

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08918

研究課題名(和文) 膵島ホルモン分泌細胞の代謝特性の解析と偽膵島作製による代謝・分泌障害機構の解明

研究課題名(英文) Metabolic features of hormone secreting cells in pancreatic islets and analyses of their dysfunction using pseudo-islets

研究代表者

石原 寿光 (ISHIHARA, Hisamitsu)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60361086

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)：インスリン分泌MIN6細胞のグルコース代謝と分泌能の関係を、クエン酸回路構成酵素の発現修飾することにより解析し、グルタミン酸を生成する過程の重要性を見出した。また、糖代謝全体を調節する可能性のある転写因子としてSox11を見出したが、Sox11はepithelial-mesenchymal transition (EMT)に重要であるので、Sox11が代謝リプログラミングと細胞の運命をつなげる因子である可能性が推定される。

さらに、グルカゴン分泌 TC1細胞とMIN6細胞から作製する偽膵島の解析により、2種類の細胞が協調して特殊な局在をとって、ホルモン分泌制御を行っている可能性を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、膵細胞のインスリン分泌機構の解明を進めるもので、ひいてはインスリン分泌を増強させる薬剤の開発につながる。インスリン分泌を増強する場合には、細胞の疲弊をもたらさないことが重要であるが、本研究ではインスリン分泌と細胞の運命の両者を制御する因子の候補が見出された。このような因子の存在は、細胞の疲弊無しにインスリン分泌を増強する薬剤の開発の第一歩となるものである。このターゲットを修飾する食品成分の同定ができれば、2型糖尿病発症・進展予防の食事戦略の開発にもつながる。さらに、偽膵島を用いた解析は、複数の構成細胞からなる膵島のホルモン分泌メカニズムの解明に展開できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：By analyzing effects of modulation of expression levels of several enzymes constituting the TCA cycle in insulin secreting MIN6 cells, we have suggested that glutamate is important for the metabolism-secretion coupling in insulin secretion evoked by glucose. We have also identified Sox11 as a transcription factor regulating general glucose metabolism in insulin secreting cells. Since Sox11 is known to be a factor important for the epithelial mesenchymal transition, Sox11 may be important for metabolic reprogramming in cell fate determination in insulin secreting cells.

In addition, we successfully generated pseudo-islets from insulin secreting MIN6 cells and glucagon secreting aTC1 cells. Our analyses suggested that the two cell types establish a specific configuration in the cell clusters, which may be important for their hormone secreting properties.

研究分野：代謝学

キーワード：pancreatic beta-cells pancreatic alpha-cells glucose metabolism metabolic reprogramming

## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病の原因の中心は、膵 β 細胞のインスリン分泌の低下であり、β 細胞のインスリン分泌機構の詳細と 2 型糖尿病における障害の本態を解明することは、2 型糖尿病の病態解明や創薬標的の同定のために重要である。一方、膵 α 細胞の研究は、β 細胞の研究に比して遅れているが、最近になり、β 細胞機能を下支えする役割やストレス下に β 細胞に分化して β 細胞量を保持するメカニズム、すなわち β 細胞の供給源としての α 細胞の役割が、新たに発見がなされている。このことから、糖尿病の主因であるインスリン分泌低下のメカニズムを理解するためには、α 細胞の理解も重要である。

インスリン分泌の低下は、β 細胞数そのものの減少と β 細胞の機能低下という 2 つの原因によって起こると考えられている。この 2 つの原因が独立して起こるのか、共通の要因によって起こるのかは、議論が分かれる。最近になり、β 細胞数の減少は、β 細胞の死滅だけでなく、β 細胞から他の細胞への(脱)分化によることも重要であることが明らかになっている。免疫担当細胞では、免疫応答の活性化に際し、代謝のリプログラミングが分化の根底にあり、分化の引き金になっていることが明らかにされてきている。そこで、β 細胞や α 細胞のグルコースを中心とする代謝が、ホルモン分泌に重要であるとともに、そのリプログラミングがこれら細胞の分化・生存にも重要である可能性が考えられる。したがって、膵島構成細胞の代謝特性を解明することは、代謝分泌連関と細胞分化・生存の両者の理解のために重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、

