

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08860

研究課題名(和文) 2型糖尿病発症における膵細胞でのmTORC1活性調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of mTORC1 activity in pancreatic beta cells in the development of type 2 diabetes

研究代表者

浅原 俊一郎 (Asahara, Shun-ichiro)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00570342

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)：膵細胞量減少機序は未だ解明されていないが、2型糖尿病患者の膵島におけるmTORC1活性化の関与が考えられている。そこで、膵細胞特異的TSC2ノックアウト(TSC2KO)を用いて解析を行った。TSC2KOではクロモグラニンA陽性かつ膵島ホルモン陰性細胞の増加を認めたことから、分化による影響が考えられた。TSC2KOの膵島においてはアミラーゼ陽性細胞が見られ、外分泌細胞の転写因子であるPtf1aとクロモグラニンAとの共陽性も認められた。今回の結果から、mTORC1の恒常的活性化によって、細胞は高齢期において外分泌細胞に分化転換することで細胞の減少が引き起こされる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は1型、2型いずれにおいても、膵細胞量が発症において重要な因子となる。膵細胞量減少機序については、これまでに多くの報告があるが、いまだに臨床応用されるようなものはない。代表者は糖尿病膵島でmTORC1が活性化されていることに注目し、mTORC1活性調節を制御することが出来れば、1型糖尿病の根治や2型糖尿病の発症予測ができるのではないかと考えた。本研究を進展させることによって、将来的な膵細胞不全の治療・予防につながるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Although the mechanism of pancreatic β -cell volume reduction has not yet been elucidated, mTORC1 activation in islets of type 2 diabetes patients is thought to be involved. In this study, we analyzed pancreatic β -cell-specific TSC2 knockout (TSC2KO). TSC2KO showed an increase in chromogranin A-positive and islet hormone-negative cells, suggesting a differentiation effect. TSC2KO islets showed amylase-positive cells, which were associated with the exocrine cells, and co-positivity of Ptf1a and chromogranin A, a transcription factor of exocrine cells, was also observed. These results suggest that homeostatic activation of mTORC1 may cause a decrease in β -cells by converting them into exocrine cells in old age.

研究分野：糖尿病・代謝学

キーワード：膵細胞 可塑性 mTORC1 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の糖尿病有病者や糖尿病予備軍はいずれも 1000 万人と推計されており、年々増加の一途をたどっている。2 型糖尿病の発症には膵細胞不全やインスリン抵抗性が関係しており、特に日本を含めた東アジア人では膵細胞不全が重要であることが知られている。膵細胞不全は、グルコースなどの刺激に対してインスリンを適切に分泌できないインスリン分泌不全と膵細胞量の減少によって引き起こされるが、インスリン分泌能や膵細胞量の調節には膵細胞におけるインスリンシグナルが関わっていることが明らかとなっている。インスリンシグナル中の mTOR は複数のタンパク質と複合体を形成し、複合体は mTORC1 と mTORC2 と呼ばれる。2 型糖尿病の膵島では特に mTORC1 が活性化しているとされている。

これまでに、インスリンシグナルに含まれる PDK1 をノックアウトすると転写因子 Foxo1 が活性化し細胞量が減少するが、Foxo1 をノックアウトすると細胞数が回復し血糖値が改善するということが報告された。PDK1 をノックアウトすると mTORC1 活性も低下するため同時に細胞のサイズが減少する。したがって mTORC1 を活性化させると細胞が増大し糖尿病発症を抑制できるのではないかと考え、mTORC1 を抑制している TSC2 を膵細胞特異的に欠損させたマウスを作製した。TSC2 は結節性硬化症の原因遺伝子として同定された遺伝子でもあり、Akt によってリン酸化を受け mTORC1 活性を制御し、膵細胞サイズの規定に関与している。これまでの研究で膵細胞特異的 TSC2 ノックアウトマウス (TSC2KO) では、mTORC1 の活性化により細胞の大きさが増加し、若年では低血糖および高インスリン血症を示すが、高週齢になると主に細胞数の減少が原因で血糖値が上昇しはじめることが分かっている。また、TSC2KO は肥満にはならないという特徴がある。この血糖推移はヒトが 2 型糖尿病を発症する際と同様であり、かつ日本人は肥満になりにくいことから、TSC2KO は日本人の 2 型糖尿病モデルマウスになりうると考えている。我々の研究室ではこれまでに、TSC2KO が高血糖になり糖尿病を発症する際、mTORC1 の活性化を介してインスリンシグナルの減弱化やオートファジー障害が起こっていることを報告している。

