

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08528

研究課題名(和文) 膵細胞の増殖スイッチ機構の解明

研究課題名(英文) Switching mechanisms for pancreatic beta-cell growth

研究代表者

鳥居 征司 (TORII, SEIJI)

群馬大学・食健康科学教育研究センター・教授

研究者番号：40312904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：フォグリンは膵細胞においてインスリン分泌顆粒に局在する。我々は、糖刺激によるインスリン分泌で細胞膜に移動したフォグリンが、活性化インスリン受容体(IR)に結合しIRS2蛋白質の安定化を通じて細胞増殖を促すことを示してきた。本研究では、フォグリンがマウスにおいて脂肪食負荷による代償性増殖を制御すること、新たな結合蛋白質を同定し、これがIRとは別の複合体を形成することを明らかにした。糖刺激はインスリン分泌を促すと同時にIRS2の発現を増加させ、細胞増殖を誘導する。フォグリンがスイッチ調節分子として機能することで、膵細胞は周囲の環境条件に応じてオートクライン増殖機能を発揮していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵細胞は自身が置かれた状況に応じて、分泌インスリンによるオートクライン増殖を行っていることが明確になった。この成果は、細胞マスの低下が一因である2型糖尿病の予測、そして新たな予防・治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Phogrin is a transmembrane protein that localizes on secretory granules in pancreatic β -cells. We previously showed that phogrin participates in molecular interactions with insulin receptors (IR) to regulate insulin receptor substrate 2 (IRS2) protein stability and in turn glucose-promoted β -cell growth. Glucose is a principal regulator of β -cell survival and growth as well as insulin secretion. Despite the growing evidence for the significance of the IR/IRS2-mediated signaling pathways in β -cells, whether secreted insulin acts in an autocrine fashion remains controversial. We showed that phogrin-deficient mice fed a fat diet have defects in β -cell compensatory growth. This is likely because phogrin binds to IR only at conditions that are needed for β -cell expansion. We identified a new phogrin partner, and its binding of phogrin inhibits phogrin-IR interactions. This study represents the first report of a switching regulator of autocrine insulin action in pancreatic β -cells.

研究分野：内分泌生化学

キーワード：インスリン 分泌顆粒 増殖シグナル オートクライン チロシンホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

膵細胞の機能不全は糖尿病の大きな要因であり、その生存・増殖機構の解明は重要である。

細胞のマス(量)や機能維持のためにインスリン・シグナル伝達経路が重要であり、中でもインスリン受容体基質 2(IRS2)は、糖(グルコース)刺激によって速やかに増加し、細胞増殖に欠かすことの出来ない重要な分子であることが示されている。申請者はインスリン顆粒に局在する膜蛋白質フォグリンが、IRS2 蛋白質の安定化に寄与することを見つけた。詳しい機序を解析した結果、フォグリンは糖刺激による開口放出とともに細胞膜に移行してインスリン受容体(IR)と一過的に結合することで、分泌インスリンのオートクライン作用を制御することが判明した。遺伝子欠損マウスにおいては、分泌インスリンの過剰刺激によりネガティブフィードバックが作動して IRS2 蛋白質が分解され、オートクライン作用による増殖シグナルが機能しない。

このオートクライン調節を機能させるためのフォグリンと IR の相互作用は、開口放出という位置的な条件だけでなく、他の複数の因子が関係し調節している可能性がある。本研究では、膵

細胞特異的フォグリン欠損マウスを使用してオートクライン作用が作動している生理的条件を明らかにする。またフォグリンの機能を阻害している蛋白質を同定し、その機序を明らかにする。周囲の環境条件に呼応して細胞増殖の ON/OFF を行う「スイッチ機構」を理解することは、糖尿病をはじめとする成人性疾患の予測、そして予防・治療法の開発につながる。

2. 研究の目的

本研究では、フォグリンが制御する膵細胞の増殖システムを解析し、糖(グルコース)刺激によるオートクライン性インスリン増殖が作動する状況と、安定時に抑制される機構を明らかにする。フォグリン欠損マウスを使用して種々の細胞増殖モデルを作製し、細胞マスが低下する条件を探る。またフォグリンに結合することで IR との相互作用を阻害する新たな蛋白質を探索し、同定する。

