

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08501

研究課題名(和文) 膵内分泌細胞間のクロストークを介した恒常性維持のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of maintaining homeostasis through crosstalk between pancreatic endocrine cells

研究代表者

中川 祐子 (Nakagawa, Yuko)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：90422500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：プログルカゴン遺伝子を欠損させたマウスにおいてPP細胞の過形成とPP+ GCG+二重陽性細胞が誘導されることを見出した。グルカゴン遺伝子がコードするどのホルモンの欠損が原因であるか検討を行なったところ、グルカゴン作用不全によりPP細胞の過形成とPP+ GCG+二重陽性細胞が誘導されることがわかった。次にどの組織のグルカゴン作用不全がこの表現型に關与するかを検討したところ、肝臓のグルカゴン作用不全が關与することがわかった。これらの結果は、肝臓のグルカゴン作用がPP細胞の増殖制御およびPP細胞または細胞の運命維持に關与する可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、プログルカゴン遺伝子欠損マウスにおいて認められたPP細胞の過形成および多重ホルモン産生細胞の発現誘導のメカニズムを解明することである。この結果より生物の普遍的な問いである細胞増殖と細胞運命の制御機構の未知なる領域に迫ろうとするもので、きわめて高い新規性をもつ研究である。また我々は細胞系譜追跡用マウスおよびその他の遺伝子改変マウスを用いた検討より、従来見過ごされていたPP細胞の新しい生理的機能を明らかにしつつある。本研究により、今まで未開拓であったPP細胞の生物学および膵内分泌細胞間のクロストークを介した恒常性維持のメカニズムが明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that PP cell hyperplasia and PP+ GCG+ double positive cells were induced in mice lacking the proglucagon gene. We investigated which hormone the proglucagon gene encodes, and found that glucagon action deficiency induced PP cell hyperplasia and PP+ GCG+ double positive cells. Next, we examined which tissues are involved in this phenotype and found that glucagon action deficiency in the liver is involved. These results suggest that glucagon action in the liver may be involved in the regulation of PP cell proliferation and maintenance of PP cell or cell fate.

研究分野：生理学

キーワード：膵内分泌細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵臓は、消化液を分泌する外分泌細胞とホルモンを分泌する内分泌細胞、そして膵液を十二指腸へと運ぶ膵管からなる。この膵臓で最も注目されているのは、内分泌細胞に存在する β 細胞である。 β 細胞は、血糖値を下げる唯一のホルモンであるインスリンを分泌するため、 β 細胞の機能不全は血糖値の上昇を促し、最終的には糖尿病を発症する。

我々は、膵島のマイリティ細胞である PP 細胞に注目し研究を進めてきた。PP 細胞は膵内分泌組織にごく少数存在し、Pancreatic Polypeptide (PP) を分泌する。最近まで PP 細胞の機能はほとんど未知であったが、我々の研究により PP 細胞は β 細胞の前駆細胞であり、胎生期に発生した多くの PP 細胞は、発達に伴い β 細胞へと運命を変えることが明らかになりつつある(論文準備中)。興味深いことに、非肥満・インスリン分泌低下を特徴とする日本人 2 型糖尿病のモデル動物として知られる Goto-Kakizaki (GK) ラットでは、 β 細胞量の低下に加え、PP 細胞の欠損が観察された。また PP 細胞を強制的に過剰発現させた膵島では、複数のホルモンを産生する細胞が出現した(Yuzuriha, H., *Int. J. Mol. Med.*, 2004.)。これらの知見より、PP 細胞は組織全体の恒常性を担う新規の機能をもつ細胞である可能性が考えられる。そこで我々は、まず膵 PP 細胞の生理的機能を明らかにするために、膵 PP 細胞の量が変化するモデル動物の探索を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、プログルカゴン欠損マウスにおいて認められた PP 細胞の過形成および多重ホルモン産生細胞の発現誘導のメカニズムを解明することである。この結果より生物の普遍的な問いである細胞増殖と細胞運命の制御機構の未知なる領域に迫ろうとするもので、きわめて高い新規性をもつ研究である。また我々は細胞系譜追跡用マウスおよびその他の遺伝子改変マウスを用いた検討より、従来見過ごされていた β 細胞または PP 細胞の新しい知見を明らかにしつつある。本研究により、今まで未開拓であった PP 細胞の生物学および膵内分泌細胞間のクロストークを介した恒常性維持のメカニズムが明らかになることが期待される。