2. 研究の目的

膵細胞における mTORC1 活性化が膵細胞量減少に寄与していることは、我々を含め複数の研究室から報告されており、確かな現象であると考えられる。一方、膵細胞量減少の機序としては、アポトーシス亢進と増殖能低下が知られているが、分化に関する検討はこれまで報告されていない。近年、膵細胞量減少において膵細胞脱分化が重要であることが明らかになっており、膵細胞における mTORC1 活性亢進が、脱分化と関連している可能性を考えた。そこで本研究計画では、膵細胞における mTORC1 活性亢進が膵島の分化に及ぼす影響について検討することを目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

マウス

2 型糖尿病モデルマウスとして、膵細胞に特異的に Cre が発現する Ins-Cre マウスと TSC2 floxed マウスを交配して膵細胞特異的 TSC2 ノックアウトマウス (TSC2KO) を作製した。対照 (Control) として TSC2 flox/flox マウスを使用した。TSC2KO と Control の血糖値と体重を 10 週齢から測定し、細胞量や細胞量の変化を観察した。またインスリンが発現した細胞でのみ YFP が継続的に発現するように、R26R YFP マウスと TSC2KO を交配し、TSC2KO・YFP マウスとして、TSC2(flox/flox)YFP(YFP+)Cre+ を作成した。対照 (Control) として、TSC2(flox/+)YFP(YFP+)Cre+ を使用した。マウスのジェノタイピングは尻尾から抽出した DNA を用いて PCR により確認した。

免疫染色

解剖で抽出したマウスの膵臓に対して、4% paraformaldehyde (PFA) で固定し、パラフィン切片にした。また、PFA で固定した膵臓を OTC コンパウンドを用いて凍結切片にした。インスリン・グルカゴン染色では、賦活化処理はせず、blocking one histo(ナカライ)でブロッキングをした。一次抗体は抗インスリン(DAKO)、抗グルカゴン(Sigma)を使用し、二次抗体には FITC または Cy3 標識抗マウス・モルモット抗体(Jackson Immuno Research)を用いた。

RNAseq

TSC2KO の膵島単離を行い、RNA 抽出を行った。RNA 抽出は RNeasy Plus Mini Kit(QIAGEN) を用いて行った。RNA サンプルは 18 μ l 使用し、Macrogen Japan に解析を依頼した。

統計解析

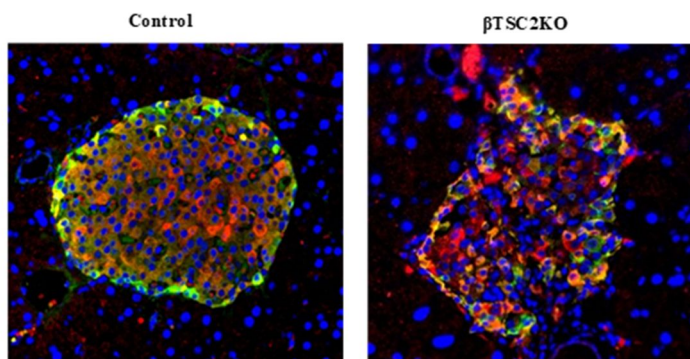
データ分析にはスチューデントの t 検定を使用した。統計的に有意差を示すために、 $p < 0.05$ の閾値を使用した。 $p < 0.05$ なら *、 $p < 0.01$ なら ** と示した。