3. 研究の方法

(1) フォグリン結合タンパク質の同定とその解析

まずフォグリンに GST を連結したフォグリン-GST を膵細胞株 MIN6 に導入し、ステイブル細胞株を得る。グルタチオン・セファロース・ビーズを使って細胞抽出液のプルダウンを行いフォグリン-GST 複合体を抽出する。抽出産物を 2 次元電気泳動に展開し、スポットを切り出して質量分析にて蛋白質を同定する。同定された蛋白質 Protein-X の特異抗体を作製し、フォグリンの免疫沈降物に対してイムノプロットを行い、生理的な結合条件を解析する。また Protein-X の発現レベルの変化、細胞内局在の変化などを解析し、複合体が形成される機構を明らかにする。さらに *in vitro* 結合解析などを行ってフォグリンとの結合ドメインを決定し、結合領域に高い親和性を示す低分子化合物の探索を行う。

(2) フォグリンとオートクライン増殖機構の作動条件の解析

細胞増殖を評価するさまざまなモデルがこれまでに報告されており、これらについてフォグリンの関与を確かめる。膵細胞特異的フォグリン欠損マウスを用いて、高脂肪食負荷による代償性の細胞増殖やグルコース連続投与による増殖モデル、膵部分切除による代償性増殖などを検証する。関与が示された細胞増殖モデルにおいて、フォグリンがフィードバック機構を介した IRS2 蛋白質の分解を抑制していることを確かめる。また、膵細胞特異的な IRS2 発現マウスとフォグリン欠損マウスとの交配を検討する。

(3) フォグリンおよび種々の増殖関連因子の発現解析

フォグリンが発現する膵細胞サブタイプを、免疫二重染色などで解析する。またサブタイプのマーカーとなりうる Fltp や CD9, ST8SIA1 などに注目し、フォグリン欠損マウスにおける発現レベルを解析する。

4. 研究成果

フォグリン-GST 発現ステイブル細胞からフォグリンに結合する蛋白質の分離同定を試みた結果、蛋白質分子 A (未発表のため仮名)を見出した。その結合条件や生理機能について解析を進めたところ、フォグリン-IR とは別の A 複合体として存在し、異なる細胞条件でフォグリンに結合して IR との結合を阻害していることが分かった。興味深いことに、IR は増殖条件で強く結合しているが、これと対照的に、非増殖条件でフォグリンに結合していることが判明した(図 1)。

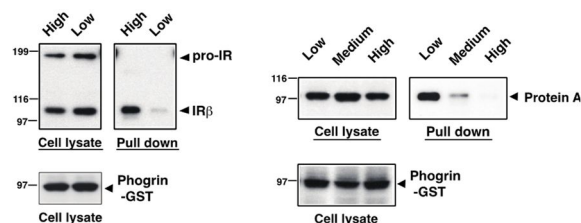


Fig.1 MIN6 expressing phogrin-GST were cultured at high growth or low growth conditions. Cell extracts were prepared and an equal amount of each extract was pulled down with glutathione-Sepharose. The amount of insulin receptor (IR) in each precipitate and expression level of IR and phogrin were determined by immunoblotting (left panel). The same cell extracts were pulled down with glutathione-Sepharose, and the presence of protein A in each precipitate was determined by immunoblotting (right panel).

膵 細胞特異的フォグリン欠損マウスを使用して、細胞マスの評価を行ったところ、高脂肪食負荷による代償性増殖においては明らかな増殖低下が認められた(図2)。また高脂肪食負荷時にはフォグリンと IR の複合体が増えていることが確認された。さらにまた、膵ラ氏島で増殖性タイプの細胞はフォグリン欠損マウスでは少ないことが判明した。これらの結果を総合すると、フォグリンは結合タンパク質の切り替えを通じて、細胞増殖のオンオフを制御するスイッチとして機能している可能性が示唆された。

