

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08887

研究課題名(和文) 膵細胞脱分化におけるTxnipシグナル解明に基づく糖尿病治療の研究

研究課題名(英文) The elucidation of Txnip-dependent mechanisms in pancreatic beta cell dedifferentiation leading diabetes

研究代表者

田部 勝也 (TANABE, KATSUYA)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00397994

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)：ウォルフラム症候群では膵細胞がインスリンを合成できない未分化な細胞へ脱分化し糖尿病を発症する。しかし、脱分化のメカニズムや治療法は不明である。この研究において、疾患モデルマウスの膵細胞ではTxnipという分子が過剰に発現しており、細胞に必要な遺伝子機能やエネルギー代謝の抑制に関与することを突き止めた。さらに、モデルマウスにおいてTxnipを抑制し脱分化と糖尿病の発症を予防することに成功した。また、一般の糖尿病の治療に用いられるGLP-1がモデルマウスの膵細胞でTxnipを減少し分化能とインスリン分泌を維持することを明らかにし、脱分化への治療応用の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

糖尿病は血糖値を下げるインスリンが十分に分泌されないことで発症する。この原因は現在でも十分解明されていないが、私たちはインスリンを産生分泌する細胞でこれまでに知られていない脱分化という細胞現象よりこの難問の解明に取り組んでいる。この研究で取り上げているウォルフラム症候群は希少な疾患であるが、病気の発症メカニズムはわが国に1000万人以上とされる2型糖尿病と多くの共通点があり、脱分化現象は2型糖尿病でも観察される。そのため、研究成果はウォルフラム症候群だけではなく一般の糖尿病の発症や病気が進行するメカニズムの解明とともに新しい治療法の開発にも貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic beta-cells become dedifferentiated in Wolfram syndrome caused by the WFS1 mutations. We investigated molecular mechanisms underlying beta-cell dedifferentiation in Wfs1KO mice. We found that Txnip highly expressed in mutant islets implicated to attenuated oxidative glycolysis and negative regulation of numerous genes involved in beta-cell function, oxidative metabolism, and development. The role of Txnip in beta-cell dedifferentiation was examined by crossing Wfs1KO mice with TxnipKO mice. A loss of Txnip maintained beta-cell identity and insulin secretion, and none of the double KO mice developed hyperglycemia over a 50-week observation period. Furthermore, the chronic administration with GLP-1 alleviated beta-cell dedifferentiation and restored the function in Wfs1KO mice with decreasing Txnip expression in islets. Taken together, Txnip could be a therapeutic target for prevention of beta-cell dedifferentiation and insulin insufficiency in Wolfram syndrome.

研究分野：内分泌学、代謝学、内科学

キーワード：糖尿病 膵細胞 インスリン 小胞体ストレス 脱分化 GLP-1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

機能的細胞量の減少は糖尿病の重要な成因であるが、これを阻止する有効な方法は確立されておらず、細胞数減少のメカニズムには不明な点が多い。近年、膵島内の細胞可塑性が明らかにされ、糖尿病病態における細胞可塑性の制御機構に注目が集まっている。研究代表者はインスリン依存性糖尿病を主徴とするウォルフラム症候群の疾患モデルであり小胞体ストレス病態モデルとして認知される *Wfs1* 欠損マウス (引用文献 1-2) において、成体膵細胞が高血糖非依存的に膵内分泌前駆様細胞に脱分化することでインスリン産性能を失い、一部の細胞では細胞や膵内分泌細胞へ分化転換することを明らかにしてきた。*Wfs1* 欠損マウスは脱分化を明瞭に示すユニークな動物モデルとして脱分化の細胞機構の解明に適していると考えられる。一方、ストレス応答分子である *Txnip* は多様な細胞内シグナル制御に関与し生理的役割とともに種々の疾患モデル動物の解析より病態生理作用が知られ、糖尿病との関連ではインスリン分泌障害や膵細胞アポトーシス誘導への関与が報告されている (引用文献 3)。我々は、小胞体ストレス亢進との関連において *Wfs1* 欠損マウスの膵島において *Txnip* の発現が著明に増加していることを見出しており、脱分化機構との関連が推察された。

### 2. 研究の目的

*Wfs1* 欠損マウスにおいて *Txnip* 抑制による細胞脱分化予防を明らかにし、*Txnip* による細胞内エネルギー代謝と細胞脱分化におけるゲノム機能調節を解明する。さらに、GLP-1 受容体作動薬による脱分化に対する効果と *Txnip* 発現への影響を解明する。これらに基づき膵細胞脱分化の分子病態を解明し、*Txnip* について治療標的としての意義を確立する。