プログルカゴン遺伝子欠損マウス($Gcg^{gfp/gfp}$)は、プログルカゴン遺伝子にコードされるグルカゴンを含む全てのホルモン産生が欠損しているが、このマウスでは他のグルカゴン作用不全マウスと同様に膵 β 細胞の過形成が起こることが知られている(Hayashi, Y. et al., *Mol. Endocrinol.*, 2009.)。我々は、 $Gcg^{gfp/gfp}$ の膵臓の切片を用いて、PP を特異的に認識する抗体で免疫組織染色による観察を行った。その結果、2 つの驚くべきことを発見した。 β 細胞が過形成していた。PP 細胞は、膵内分泌細胞全体の数%程しか存在しない細胞であるが、この $Gcg^{gfp/gfp}$ では膵島の 37.9%の細胞が PP 陽性細胞であった。まずプログルカゴン欠損マウス($Gcg^{gfp/gfp}$)で PP 細胞の過形成と多重ホルモン産生細胞の出現のメカニズムを解明するために、これらの現象を誘導した因子の同定を行い、この因子がどのようなシグナル伝達機構を制御し、PP 細胞の過形成と多重ホルモン産生細胞の出現を誘導したかを明らかにする。次に PP 細胞が組織恒常性の維持に関与しているか否かを明らかにするために $Gcg^{gfp/gfp}$ で PP を欠損させ、PP 細胞非存在下において多重ホルモン産生細胞の出現に変化が見られるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

全身性グルカゴン受容体 (GCGR) KO マウスおよび肝臓特異的 GCGR KO マウスの作製

$Gcgr^{-/-}$ を作製するためにグルカゴン受容体 flox マウス ($Gcgr^{flox}$) を作製し、CAG-Cre マウスと交配した。肝臓特異的グルカゴン受容体作製するために $Gcgr^{flox}$ マウスと Albumin-Cre マウスと交配した。

4. 研究成果

(1) 全身性グルカゴン受容体 (GCGR) KO マウスで PP 細胞の過形成と $GCG^+ PP^+$ 陽性細胞が誘導された。

PP 細胞の機能の一端を明らかにする目的で PP 細胞量の変化するモデルを探索した。その結果、プログルカゴン遺伝子欠損マウスで PP 細胞が過形成すること、 $PP^+ グルカゴン^+$ (GCG^+) 二重陽性細胞が多数存在することを見出した。しかし、プログルカゴン遺伝子はグルカゴンや GLP-1 をはじめ、様々なホルモンをコードするため、どのホルモンが原因であるか不明であった。そこで、グルカゴンの関与を検証するため、グルカゴン受容体 flox マウス

(Gcgr flox) を作製し、まず全身性グルカゴン受容体欠損マウス (Gcgr^{-/-}) を作製した。10 週齢の Gcgr^{-/-} では、PP 細胞が過形成し、PP⁺ GCG⁺ 二重陽性細胞が多数存在することが分かった (図 1)。この結果はグルカゴン作用不全が PP 細胞の過形成と PP⁺ GCG⁺ 二重陽性細胞を誘導することを示す。また、細胞の約 60% の細胞が PP 陽性細胞であった。この結果は、グルカゴン作用不全により増加した細胞の一部が PP を発現し、それにより、PP 陽性細胞が増加し、PP 細胞量が増えたことが考えられる。