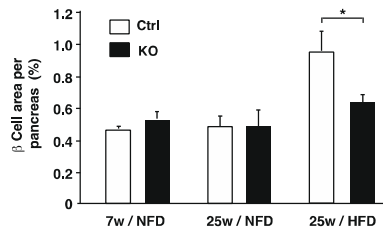


Fig.2 Immunohistochemical analyses with anti-insulin antibody were performed on pancreas tissue from control (Ctrl) or phogrin knockout (KO) mice after 20 weeks on a normal food (NFD) or high fat diet (HFD). Areas of β -cells relative to pancreas area were quantified, and data are presented as means \pm SEMs (n = 4, * P < 0.05). We observed reduced compensatory b-cell expansion in HFD-fed phogrin knockout mice.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Torii Seiji, Kubota Chisato, Saito Naoya, Kawano Ayumi, Hou Ni, Kobayashi Masaki, Torii Ryoko, Hosaka Masahiro, Kitamura Tadahiro, Takeuchi Toshiyuki, Gomi Hiroshi	4. 巻 293
2. 論文標題 The pseudophosphatase phogrin enables glucose-stimulated insulin signaling in pancreatic cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5920 ~ 5933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA117.000301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoyagi Kyota, Itakura Makoto, Fukutomi Toshiyuki, Nishiwaki Chiyono, Nakamichi Yoko, Torii Seiji, Makiyama Tomohiko, Harada Akihiro, Ohara-Imaizumi Mica	4. 巻 159
2. 論文標題 VAMP7 Regulates Autophagosome Formation by Supporting Atg9a Functions in Pancreatic -Cells From Male Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 3674 ~ 3688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2018-00447	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Eri, Maeda Yoshinori, Sato Yui, Hinata Airi, Gomi Hiroshi, Koga Daisuke, Torii Seiji, Watanabe Tsuyoshi, Hosaka Masahiro	4. 巻 476
2. 論文標題 Culture in 10% O ₂ enhances the production of active hormones in neuro-endocrine cells by up-regulating the expression of processing enzymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 827 ~ 842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20180832	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakakura T, Suzuki T, Torii S, Asano-Hoshino A, Nekooki-Machida Y, Tanaka H, Arisawa K, Nishijima Y, Susa T, Okazaki T, Kiuchi Y, Hagiwara H.	4. 巻 370
2. 論文標題 ATAT1 is essential for regulation of homeostasis-retaining cellular responses in corticotrophs along hypothalamic-pituitary-adrenal axis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res	6. 最初と最後の頁 169-178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-017-2654-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shintoku R, Takigawa Y, Yamada K, Kubota C, Yoshimoto Y, Takeuchi T, Koshiishi I, Torii S.	4. 巻 108
2. 論文標題 Lipoxygenase-mediated generation of lipid peroxides enhances ferroptosis induced by erastin and RSL3.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2187-2194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gomi H, Osawa H, Uno R, Yasui T, Hosaka M, Torii S, Tsukise A	4. 巻 65
2. 論文標題 Canine Salivary Glands: Analysis of Rab and SNARE Protein Expression and SNARE Complex Formation With Diverse Tissue Properties.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 637-653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155417732527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Y, Kudo S, Tsushima K, Sato E, Kubota C, Kayamori A, Bochimoto H, Koga D, Torii S, Gomi H, Watanabe T, Hosaka M.	4. 巻 159
2. 論文標題 Impaired processing of prohormones in secretogranin III null mice causes maladaptation to an inadequate diet and stress.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1213-1227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2017-00636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ninagawa Satoshi, Tada Seiichiro, Okumura Masaki, Inoguchi Kenta, Kinoshita Misaki, Kanemura Shingo, Imami Koshi, Umezawa Hajime, Ishikawa Tokiro, Mackin Robert B, Torii Seiji, Ishihama Yasushi, Inaba Kenji, Anazawa Takayuki, Nagamine Takahiko, Mori Kazutoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Antipsychotic olanzapine-induced misfolding of proinsulin in the endoplasmic reticulum accounts for atypical development of diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e60970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.60970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gomi Hiroshi, Hinata Airi, Yasui Tadashi, Torii Seiji, Hosaka Masahiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Expression Pattern of the LacZ Reporter in Secretogranin III Gene-trapped Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 229 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155421996845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagai Seiya, Yoshida Masaki, Takigawa Yuta, Torii Seiji, Koshiishi Ichiro	4. 巻 343