4. 研究成果

Control と TSC2KO の 10 週齢、40 週齢、60 週齢についての細胞量、細胞量を比較すると、血糖値が上昇していない 10 週齢から 40 週齢にかけて既に細胞量減少を認めた。血糖値の上昇後 40 週齢から 60 週齢にかけてさらに細胞量は減少し、細胞も 60 週齢において減少した。さらに、インスリン・グルカゴンの免疫染色を行った。10 週齢と 40 週齢の膵島は Control に比べて著しく大きく、細胞 1 つ 1 つの大きさが肥大化していた。それに比べて 60 週齢では 40 週齢よりも膵島は小さく形も崩れていた。

そこで細胞量減少の機序を解明するべく、分化に関する検討を行った。膵臓内分泌 4 ホルモン(インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、PP)とクロモグラニン A の免疫染色を行った(図 1)。Control では、4 ホルモンとクロモグラニン A が共染するのに対して、TSC2KO ではクロモグラニン A 陽性、4 ホルモン陰性細胞が確認された。

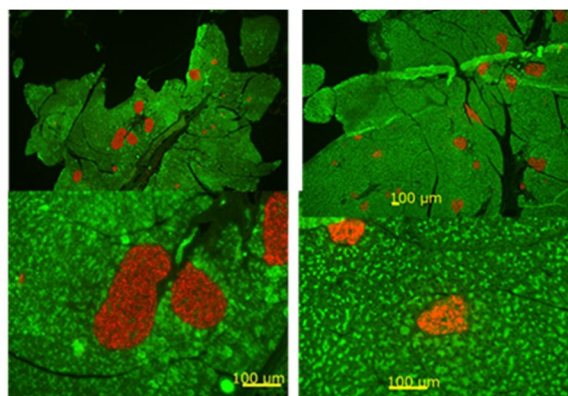
膵内分泌細胞の可塑性の評価の一環としてインスリン・アミラーゼの共染色を行った(図 2)。結果、Control ではアミラーゼとインスリンが著明に染め分けられたのに対し、TSC2KO ではアミラーゼ・インスリンが共染している像を低倍率で確認した。強拡大においても 60 週齢の TSC2KO ではアミラーゼとインスリンが共染した。45 週齢のマウス



【図 1. 4Hormon(Insulin, Glucagon, somatostatin, PP)/Chromogranin A/DAPI 染色】
膵島内分泌 4 ホルモン発現の比較

にアミラーゼ・クロモグラニン A 染色を行った。Control ではアミラーゼとクロモグラニン A が染め分けられる一方、TSC2KO では共染が確認された。強拡大でも周囲の外分泌腺よりは淡いものの、Control と比較してアミラーゼが発現する膵島を認めた。また、膵島でのアミラーゼ発現の経過を観察すると、10 週齢においてアミラーゼ染色では Control と TSC2KO に差は認められない。しかし TSC2KO では、40w はアミラーゼが弱く発現し、60w では周囲の外分泌腺と同程度に発現する。

そこで膵島に発現したアミラーゼ陽性細胞の由来を検討するべく、アミラーゼの転写因子である Ptf1a に注目した。40 週齢のマウスにクロモグラニン A・Ptf1a 染色を行ったところ、Control では染め分けられたのに対し、TSC2KO では共染していた。また 10 週齢のマウスに関しても、クロモグラニン A・Ptf1a 染色を行ったところ、40 週齢と同様に TSC2KO のみ共染していた。よって TSC2KO の膵島では早期から内分泌細胞で Ptf1a が発現している。



【図 2 Chromogranin A/Amylase 染色】
45 週齢の弱拡と強拡で示す膵島におけるアミラーゼ共発現の比較
(上段：弱拡大、下段：強拡大)

次に低週齢で起きていることを確認するべく、10 週齢 TSC2KO の膵島を用いて、RNAseq を行った。すると、膵細胞の成熟に関するマーカーが低下して

いた。なかでも転写因子である PDX1、NKX6.1、MafA に注目し、免疫染色を行った。Control と比較し、TSC2KO の膵島では、PDX1、NKX6.1、MafA の陰性細胞が増加していた。よって TSC2KO の細胞では成熟マーカーが低下していると考えられた。