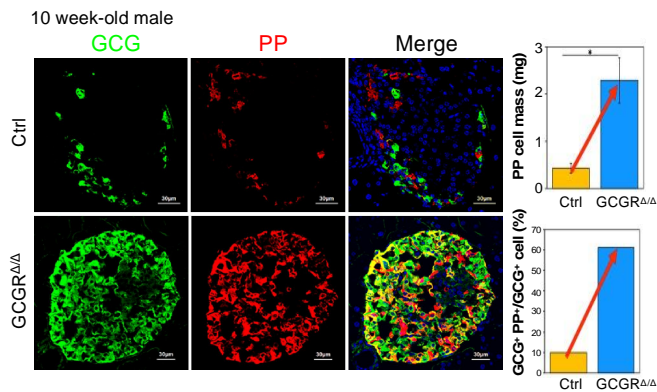
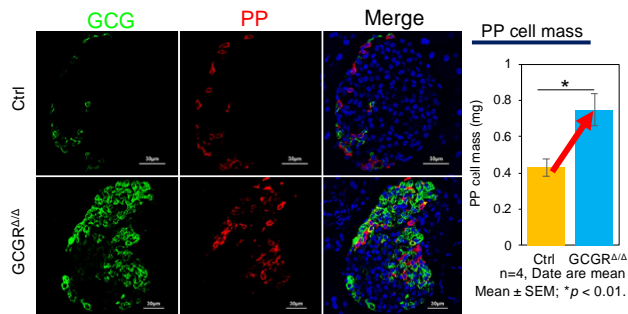


図 1. 全身性グルカゴン受容体欠損マウス (GCGR^{Δ/Δ}) では PP 細胞の過形成と PP⁺ GCG⁺ 二重陽性細胞が存在する

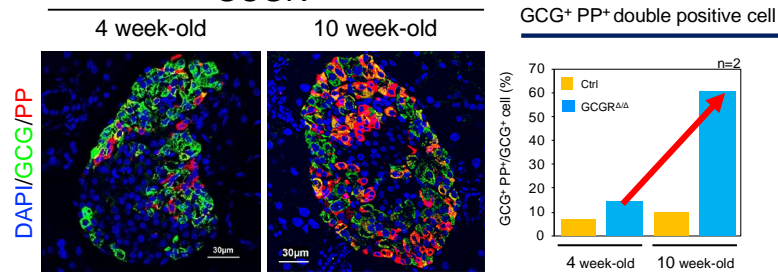
(2) PP 細胞の過形成には 2 つの経路が存在することが考えられる。

4 週齢の Gcgr^{-/-} を解析した。その結果、10 週齢と同様にコントロールに比べ PP 細胞量が増加していた (図 2, A)。しかし、10 週齢の Gcgr^{-/-} に比べて、GCG⁺ PP⁺ 陽性細胞の数が減少していたことがわかった (図 2, B)。そこで、PP 細胞量の増加が PP 細胞自身の自己増殖による可能性を考え、PP とグルカゴンの抗体とともに増殖マーカーである Ki67 を用いて染色を行なった。その結果、PP 単独陽性細胞で Ki67 陽性細胞が観察された。この結果は PP 細胞の自己増殖によって PP 細胞量が増加したことが考えられる。