### 3. 研究の方法

- (1). *Wfs1* 欠損マウスと *Txnip* 欠損マウス (引用文献 4) を交配し二重欠損マウスを樹立し、グルコース代謝およびインスリン分泌能、膵組織解析を行った。また、*Wfs1*:*Txnip* 二重欠損-ROSA26-YFP:*rip-Cre* マウスを作成し、遺伝的系譜解析を行った (引用文献 5)。
- (2). 単離膵島を用いてグルコース応答性インスリン分泌、ATP 含量測定、および細胞外フラックスアナライザーにより代謝動態を解析した。
- (3). 単離膵島を用いて ATAC-seq を行い、これまでに行った RNA-seq と統合的にデータ解析を行った。
- (4). 単離膵島によるメタボローム解析に基づき、*Txnip* を介したピルビン酸脱水素酵素リン酸化調節機構を単離膵島および HEK293 細胞を用いて解析した。
- (5). *Txnip* を過剰発現させた HEK293 細胞を用いて Pull-down assay と質量解析を行い主要な結合分子を同定した。
- (6). 6 週齢 *Wfs1* 欠損マウスに GLP-1 アナログの Exendin4 を 4 週間投与し耐糖能やインスリン分泌能とともに膵組織解析を行った。
- (7). *Wfs1* 欠損単離膵島を Exendin4 で処理し *Txnip* の発現変化を解析し、さらに、マウスインスリンノーマ細胞に薬理学的な小胞体ストレスで *Txnip* を発現誘導し、Exendin4 による *Txnip* 蛋白安定性への影響を解析した。

### 4. 研究成果

インスリン依存性糖尿病を特徴とするウォルフラム症候群の疾患モデル *Wfs1* 欠損マウス (KO) では細胞が脱分化しインスリン分泌不全をきたす。KO 膵島では小胞体ストレス亢進とともに *Txnip* の発現が増加し、*Wfs1*:*Txnip* 二重欠損マウス (DKO) では脱分化が抑止され全個体で高血糖の進展が予防された (図 1)。

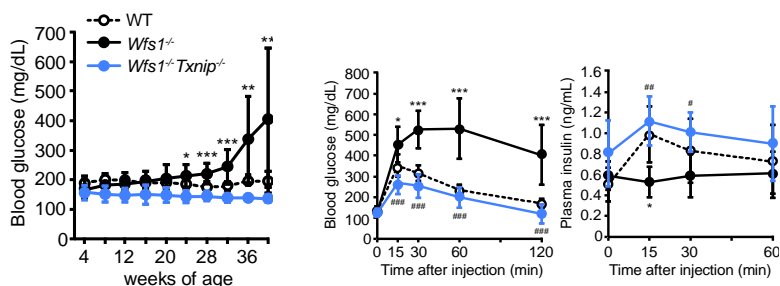


図 1. *Txnip* 欠損による高血糖進展抑制とインスリン分泌の回復

DKO 膵島では小胞体ストレス応答がむしろ亢進しており Txnip が他の経路を介して脱分化誘導に関与することが考えられた。細胞数が維持される 10 週齢 KO の膵島ではピルビン酸脱水素酵素 (PDH) の機能抑制性リン酸化が亢進し、酸化的解糖が著しく減弱した。一方、DKO 膵島では PDH のリン酸化亢進が解除されており高グルコース存在下での解糖速度、酸素消費速度、ATP 産生およびインスリン分泌が野生型と同等にまで回復した。この分子機構として Txnip が PDH と PDH kinase と蛋白結合を介して PDH のリン酸化調節に関与することを突き止めた。一方、Txnip と HDAC3 の蛋白結合を見出し、ゲノム機能との関連について ATAC-seq を行い検討した。KO 膵島では、Ins2 や MafA のプロモーター領域や転写調節領域のオープンクロマチン量が減少するが、これらが DKO 膵島では回復した。一方、GLP-1 受容体活性化により Txnip の発現が転写レベルと翻訳後レベルで抑制された。Exendin4 を慢性投与した KO では膵島における Txnip 発現が遺伝子発現とともに蛋白発現が抑制された (図 2)。さらに、細胞実験において Exendin4 処理は Txnip の蛋白安定性を抑制することが明らかになった。重要なことに、Exendin4 を投与したマウスの膵臓では MafA 陽性細胞数の回復と Ngn3 陽性細胞数の減少を認め、GLP-1 治療による脱分化抑制が示唆された。