日本人の2型糖尿病患者には、欧米人と比べ肥満があまり見られないことから、特に膵細胞不全に伴うインスリン分泌低下が重要な機序と言われている。2型糖尿病患者の膵細胞不全の成因として、膵細胞の質的異常に加え、量的異常も関連していると言われている。細胞は自己複製による増殖のみでなく、細胞から分化転換などで増殖し、異常時にはアポトーシスや脱分化によって減少する。量的異常を起こす誘因として脂肪毒性や糖毒性などが挙げられるが、糖尿病状態のヒト膵島では mTORC1 が活性化していることが報告されている。mTORC1 はリボソームの生合成、タンパク質合成、オートファジーの抑制を促進しており、mTORC1 が活性化されるとこれらの代謝経路が亢進し、細胞成長が促されるので、細胞サイズは大きくなる。しかし、mTORC1 の恒常的な活性化が続くと、ネガティブフィードバック機構を介して IRS タンパク量が減少し、最終的に細胞数は減少する。

加えて、今回の結果から、mTORC1 が活性化した細胞は早期に未成熟化し、未成熟な細胞は高齢期に外分泌細胞へと分化転換する可能性が示された。現在、内分泌細胞で起こる分化調節のバリエーションについて、細胞から細胞、細胞から細胞、細胞から細胞、外分泌細胞から細胞などが認められている(1)。しかし、本研究で検討している細胞から外分泌細胞についての報告はない。また、糖尿病患者において高血糖状態では、ヒトの膵島でアミラーゼ陽性内分泌細胞を認める報告もあるが、メカニズムに関しては不明である(2)。これらの点から、細胞から外分泌細胞への分化を検討する本研究は新規性が高いと考える。

今後はこの細胞から外分泌細胞への分化が mTORC1 特異的なものであることを証明したい。そこで mTORC1 の抑制剤であるラパマイシンを投与し、TSC2KO の膵島で Ptf1a・アミラーゼ発現が減少するか検討予定である(3)。

そして、Wild マウスの親に高脂肪食負荷を行うことで、胎児で mTORC1 を活性化させ、膵島の未成熟化や Ptf1a 発現が起こるか検討予定である。また、生後に mTORC1 が亢進した場合でもこの変化が起こるか検討するべく InsCre-ER マウスを用いて、タモキシフェン投与後に膵島の未成熟化、Ptf1a 発現が起こるか検討予定である。

糖尿病における前高血糖状態での mTORC1 活性化が膵細胞量減少に与える影響が明らかとなれば、将来的に2型糖尿病の予防や早期発見に繋がると期待される。

【引用文献】

1. Cigliola V. Stress-induced adaptive islet cell identity changes. *Diabetes Obes Metab. Suppl 1(Suppl 1):87-96,2016.*
2. Amo-Shiinoki K. Islet cell dedifferentiation is a pathologic mechanism of long-standing progression of type 2 diabetes. *JCI insight;6(1) e143791,2021.*
3. Mori H, Kun-Liang G ,et al. Critical roles for the TSC-mTOR pathway in β -cell function. *Am J Physiol Endocrinol Metab; 297(5): E1013-E1022.2009*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Han G, Takahashi H, Murao N, Gheni G, Yokoi N, Hamamoto Y, Asahara SI, Seino Y, Kido Y, Seino S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Glutamate is an essential mediator in glutamine-amplified insulin secretion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 920-930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13497.	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 Asahara S	4. 巻 12
2. 論文標題 Patch-seq shows the heterogeneity of pancreatic islet cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 691-693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13514.	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 Asakawa T, Onizawa M, Saito C, Hikichi R, Yamada D, Minamidate A, Mochimaru T, Asahara SI, Kido Y, Oshima S, Nagaishi T, Tsuchiya K, Ohira H, Okamoto R, Watanabe M.	4. 巻 56
2. 論文標題 Oral administration of D-serine prevents the onset and progression of colitis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 732-745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01792-1.	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 Asahara SI, Inoue H, Kido Y.	4. 巻 46
2. 論文標題 Regulation of Pancreatic β -Cell Mass by Gene-Environment Interaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes Metab J.	6. 最初と最後の頁 38-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4093/dmj.2021.0045.	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 Asahara S, Inoue H, Watanabe H, Kido Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Roles of mTOR in the Regulation of Pancreatic β -Cell Mass and Insulin Secretion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12050614	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 該当する

