

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08511

研究課題名(和文) 膵 細胞機能的多様性の同定とその病態生理学的解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analyses of functional subtypes in pancreatic alpha-cells

研究代表者

河盛 段 (Kawamori, Dan)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50622362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では糖尿病病態におけるグルカゴン分泌と膵 細胞機能の重要性解明と新規治療法開発を目指し、「 細胞は複数ホルモンの分泌バランスが変化する様々な機能的多様性(subtype)を呈し」、「糖尿病においては 細胞の機能的変化がおり、これがグルカゴン過剰と共に膵島内GLP-1減少を介して病態悪化に関与する」という新しい概念仮説の分子生物学的検証を試みた。研究結果によりグルカゴンとGLP-1の分泌変化に関わる因子として 細胞におけるDPP-4発現の変化を新規に見出し、次世代の治療や研究につながるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大きな社会健康問題である糖尿病では、様々な治療アプローチが可能な一方、その病態の多様性から最適な治療法選択と疾患コントロールに難渋することも少なくない。本研究成果は、糖尿病病態を「グルカゴン分泌異常と膵 細胞機能変容」という新たな視点から捉えた新規治療標的の同定につながるものとして、糖尿病学における学術的意義のみならず、将来の治療法開発に向けた研究基盤としての社会的意義を有するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we aimed to validate a hypothesis; the pancreatic α -cells exhibit different subtypes, and a functional shift of α -cells contributes to the pathophysiological exacerbation of diabetes via excessive glucagon secretion together with impaired intra-islet effects of GLP-1. Using an in vitro model of α -cells by glucagon-secreting InR1G cells, we confirmed an excessive glucagon secretion by 12-h chronic high-glucose load to the cells while GLP-1 secretion was not. On the other hand, we picked up an incretin-degradation enzyme DPP-4 as a candidate responsible for the alteration of glucagon and GLP-1 secretion since 24-h glucose load to the cells significantly and reproducibly upregulated DPP-4 gene expression. The results of the project indicated the significance of pancreatic α -cell functions including various hormone secretions, which may lead us to the development of new therapeutic approach to diabetes targeting α -cells.

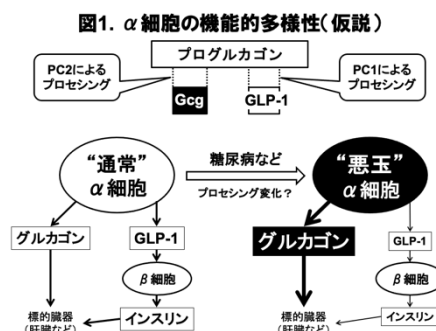
研究分野：糖尿病学

キーワード：グルカゴン 糖尿病 GLP-1 DPP-4 ストレス応答 膵 細胞

1. 研究開始当初の背景

全世界における大きな社会健康問題である糖尿病に対し現在、様々な治療が行われているが、その疾患コントロール状況はいまだ不十分であり、またこれまでの診療はインスリンの質的・量的不足の改善に特化するあまり低血糖・肥満といった臨床的問題点も残存している。そのようななか近年、糖尿病病態におけるグルカゴン分泌異常の大きな寄与が再注目され、その治療的重要性が認識されている¹⁾。加えてグルカゴンを分泌する膵α細胞についても注目が集まり、最近の基礎研究によりグルカゴンに加え GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1)・GIP・アセチルコリン (Ach) といった様々な生理活性物質を産生・分泌して近隣のβ細胞機能に影響すること、分化転換を介しβ細胞量の維持に寄与するなど、膵島全体の質・量の両者に深く関わっていることが明らかとなってきた²⁾。特に最近、腸管由来 GLP-1 ではなくα細胞由来 GLP-1 の血糖改善における中心的役割も提唱されている³⁾。すなわちα細胞機能異常の解明が、次世代糖尿病治療を考えるうえで重要であるといえる。

