

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14968

研究課題名(和文)医療用医薬品による膵腺房細胞の分化転換によるインスリン分泌細胞の再誘導

研究課題名(英文)Direct conversion for pancreatic beta cells with known ethical drug

研究代表者

綿本 有希子(Yukiko, Watamoro)

神戸大学・医学部附属病院・薬剤師

研究者番号：10757454

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、血糖降下作用という副作用情報に基づき糖尿病治療薬を除く医薬品データベースより既報の構造活性相関などの情報に基づき血糖降下作用をもつ薬剤をスクリーニングした。実際に選定した薬剤のうち1種類は、モデル動物に投与することで血糖値は低下した。この血糖降下作用は、インスリン産生細胞を回復したことによるものと示唆された。このメカニズムについて網羅的解析を行い、関連する因子を絞り込んだ。現在、これらの因子によるメカニズムについて解析を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病の根治にむけて、既にharmineをはじめ、GABA, micro RNAの他、EGF, gastrin, Maf A遺伝子などの生理活性物質や遺伝子を用いて細胞を再分化させたとする論文が多数報告されている。一方、その詳細なメカニズムや臨床応用については未解決のままである。今回、用途転換によりインスリン分泌の回復が可能であれば、薬物動態や副作用等も判明していることから直ちに臨床応用への可能性が広がる。本研究は、インスリン産生能の回復を目指して開始した。そして新規治療法の開発につながる基盤となる成果を得ることができたと考えている。

研究成果の概要(英文):To development insulin-producing beta like cells, candidates of small sized chemicals had been selected by screening using small-molecule libraries: a library from the DRUG in JAPAN 2017 printed by 2012 Jiho Inc., consisting of 20,000 small molecules. Of the 10 compounds tested, being based on previous reports. Among these, a class, including of 10 items, showed the greatest normalized glucose levels. Only one compound induced a mild increase of number of insulin-producing cells. There was no relationship between the number of insulin-producing cells and Ki-67 labeling cells. Pathway analysis revealed that some regulators had been involved in such phenomena. These observations suggest that the chemical may have unique promise for inducing insulin-producing cell.

研究分野：臨床薬剤学

キーワード：細胞 誘導 低分子化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の病態には、1型と2型がある。1型糖尿病では、自己免疫的な機序により膵臓のランゲルハンス島の細胞はアポトーシスを起こして全滅している。一方、患者数が圧倒的に多いのは2型糖尿病である。2型糖尿病であっても、終末期になれば、細胞数が極端に減少してインスリン産生能が低下する。この過程には、脱分化やアポトーシスが関わっていることが知られている。両タイプに共通するのは、発症の原因に関わらず細胞がアポトーシスや脱分化を起こしていることに起因することである。よって両型の糖尿病の何れにおいてもインスリンは必要不可欠となる。このためインスリン産生が復活あるいは増加すれば、両型の病態の何れにおいても劇的な治療効果の改善が期待できる。

これまでに、内胚葉の腸管未分化細胞等から細胞へ分化するには、Neurog3、NeuroD、Pdx1、STAT3、MafA、Rfx6、Arx、Pax4、Hes1などの転写因子が適時、適切に発現することで達成可能であることが報告されている(Murtaugh et al., *Development*, 2007. 427-438)。細胞を破壊した後でも、腸管の内分泌系細胞を膵臓に移植することで、インスリン産生性細胞へ分化させることも可能である(Taichai et al., *Nat Genet*, 2012. 406-412)。

既報において、これら膵臓のランゲルハンス島の細胞は、最終分化を遂げた後も不変ではなく、生涯を通じてアポトーシスと新生、分化、再分化、分化転換を繰り返していることが知られている(Hao, E. et al., *Nat. Med.* 2006. 310-316)。ヒトランゲルハンス島においては、現在までに7種類の細胞の存在が確認されており、主要なものは、グルカゴンを分泌する細胞、インスリンを分泌する細胞、ソマトスタチンを分泌する細胞、そのリザーバー細胞と示唆されているPP細胞などである。これらの細胞には可塑性があり、特に膵細胞と細胞には可塑性があり、病態が変化すれば相互に移行、すなわち分化と転換することがあり、糖尿病の終末期になれば未分化細胞に脱分化したり、条件によっては細胞や細胞へ再分化したりすることも報告されている(Thorel et al., *Nature*, 2010. 1149-1154; Chera et al., *Nature*, 2014. 503-507)。

更に、最近になりハイスループット・スクリーニング分析により、自然界に広く分布し植物をはじめヒトを含む哺乳類の生体内に存在する Harmine が、dual-specificity tyrosine-regulated kinase-1a (DYRK1A)(Wang P. et al., *Nature Medicine* 2015, 383-388)や核内転写因子(Nuclear factors of activated T cells (NFAT))を介して、マウスとヒトにおいて膵細胞の増殖を誘導し血糖調節を改善できることが示された(Shirakawa, et al., *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2016. 71-77)。この Harmine は、向精神薬として利用されたり、最近では蛍光性 pH 指示薬、ポジトロン断層法(PET)を目的として神経の画像検査に応用されたりしてもいる。

以上の如く、外分泌腺から分化していくランゲルハンス島の細胞には、組織が成熟した後も環境により分化、維持、脱分化、再分化、分化転換にはシグナル分子とクロストークが存在することが確実である。しかしながら、そのネットワーク基盤は未解明のままである。