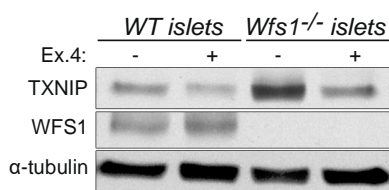


図 2. GLP-1 受容体作動薬による Txnip 発現抑制

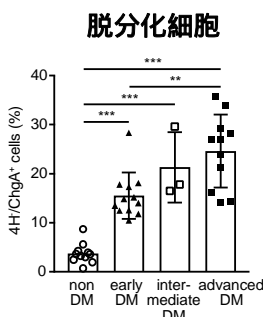


図 3. 2 型糖尿病病態進展における脱分化細胞の増加

これらの結果は、ウォルフラム症候群における細胞不全の病態解明とともに Txnip を標的とする治療戦略の提案につながる。くわえて、本研究では 2 型糖尿病でも細胞脱分化が疾患進行に深く関与することを明らかにし (図 3) (引用文献 6) Wfs1 欠損マウスにおける脱分化機構の解明が一般の糖尿病の病態理解にも寄与すると考えられる。一方、ウォルフラム症候群のアンメットニーズとして神経変性疾患が挙げられるが、神経変性病態における Txnip の役割は不明であり、今後の研究が必要である。

(引用文献)

Wolfram syndrome in the Japanese population; molecular analysis of WFS1 gene and characterization of clinical features. Matsunaga K, Tanabe K, Inoue H, Okuya S, Ohta Y, Akiyama M, Taguchi A, Kora Y, Okayama N, Yamada Y, Wada Y, Amemiya S, Sugihara S, Nakao Y, Oka Y, Tanizawa Y. PLoS One, 9(9): e106906. 2014

Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves

beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome. Manabu Kondo, Katsuya Tanabe, Kikuko Amo-Shiinoki, Masayuki Hatanaka, Tsukasa Morii, Harumi Takahashi, Susumu Seino, Yuichiro Yamada, Yukio Tanizawa. *Diabetologia*, 61(10) 2189-2201. 2018

TXNIP/TBP-2: A Master Regulator for Glucose Homeostasis. Eiji Yoshihara. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Aug 18;9(8):765.

Disruption of TBP-2 ameliorates insulin sensitivity and secretion without affecting obesity. Eiji Yoshihara, Shimpei Fujimoto, Nobuya Inagaki, Katsuya Okawa, So Masaki, Junji Yodoi, Hiroshi Masutani. *Nat Commun*. 2010 23;1:127.

Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. Shankar Srinivas, Tomoko Watanabe, Chyuan-Sheng Lin, Chris M, William, Yasuto Tanabe, Thomas M Jessell and Frank Costantini. *BMC Developmental Biology* (2001) 1:12.

Islet cell dedifferentiation is a pathologic mechanism of longstanding progression of type 2 diabetes. Kikuko Amo-Shiinoki, Katsuya Tanabe, Yoshinobu Hoshii, Hiroto Matsui, Risa Harano, Tatsuya Fukuda, Ryotaro Bouchi, Tokiyo Takagi, Masayuki Hatanaka, Komei Takeda, Shigeru Okuya, Wataru Nishimura, Atsushi Kudo, Shinji Tanaka, Minoru Tanabe, Takumi Akashi, Tetsuya Yamada, Yoshihiro Ogawa, Eiji Ikeda, Hiroaki Nagano, Yukio Tanizawa. *JCI Insight*, 6(1): e143791. 2021