しかし、これまで糖尿病におけるα細胞グルカゴン分泌異常の詳細な機序は不明であった。そのようななか我々は、α細胞に対する慢性高グルコース負荷が細胞内ストレス増大とインスリンシグナル障害を介して、グルカゴン分泌過剰を誘導することを明らかとした⁴⁾。この検討において、高グルコースは直接膵島や細胞に作用しグルカゴン分泌過剰を惹起したが、一方でその前駆物質プログルカゴンの遺伝子発現は増加しておらず、単なる量的変化を超えた機序が想定される。そこでグルカゴンと同様にプログルカゴンから産生される GLP-1 のα細胞における発現の可能性を考慮すると、α細胞における複数ホルモンの分泌バランス異常、すなわちグルカゴン分泌過剰や GLP-1 減少を呈する「悪玉」α細胞への変化(機能的多様性を有するα細胞の異常)が想定される【図1】。



2. 研究の目的

2010年代以降の糖尿病学においては、臨床・研究ともに、これまでのインスリン一辺倒であったものから、グルカゴンを含めた包括的な病態を捉える方向へとシフトし、特にグルカゴンとα細胞は大きな注目を集めている。一方、包括的なα細胞機能制御機構の詳細については未だ不明である。そこで本課題では、糖尿病病態におけるグルカゴン分泌と膵α細胞機能の重要性解明と将来の新規治療法開発を目指し、「α細胞は複数ホルモンの分泌バランスが変化する様々な機能的多様性(subtype)を呈し」、「糖尿病においてはα細胞の機能的変化がおこり、これがグルカゴン過剰と共に膵島内 GLP-1 減少を介して病態悪化に関与する」という新しい概念仮説の分子生物学的検証を試みた。

3. 研究の方法

グルカゴン分泌細胞株におけるホルモン分泌パターン変容の解析

外的刺激応答性にグルカゴン分泌が変化する InR1G 細胞に対し、通常条件である 11mM グルコースと糖尿病の慢性高血糖を模倣する 25mM グルコースを負荷し、グルカゴン・GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) の分泌は Static Incubation 法で、また遺伝子発現は細胞から抽出した mRNA を用いた RT-PCR ~ Real-Time PCR 法で、蛋白発現は全細胞蛋白を用いた Western Blot 法で、それぞれ評価した。グルカゴンと GLP-1 の測定はそれぞれに対する特異的 ELISA にて行った。

糖尿病及びα細胞機能障害モデルマウス単離膵島におけるα細胞機能の解析

糖尿病モデルマウスおよびグルカゴン分泌異常を呈するα細胞特異的インスリン受容体欠損(αIRKO)マウス⁵⁾、対照マウスの単離膵島に対し、上記と同様の負荷・評価を行い、病態生理学的意義を検証するべく、αIRKOマウスのコロニーを構築し、飼育を行った。各マウスの遺伝型については抽出 DNA を用いた PCR 法により確認し、メンデルの法則に基づき適切な遺伝子組み換え動物管理を行った。

4. 研究成果

本課題では、糖尿病病態の解明と新たな治療法の開発を目指し、グルカゴン分泌異常を「プログルカゴン由来ホルモンの分泌バランス変化とα細胞の機能的変容」ととらえた新しい概念仮説を検証すべく研究を遂行した。

グルカゴン分泌細胞株におけるホルモン分泌パターン変容の解析

糖尿病におけるα細胞グルカゴン分泌異常の詳細と背景メカニズムを、グルカゴン分泌 InR1G 細胞を用いて解析を行った。グルカゴン分泌細胞株 InR1G に対し、11.1mM の通常グルコース濃

度もしくは 25mM の高グルコース負荷にて 12 時間培養した後、1 時間 Static Incubation にて 1、7、25mM グルコース下のグルカゴン分泌を評価した結果、25mM の高グルコース下で培養した InR1G 細胞では 25mM の高グルコース刺激時のグルカゴン分泌過剰を呈し、糖尿病と同様のグルカゴン分泌異常の誘導を確認した【図 2】。一方、グルカゴン遺伝子発現においては高グルコース負荷による有意な増加は無く【図 3】、このグルカゴン分泌過剰はグルカゴン生合成の増加によるものではないと考えられた。次に、グルカゴンと同様にプログルカゴンよりプロセシングされる GLP-1 の分泌について、前述のグルカゴン分泌過剰が誘導されている条件下で検討を行ったところ、実際に高グルコース刺激応答性の分泌増加を見出したほか、長時間高グルコース負荷による高グルコース刺激下 GLP-1 分泌の有意な増加を確認した【図 2】。