2. 研究の目的

Harmine のような小分子の化学物質がランゲルハンス島に影響を及ぼして膵細胞に対して増殖作用を示すことから、分子型が相似していたり血糖降下作用のある医療用医薬品を選抜する。その上で、ストレプトゾシン誘発性1型糖尿病モデルマウスに投与して、インスリン産生能の回復と血糖コントロールの改善効果を測定する。効果が認められた場合、膵臓、殊にランゲルハンス島における遺伝子発現変化に注目して解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

糖尿病治療薬を除き、既存の医療用医薬品からカルボリンアルカロイドなどのクラスに属している化学構造や、血糖値に影響を及ぼす薬剤をデータベースより選択する。ストレプトゾシン処置マウスを作成しておき、高脂肪食負荷下で高血糖状態を維持し、被検薬を連続投与して血糖降下作用を判定する。血糖降下作用が得られた場合、最も効果の高い薬剤を選抜する。血糖改善の得られた動物個体から膵臓を採取し、mRNAを用いてゲノム DNA マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析する。

4. 研究成果

ストレプトゾシン処置1型糖尿病モデルマウスをコントロールとして、選択した薬剤を投与してスクリーニングを実施した。すなわち経口投与により薬剤を連続投与した結果、血糖降下作用をもつものを選定した。次いで、これらを用いて野生型、モデル動物とモデル動物+プラセボ群として3群を設定し再度、連続投与を行なった。発症後の投与では、概ね薬剤投与後4週間から6週間で血糖改善効果が得られることを確認した。またストレプトゾシンによる処置と同時並行して薬剤を投与することで糖尿病の重症度(血糖値上昇)の観点から、より良好な改善効果をもたらした。これら一連の変化は、組織学的には膵島の中にインスリン産生細胞が出現すること

によって達成されていることが示唆された。ストレプトゾシン処置した糖尿病のコントロールマウスと比較して、膵島の単位面積あたりのインスリン免疫組織染色での陽性となる細胞の出現率とその面積は、薬剤投与群で増加していた。3群それぞれの個体の膵臓のミクロレベルで観察では、Ki-67、グルカゴン陽性細胞の面積に著変を認めないものの、インスリンに対する免疫組織学的反応を有する細胞面積が血糖値に逆相関していた。以上の如く、細胞から細胞へ分化転換することでインスリンの産生量の増大をもたらしたというよりも、リザーバーもしくは前駆細胞ならからインスリン産生細胞数の再増加による影響を受けた変化であると示唆された。インスリン分泌細胞の由来について解析するために、遺伝子発現についてマイクロアレイを施行した。効果発現に変化のあった個体群で pathway 解析を行ったところ、ドパミン作動性神経とビタミン B6 に関する代謝経路の活性化、ならびに膵細胞などの細胞増殖に関係するとみられる cell cycle に関係する分子群が活性化されていた。この他、糖質の代謝経路、MAPK 経路下流の細胞周期に関与する分子群の発現にも変化を認めた。カルシウム制御等のインスリン分泌にかかわる経路の発現変化を認めた。これに、上記の発現変化した遺伝子群、なかでも MAPK 経路をはじめとする cell cycle に関与し、且つ発現増加した 12 個の遺伝子に付いて注目して解析を進めている。特に、細胞の分化/転換、増殖に抑制的に働いているとされる Uncoupling protein-2 や、増殖に関係している Insulin/insulin-like growth factor-1 からのシグナル伝達に注目して解析した。この他の可能性が示唆される関連因子については解析を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watamoto Yukiko, Futawaka Kumi, Hayashi Misa, Matsushita Midori, Mitsutani Mana, Song Zilin, Koyama Rie, Fukuda Yuki, Nushida Ayaka, Nezu Syoko, Kuwahara Akiko, Kataoka Kazusaburo, et. al.	4. 巻 37
2. 論文標題 IGF-1 regulate the expression of uncoupling protein 2 via FOXO1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Growth Factors	6. 最初と最後の頁 247 ~ 256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/08977194.2020.1739032	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 該当する

1. 著者名 Watamoto Yukiko, Futawaka Kumi, Hayashi Misa, Matsushita Midori, Mitsutani Mana, Murakami Kana, Song Zilin, Koyama Rie, Fukuda Yuki, Nushida Ayaka, Nezu Syoko, Kuwahara Akiko, Kataoka Kazusaburo, et al.	4. 巻 46-47
2. 論文標題 Insulin-like growth factor-1 directly mediates expression of mitochondrial uncoupling protein 3 via forkhead box O4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Growth Hormone & IGF Research	6. 最初と最後の頁 24 ~ 35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gHIR.2019.05.003	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 該当する

1. 著者名 Matsushita Midori, Futawaka Kumi, Hayashi Misa, Murakami Kana, Mitsutani Mana, Hatai Mayuko, Watamoto Yukiko, Yoshikawa Noriko, Nakamura Kazuki, et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 Cigarette Smoke Extract Modulates Functions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1628 ~ 1636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b18-00991	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 綿本 有希子, 二若 久美, 林 美沙, 光谷 真奈, 松下 翠, 平尾 明日香, 桑原 晶子, 片岡 和二郎他
2. 発表標題 エネルギー代謝調節因子としてのGATAファミリー
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 松下 翠, 二若 久美, 林 美沙, 平尾 明日香, 光谷 真奈, 小山 理恵, 福田 佑紀, 綿本 有希子他
2. 発表標題 ミトコンドリア脱共役タンパク質を介したエネルギー代謝に関する基礎的検討
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 綿本 有希子, 二若 久美, 林 美沙, 松下 翠, 村上 佳奈, 主田 綾佳, 根津 祥子, 柴原 晶子, 片岡 和三郎他
2. 発表標題 IGF-1の抗肥満作用を標的としたシグナル伝達経路に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会. 第139年会
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
--	---------------------------	-----------------------	----