A 4 week-old, male



B GCGR^{Δ/Δ}



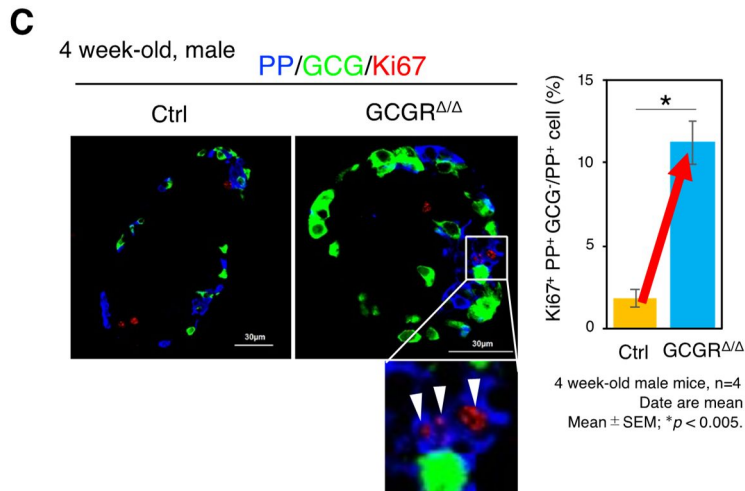


図 2. 4 週齢 GCGR Δ/Δ では PP 細胞の自己増殖により PP 細胞の過形成が誘導された。

(3) 肝臓特異的 GCGR KO マウスで PP 細胞の過形成と GCG⁺ PP⁺陽性細胞が存在する。

どの組織のグルカゴン作用が PP 細胞の過形成と GCG⁺ PP⁺陽性細胞の誘導に関与するのかを明らかに種々の組織特異的な Cre マウスを用いて検討を行った結果、肝臓特異的グルカゴン受容体欠損により PP 細胞の過形成と PP⁺ GCG⁺二重陽性細胞が誘導されることが分かった(図 3)。既報により肝臓特異的グルカゴン受容体マウスでは、肝臓でのアミノ酸の異化作用の抑制により血中のアミノ酸濃度が上昇することが報告されている。そこで、この PP 細胞の過形成および PP⁺ GCG⁺二重陽性細胞の出現がアミノ酸シグナルに依存的かどうか検討を行った。その結果、PP⁺ GCG⁺二重陽性細胞ではアミノ酸シグナルによって活性化される mTOR シグナルが亢進している一方で、PP 細胞単独陽性細胞では mTOR の活性化が観察されなかった。また、野生型膵島細胞を単離してグルタミン添加培地で培養したところ、PP⁺ GCG⁺二重陽性細胞が誘導された。以上の結果よりグルカゴンとアミノ酸を介した肝臓と膵臓の臓器連関が PP 細胞の適正な数を制御し、さらには 細胞と PP 細胞の正常な運命維持を制御する可能性が考えられた。

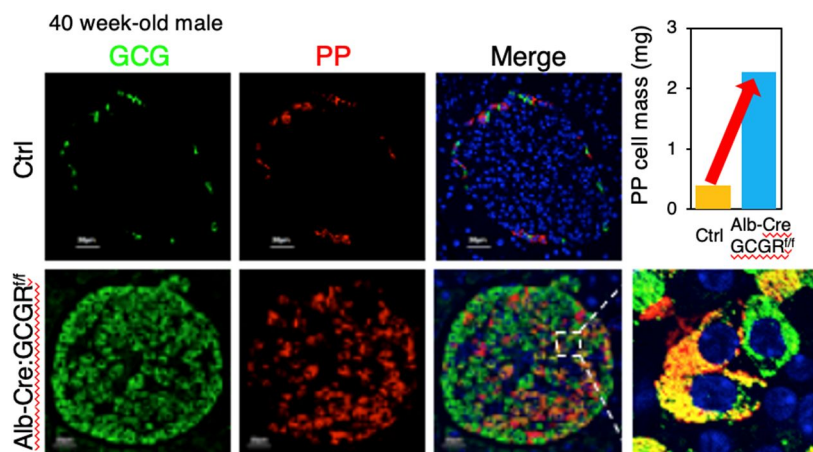


図 3. 肝臓特異的グルカゴン受容体欠損マウス (Albumin-Cre:GCGR $^{fl/fl}$) では PP 細胞の過形成と PP⁺ GCG⁺二重陽性細胞が誘導された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hara A, Nakagawa Y, Nakao K, Tamaki M, Ikemoto T, Shimada M, Matsuhisa M, Mizukami H, Maruyama N, Watada H, Fujitani Y.	4. 巻 EJ18-0441
2. 論文標題 Development of monoclonal mouse antibodies that specifically recognize pancreatic polypeptide.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocr. J.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ18-0441	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川 祐子, 林 良敬, 北村 忠弘, 堀居 拓郎, 畑田 出穂, 藤谷 与士夫
2. 発表標題 グルカゴン遺伝子産物による膵PP細胞の増殖制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第62回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 祐子, 林 良敬, 北村 忠弘, 堀居 拓郎, 畑田 出穂, 藤谷 与士夫
2. 発表標題 グルカゴン遺伝子産物による膵PP細胞の増殖制御メカニズムの解明
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 中川 祐子, 林 良敬, 北村 忠弘, 堀居 拓郎, 畑田 出穂, 藤谷 与士夫
2. 発表標題 ルカゴンシグナルによる膵PP細胞の増殖制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川 祐子, 林 良敬, 北村 忠弘, 堀居 拓郎, 畑田 出穂, 藤谷 与士夫
2. 発表標題 グルカゴンシグナルによる膵PP細胞の増殖制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第5回 群馬大学生体調節研究所 内分泌代謝シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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