そこで、生体内において GLP-1 の分解に関わり、糖尿病病態に密接に関与することが知られている DPP-4 に注目したところ、膵島、特に α 細胞に発現していることが報告されている⁶⁾。実際に InR1G 細胞においてその蛋白質発現を Western Blot 法にて確認した。次に、DPP-4 遺伝子を定量的 Real-Time PCR で検討すべく、データベースを検索して唯一 hit した cDNA 配列からプライマーを 3 セット作成し、予備検討により定量的検討が可能と判断したプライマーセット 2 セットを確立した。これらを用い、InR1G における DPP-4 遺伝子発現について長時間高グルコース負荷 24、48、72、120 時間後の経時的な発現変化を評価したところ、25mM グルコース負荷 24 時間時点において DPP-4 遺伝子発現量の有意な増加が確認された【図 3】。

糖尿病及び α 細胞機能障害モデルマウス単離膵島における α 細胞機能の解析

上記結果より示唆される α 細胞の機能的・分子生物学的変化を生体内で検証すべく、モデルマウスの病態生理学的解析を計画した。グルカゴン分泌過剰を呈する病態モデルである α IRKO マウス系統を作製し、コロニー拡大を図ったが、2020 年の新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) パンデミックをはじめとする様々な技術的事由のため繁殖に困難が生じ、結果的に系統の放棄に至った。代替実験として、対照正常マウスからの膵組織採取による組織学的評価と単離膵島における機能評価の計画・準備を行った。

これらの研究結果より、膵 α 細胞はグルカゴンに加え GLP-1 を産生分泌しており、長時間高グルコース負荷といった代謝ストレスによりこれらのホルモン分泌を変化させること、そしてその背景病態の一部に DPP-4 発現増加が関与している可能性が示された【図 4】。グルカゴンと GLP-1 の分泌変化に関わる因子として α 細胞における DPP-4 発現の変化を新規に見出し、次世代の糖尿病治療や研究につながるものと考えられた。

< 引用文献 >

- 1) Kawamori D: Exploring the molecular mechanisms underlying alpha- and beta-cell dysfunction in diabetes. *Diabetol Int.* 8:248-56, 2017.
- 2) Habener JF, Stanojevic V: Alpha cells come of age. *Trends Endocrinol Metab.* 24:153-63, 2013.
- 3) Chambers A P, Sorrell J E, et al.: The role of pancreatic proglucagon in glucose homeostasis in mice. *Cell Metab.* 25:927-34, 2017.
- 4) Katsura T, Kawamori D, et al.: Glucotoxicity induces abnormal glucagon secretion through impaired insulin signaling in *inr1g* cells. *PLoS One.* 12:e0176271, 2017.
- 5) Kawamori D, Kurpad A J, et al.: Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell Metab.* 9:350-361, 2009.
- 6) Omar BA, Liehua L, et al.: Dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) is expressed in mouse and human islets and its activity is decreased in human islets from individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 57:1876-83, 2014.