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Kagawa S, Tanabe K, Hiromura M, Ogawa K, Koga T, Maeda T, Amo-Shiinoki K, Ochi H, Ichiki Y, Fukuyama S, Suzuki S, Suizu N, Ohmine T, Hamachi S, Tsuneki H, Okuya S, Sasaoka T, Tanizawa Y and Nagashima F	4. 巻 14
2. 論文標題 Hachimijiogan, a traditional herbal medicine, modulates adipose cell function and ameliorates diet-induced obesity and glucose intolerance in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1167934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2023.1167934	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(1)
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	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 Nagao Y, Amo-Shiinoki K, Nakabayashi H, Hatanaka M, Kondo M, Matsunaga K, Emoto M, Okuya S, Tanizawa Y, Tanabe K	4. 巻 23
2. 論文標題 Gsk-3-Mediated Proteasomal Degradation of ATF4 Is a Proapoptotic Mechanism in Mouse Pancreatic -Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 13586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232113586	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 Fukuda T, Bouchi R, Takeuchi T, Amo-Shiinoki K, Kudo A, Tanaka S, Tanabe M, Akashi T, Hirayama K, Odamaki T, Igarashi M, Kimura I, Tanabe K, Tanizawa Y, Yamada T, Ogawa Y	4. 巻 44(4)
2. 論文標題 Importance of Intestinal Environment and Cellular Plasticity of Islets in the Development of Postpancreatectomy Diabetes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes Care	6. 最初と最後の頁 1002-1011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/dc20-0864.	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 Amo-Shiinoki K, Tanabe K, Hoshii Y, Matsui H, Harano R, Fukuda T, Takeuchi T, Bouchi R, Takagi T, Hatanaka M, Takeda K, Okuya S, Nishimura W, Kudo A, Tanaka S, Tanabe M, Akashi T, Yamada T, Ogawa Y, Ikeda E, Nagano H, Tanizawa Y	4. 巻 6(1)
2. 論文標題 Islet cell dedifferentiation is a pathologic mechanism of long-standing progression of type 2 diabetes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e143791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.143791.	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 Tanabe K, Nishimura S, Sugahara K, Yamashita H, Tanizawa Y.	4. 巻 7(2)
2. 論文標題 A patient with sudden hearing loss induced by propylthiouracil.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e06196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e06196.	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 Kurimoto J, Takagi H, Miyata T, Hodai Y, Kawaguchi Y, Hagiwara D, Suga H, Kobayashi T, Sugiyama M, Onoue T, Ito Y, Iwama S, Banno R, Tanabe K, Tanizawa Y, Arima H.	4. 巻 24
2. 論文標題 Deficiency of WFS1 leads to the impairment of AVP secretion under dehydration in male mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pituitary	6. 最初と最後の頁 582-588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11102-021-01135-6.	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9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 田部 勝也, 椎木 幾久子, 谷澤 幸生, 奥屋 茂
2. 発表標題 グルカゴン需要増大に対する 細胞の挙動と細胞量調節機構
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) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 椎木 幾久子, 田部 勝也, 幡中 雅行, 奥屋 茂, 谷澤 幸生
2. 発表標題 糖尿病における膵島細胞の可塑性と脱分化
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) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Zou Meng, 田部 勝也, 椎木 幾久子, 田口 昭彦, 河野 大輔, 北村 忠弘, 奥屋 茂, 増谷 弘, 谷澤 幸生
2. 発表標題 Txnip preserves brown fat innate thermogenic activity
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田部勝也
2. 発表標題 糖尿病における膵島細胞の可塑性と脱分化
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 椎木幾久子, 田部勝也, 幡中雅行, 奥屋茂, 福田達也, 竹内崇人, 坊内良太郎, 山田哲也, 小川佳宏, 谷澤幸生
2. 発表標題 膵 細胞脱分化は2型糖尿病の病態進展に関連する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田部 勝也, 椎木 幾久子, 幡中 雅行, 谷澤 幸生
2. 発表標題 膵 細胞脱分化は2型糖尿病の病態進展に関連する
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椎木 幾久子, 田部 勝也, 佐藤 吉彦, 駒津 光久, 谷澤 幸生
2. 発表標題 膵 細胞脱分化は糖尿病患者の膵 細胞不全に関連する
3. 学会等名 第70回日本体質医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋山優, 藤本留理子, 淀川拓馬, 竹田孔明, 田部勝也, 内野真也, 横山繁生, 谷澤幸生
2. 発表標題 壮年期に診断されたMEN2Aの一例
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kikuko Amo-Shiinoki, Katsuya Tanabe, Ryotaro Bouchi, Wataru Nishimura, Yoshihiro Ogawa, Yukio Tanizawa
2. 発表標題 Islet beta-Cell Dedifferentiation Is Involved in Progression of Type 2 Diabetes.
3. 学会等名 80th Annual Meeting and Scientific Sessions of the American Diabetes Association (国際学会)
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 椎木幾久子, 田部勝也, 谷澤幸生	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学出版社	5. 総ページ数 96
3. 書名 月刊糖尿病	

〔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
---------	---------