2. 論文標題 Botanical sulfane sulfur donors inhibit ferroptotic cell death caused by the depletion of cysteine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 128511 ~ 128511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2020.128511	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 久保田知里, 鳥居征司
2. 発表標題 鉄依存性細胞死フェロトーシスに対する感受性を解析する
3. 学会等名 第18回生体機能研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蜷川暁, 岡田徹也, 梅澤元, 石川時郎, 鳥居征司, Robert Mackin, 今見考志, 石濱泰, 長嶺敬彦, 森和俊
2. 発表標題 第二世代抗精神病薬オランザピンは、副作用としてProinsulinの適切なジスルフィド結合形成を阻害し糖尿病を誘発する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥居征司, 久保田知里
2. 発表標題 がん細胞におけるフェロトーシス誘導の感受性機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田知里, 竹内利行, 小林雅樹, 北村忠弘, 鳥居征司
2. 発表標題 分泌顆粒蛋白質フォグリンによる膵 細胞増殖の制御
3. 学会等名 北関東医学会第66回総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井聖也, 瀧川雄太, 鳥居征司, 輿石一郎
2. 発表標題 フェロトーシスと含硫化合物
3. 学会等名 北関東医学会第66回総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田知里, 神徳亮介, 瀧川雄太, 山田圭一, 輿石一郎, 鳥居征司
2. 発表標題 鉄依存性細胞死フェロトーシスの解析
3. 学会等名 第17回生体機能研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五味浩司, 大澤裕美, 宇野理恵, 安井禎, 鳥居征司, 穂坂正博, 月瀬東
2. 発表標題 イヌ口腔腺における Rabおよび SNAREタンパク質の発現解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青柳共太, 板倉誠, 福富俊之, 西脇知世乃, 中道洋子, 鳥居征司, 牧山智彦, 原田彰宏, 今泉美佳
2. 発表標題 VAMP7 regulates autophagosome formation by supporting Atg9a functions in pancreatic β -cells
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田知里, 斎藤直也, 河野あゆみ, 竹内利行, 小林雅樹, 北村忠弘, 穂坂正博, 五味浩司, 鳥居征司
2. 発表標題 分泌顆粒蛋白質フォグリンによるインスリン分泌とシグナルの連結機構
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蜷川暁, 岡田徹也, 今見考志, 梅澤元, 石川時郎, 鳥居征司, Robert Mackin, 石濱泰, 長嶺敬彦, 森和俊
2. 発表標題 二世抗精神病薬オランザピンがインスリン分泌不全を引き起こし、糖尿病を誘起する分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鳥居征司
2. 発表標題 過酸化脂質の蓄積が癌細胞のフェロトーシスを増進する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiji Torii
2. 発表標題 The secretory granule-resident pseudophosphatase phogrin enables glucose-stimulated insulin signaling in pancreatic - cells.
3. 学会等名 Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICPP13) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kyota Aoyagi, Makoto Itakura, Yoko Nakamichi, Chiyono Nishiwaki, Seiji Torii, Shinya Nagamatsu, Mica Ohara-Imaizumi
2. 発表標題 VAMP7 regulates autophagy to maintain mitochondrial homeostasis and to control insulin secretion in pancreatic -cells.
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神徳亮介, 久保田知里, 好本裕平, 鳥居征司
2. 発表標題 がん細胞の鉄依存性細胞死を誘導する酸化脂質の生成と拡がり
3. 学会等名 北関東医学会第64回総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Seiji Torii, Tomohisa Moriguchi
2. 発表標題 Lipid peroxide accumulation enhances iron-dependent cell death by anti-tumor drugs
3. 学会等名 The 4th International Symposium of Gunma University Medical Innovation (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 蜷川暁, 岡田徹也, 梅澤元, 石川時郎, 鳥居征司, Robert Mackin, 長嶺敬彦, 森和俊
2. 発表標題 第二世代抗精神病薬オランザピンが副作用として糖尿病を引き起こす分子メカニズムの解析
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久保田知里, 神徳亮介, 瀧川雄太, 山田圭一, 好本裕平, 竹内利行, 輿石一郎, 鳥居征司
2. 発表標題 鉄依存性細胞死フェロトーシスにおける膜脂質過酸化
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青柳共太, 西脇知世乃, 中道洋子, 福富俊之, 鳥居征司, 牧山智彦, 櫻井裕之, 板倉誠, 今泉美佳
2. 発表標題 膵 細胞におけるVAMP7によるオートファゴソーム形成の制御機構
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栢森藍佳, 鼠恵司, 樋渡一之, 佐々木玲, 高橋純一郎, 鳥居征司, 吉原利忠, 飛田成史, 穂坂正博
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)をイリジウム錯体の発光で探索する
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 五味浩司, 安井禎, 日當愛梨, 鳥居征司, 穂坂正博
2. 発表標題 Secretogranin ジーントラップマウスにおけるLacZ遺伝子発現パターンの解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分泌制御分野ホームページ http://secret-biol.imcr.gunma-u.ac.jp/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	五味 浩司 (Gomi Hiroshi) (90293240)	日本大学・生物資源科学部・教授 (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	青柳 共太 (Aoyagi Kyota) (50453527)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関