1. 著者名 Asahara S	4. 巻 -
2. 論文標題 Patch-seq shows the heterogeneity of pancreatic islet cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13514.	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 Han G, Takahashi H, Murao N, Gheni G, Yokoi N, Hamamoto Y, Asahara SI, Seino Y, Kido Y, Seino S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Glutamate is an essential mediator in glutamine-amplified insulin secretion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 --
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13497.	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 Asahara SI, Miura H, Ogawa W, Tamori Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Sex difference in the association of obesity with personal or social background among urban residents in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0242105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0242105.	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 Inoue H, Asahara SI, Sugiura Y, Kawada Y, Imai A, Hara C, Kanno A, Kimura-Koyanagi M, Kido Y.	4. 巻 534
2. 論文標題 Histone deacetylase 6 regulates insulin signaling in pancreatic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun .	6. 最初と最後の頁 896-901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.10.078.	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 Kanno A, Asahara SI, Furubayashi A, Masuda K, Yoshitomi R, Suzuki E, Takai T, Kimura-Koyanagi M, Matsuda T, Bartolome A, Hirota Y, Yokoi N, Inaba Y, Inoue H, Matsumoto M, Inoue K, Abe T, Wei FY, Tomizawa K, Ogawa W, Seino S, Kasuga M, Kido Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 GCN2 regulates pancreatic cell mass by sensing intracellular amino acid levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e128820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.128820.	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 該当する

1. 著者名 Inoue H, Saito M, Kouchi K, Asahara SI, Nakamura F, Kido Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Association between mean platelet volume in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and diabetic macrovascular complications in Japanese patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 938-945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13198. Epub 2020 Jan 13.	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 Amano S, Suenaga S, Hamamoto K, Yada S, Tsuyama T, Shinoda S, Tanaka Y, Takemoto Y, Harada E, Tanabe K, Asahara S, Hoshii K, Takami T.	4. 巻 3
2. 論文標題 A case of multiple glucagonomas with no clinical manifestations of excess glucagon despite hyperglucagonemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 DEN Open	6. 最初と最後の頁 e230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/deo2.230. eCollection 2023 Apr.	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 Seike M, Asahara SI, Inoue H, Kudo M, Kanno A, Yokoi A, Suzuki H, Kimura-Koyanagi M, Kido Y, Ogawa W.	4. 巻 652
2. 論文標題 I-Asparaginase regulates mTORC1 activity via a TSC2-dependent pathway in pancreatic beta cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 121-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.02.035. Epub 2023	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 H, Du W, Son J, Sui L, Asahara SI, Kurland IJ, Kuo T, Kitamoto T, Miyachi Y, de Cabo R, Accili D.	4. 巻 15
2. 論文標題 Cyb5r3-based mechanism and reversal of secondary failure to sulfonylurea in diabetes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Transl Med.	6. 最初と最後の頁 eabq4126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.abq4126. Epub 2023 Feb 1	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 該当する

1. 著者名 1. 著者名 4. 巻 Inaba Y, Hashiuchi E, Watanabe H, Kimura K, Oshima Y, Tsuchiya K, Murai S, Takahashi C, Matsumoto M, Kitajima S, Yamamoto Y, Honda M, Asahara SI, Ravnskjaer K, Horike SI, Kaneko S, Kasuga M, Nakano H, Harada K, Inoue H.	4. 巻 14
2. 論文標題 The transcription factor ATF3 switches cell death from apoptosis to necroptosis in hepatic steatosis in male mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-35804-w.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 原千佐子、浅原俊一郎、木戸良明
2. 発表標題 2型糖尿病感受性遺伝子Kcnq1遺伝子領域による膵 細胞量調節機構の解明
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 浅原俊一郎
2. 発表標題 臍島ホメオスタシスにおいてmTORが果たす役割の解明
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022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		
米国	Columbia University		