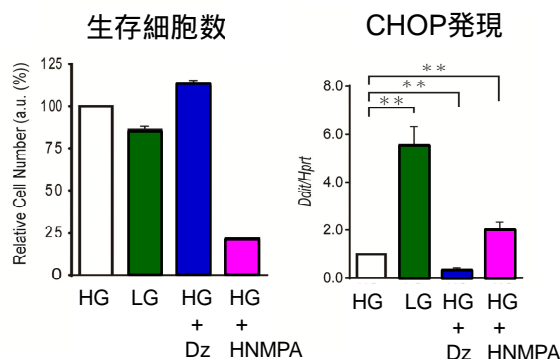


図6 MIN6細胞を用いた細胞の生存シグナルの解析

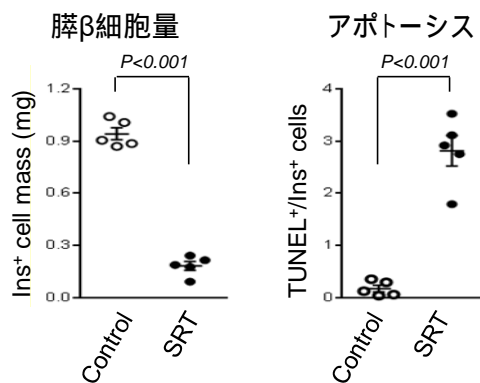


図7 SRTマウスの膵細胞量とアポトーシス

(4) 膵への膵細胞株 MIN6 細胞の移植実験

膵島局所のインスリン濃度の低下が、擬膵島移植マウスの膵細胞のアポトーシスの原因であるかどうかを直接的に証明する目的で、腎被膜下ではなく膵臓内にマトリゲルで懸濁して移植(IPT)した。するとこのマウス(IPTマウス)は、膵細胞移植後にSRTマウスと同様の低血糖を発症したが、IPTマウスの膵島ではSRTマウスと比較し、膵細胞のアポトーシスは減少していた(図7)。このことから、膵島局所のインスリンが膵細胞の生存に重要であることが明らかになった。IPTマウスの膵島を形態学的に解析したところ、インスリン発現を失った膵

細胞が多数存在することが明らかになった(図8)。さらにIPTマウスの膵島では、成熟した膵細胞のマーカであるMafAの発現が著明に低下しており、膵細胞は脱分化状態であることが明らかになった。

以上の結果から、膵細胞はインスリン需要を感知し膵島量をダイナミックに制御していること、膵細胞の生存には細胞局所のインスリンシグナルが必須であることが明らかになった。また、インスリンの需要を低下させると膵細胞に脱分化状態が誘導されることも明らかになった。これまで、膵細胞の分化・発生に関連する遺伝子の遺伝子組み換えなしに膵細胞の脱分化状態を誘導できた実験系はなく、我々のマウスモデルは膵細胞の脱分化機構を解明する上で、有用なモデルであると考えられた。

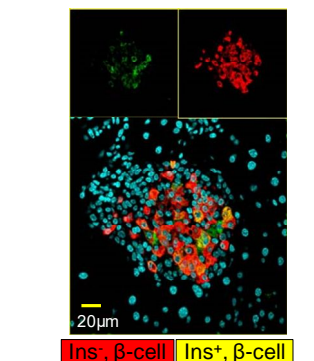


図8 IPTマウスの膵島像

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Lee, E.Y., Zhang, X., Miyamoto, J., Kimura, I., Taknaka, T., Furusawa, K., Jomori, T., Fujimoto, K., Uematsu, S., Miki, T. Gut carbohydrate inhibits GIP secretion via a microbiota/SCFA/FFAR3 pathway. *J Endocrinol* 239:267-76, 2018. 査読有

Watanabe, Y., Kishimoto, T., Miki, T., Seino, S., Nakaya, H., Matsumoto, A. Ectopic overexpression of Kir6.1 in the mouse heart impacts on the life expectancy. *Sci Rep* 8:11723, 2018. 査読有

Kitamoto, T., Sakurai, K., Lee E.Y., Yokote, K., Accili, D., Miki, T. Distinct roles of systemic and local actions of insulin on pancreatic β -cells. *Metabolism* 81:100-10, 2018. 査読有

Miki, T., Lee, E.Y., Eguchi, A., Sakurai, K., Sawabe, Y., Yoshida, T., Saito, K., Yokoh, H., Ishikawa, K., Yokote, K., Kuzuya, T., Miki, E., Mori, C., Nomura, F. Accelerated oligosaccharide absorption and altered serum metabolites during oral glucose tolerance test in young Japanese with impaired glucose tolerance. *J Diabetes Investig* 9 : 512-521, 2018. 査読有

Watanabe, Y., Matsumoto, A., Miki, T., Seino, S., Anzai, N., Nakaya, H. Electrophysiological analyses of transgenic mice overexpressing KCNJ8 with S422L mutation in cardiomyocytes. *J Pharmacol Sci* 135:37-43, 2017. 査読有

Morimoto, M*, Lee, E.Y.*(*equally contributed), Zhang, X., Inaba, Y., Inoue, H., Ogawa, M., Shirasawa, T., Yokosuka, O., Miki, T. Eicosapentaenoic acid ameliorates hyperglycemia in high-fat diet-sensitive diabetes mice in conjunction with restoration of hypoadiponectinemia. *Nutrition & Diabetes* 27;6:e213, 2016. 査読有

Yoshida, M., Lee, E.Y., Kohno, T., Tanaka, T., Miyazaki, M., Miki T. (2016) Importance of hepatocyte nuclear factor 4 in glycerol-induced glucose-6-phosphatase expression in liver. *Biomed Res* 37:85-93, 2016. 査読有

[学会発表](計4件)

Lee, E.Y., Miyamoto, J., Kimura, I., Miki, T. Gut microbiome induced by intra-intestinal carbohydrates suppresses glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion. 53rd EASD Annual Meeting, 2018.

李恩瑛、張錫麟、宮本潤基、木村郁夫、三木隆司 腸内細菌叢を介したGIP分泌抑制のメカニズム 第61回日本糖尿病学会年次学術集会、2018.

三木隆司、李恩瑛、江口哲史、櫻井健一、三木英司、葛谷健、横手幸太郎、森千里、野村文夫 無水ブドウ糖と澱粉部分水解物による経口糖負荷試験に差はあるか? 第60回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.

Lee, E.Y., Morimoto, M., Miki, T. Mechanism for anti-diabetic action of

eicosapentaenoic acid in the high-fat diet-sensitive diabetes mouse model. 51st EASD Annual Meeting, 2016.

〔図書〕(計 2 件)

三木 隆司 インクレチン関連薬が膵 細胞量に及ぼす影響、日本糖尿病学会、糖尿病、**61**
45-47, 2018 (全 **86** ページ)

三木 隆司 肝臓の輸送機能と代謝機能.ギャノン生理学 原書 **25** 版, 丸善, **605-615,**
2017 (全 **898** ページ)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：<https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/physiol/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：李 恩瑛
ローマ字氏名：**LEE, Eun Young**
所属研究機関名：千葉大学
部局名：大学院医学研究院
職名：助教
研究者番号 (8 桁)：**60583424**

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。