図2. 高グルコース負荷によるホルモン分泌変化

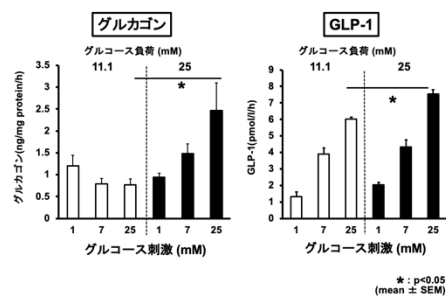


図3. 高グルコース負荷による遺伝子発現変化

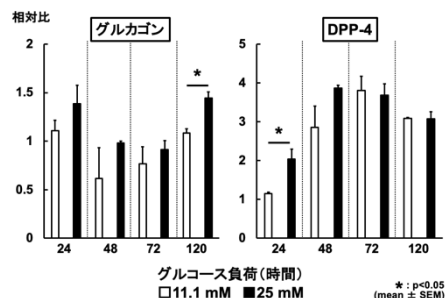
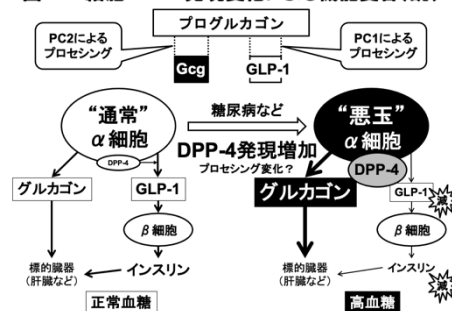


図4. α 細胞DPP-4発現変化による機能変容(説)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kawamori Dan, Katakami Naoto, Takahara Mitsuyoshi, Miyashita Kazuyuki, Takebe Satomi, Yasuda Tetsuyuki, Matsuoka Taka-aki, Shimomura Iichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Consistency of plasma glucagon levels in patients with type 1 diabetes after a 1 year period	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 337 ~ 340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13134	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 Watanabe Hirota, Katsura Takashi, Takahara Mitsuyoshi, Miyashita Kazuyuki, Katakami Naoto, Matsuoka Taka-aki, Kawamori Dan, Shimomura Iichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Plasma lipopolysaccharide binding protein level statistically mediates between body mass index and chronic microinflammation in Japanese patients with type 1 diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 293 ~ 297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13340-020-00428-8	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 Kawamori Dan	4. 巻 11
2. 論文標題 Beginning of a new era in glucagon research: Breakthrough by the new glucagon assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1123 ~ 1125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13275	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 Kawamori Dan, Katakami Naoto, Takahara Mitsuyoshi, Miyashita Kazuyuki, Sakamoto Fumie, Yasuda Tetsuyuki, Matsuoka Taka-aki, Shimomura Iichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Dysregulated plasma glucagon levels in Japanese young adult type 1 diabetes patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 62 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12862	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 Kawamori Dan	4. 巻 10
2. 論文標題 Alpha the versatile: Guardians of the islets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 26 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12875	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9件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河盛 段
2. 発表標題 グルカゴンの評価からみえるエネルギーの流れ
3. 学会等名 第54回糖尿病学の進歩
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河盛 段
2. 発表標題 シンポジウム「グルカゴン・インクレチン研究Up to date」糖尿病における膵 細胞機能異常とグルカゴン臨床評価
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河盛 段、影山陽子、田中孝幸、片上直人、宮下和幸、武部里美、松岡孝昭、下村伊一郎
2. 発表標題 成人1型糖尿病患者は血中アミノ酸プロファイルの変化を呈する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河盛 段
2. 発表標題 グルカゴン研究Update2021
3. 学会等名 第55回糖尿病学の進歩
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河盛 段、片上直人、高原充佳、宮下和幸、坂本扶美枝、武部里美、安田哲行、松岡孝昭、下村伊一郎
2. 発表標題 成人1型糖尿病患者健診における血中グルカゴン値の年次変化
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 河盛 段
2. 発表標題 糖尿病治療薬が再び光を当てたグルカゴンの新しい意義
3. 学会等名 第8回くすりとう糖尿病学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河盛 段
2. 発表標題 シンポジウム「グルカゴンはどこまで判ったか」：Regulation of β -cell function and fate by intra-islet effect of insulin from β -cells.
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河盛 段、片上直人、高原充佳、宮下和幸、坂本扶美枝、安田哲行、松岡孝昭、下村伊一郎
2. 発表標題 成人1型糖尿病患者における血中グルカゴン値の評価
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河盛 段
2. 発表標題 Update「肥満、糖尿病1」：糖尿病臨床におけるグルカゴンの新認識
3. 学会等名 第28回臨床内分泌代謝Update（招待講演）
4. 発表年 2018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
研究 分 担 者	松岡 孝昭 (Matsuoka Taka-aki) (10379258)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	2020年8月 和歌山県立医科大学医学部へ転出。

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
---------	---------