- 1) インスリン分泌細胞の代謝特性を、遺伝子発現修飾細胞を作製して明らかにすることを 2 つの大きな目的の一つとする。さらに、これを a) クエン酸回路構成酵素の発現を修飾して行うサブ課題と b) これまでに行ったインスリン分泌に重要である遺伝子候補の過剰発現スクリーニングで得られた *Sox11* 遺伝子の役割を明らかにするサブ課題にわけて、その解析を目的とする。また
- 2) インスリン分泌細胞株とグルカゴン分泌細胞株から偽膵島を作成して、インスリンあるいはグルカゴン分泌に対する変化および細胞内の両細胞の局在に対する影響を解析する、ことを 2 つめの目的とする。

## 3. 研究の方法

インスリン分泌 MIN6 細胞において、遺伝子発現修飾を効率化するためのマスター細胞株を作製してきたが、さらに汎用化させるために、未知の効率的遺伝子挿入位置として見出したゲノム内の位置を、Genome Walking 法により明らかにした。その遺伝子座への遺伝子挿入を行う目的で platform を設置するが、そのために行う genome 編集用の plasmid を構築した。これを用い、グルカゴン分泌 αTC1 細胞においても、platform を設置する。

遺伝子挿入用 platform を設置した MIN6 細胞および αTC1 細胞を用いて、クエン酸回路構成酵素の遺伝子発現を抑制する shRNA 発現細胞の作製を行った。それらの細胞株を用い、放射性同位元素で標識されたグルコース( [5-<sup>3</sup>H]glucose (解糖系流量の指標)、[U-<sup>14</sup>C]glucose (ミトコンドリア代謝の指標) ) の代謝を測定し、また細胞抽出液の代謝産物を質量分析により行った。また、インスリン分泌過程をよりダイナミックに解析するために、接着培養細胞系での灌流実験によるインスリン分泌動態を測定する実験系を確立し、適用した。

クエン酸回路を構成する酵素のうち、citrate synthase (*Cs*), oxoglutarate dehydrogenase (*Ogdh*), oxoglutarate dehydrogenase-like (*Ogdhl*), fumarate hydratase 1 (*Fhl*) に対する shRNA を発現する細胞を作製した。*Sox11* の発現修飾は、インスリン分泌応答を細胞生存の両者に著明な変化を与えたが、過剰発現細胞と発現抑制細胞で、詳細な検討を行った。

また、偽膵島を作製して解析する実験のために、αTC1 細胞の *Rosa26* の遺伝子座に CAG promoter-RFP あるいは mCherry 遺伝子を挿入した。同様に、MIN6 細胞の *Rosa26* の遺伝子座に CAG promoter-GFP 遺伝子を挿入した。MIN6 細胞におけるインスリン分泌細胞としての特徴を減弱させるために、dominant-negative PDX-1 を発現させる遺伝子を *Zxdb* 部位に挿入した。

## 4. 研究成果

### 新たな Safe harbor locus の同定

ランダムに MIN6 細胞に挿入した platform が最も効率的に作動するゲノム上の位置は、X 染色体の *Zxdb* 遺伝子の発現調節領域であり、開始コドンの 10.5 kbps 上流であった。

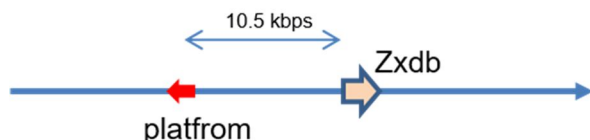


図 1

Furukawa A et al. J Diabet Invest 2021 に発表。遺伝子挿入 platform の X 染色体上の位置

この locus は、safe harbor site として重要である可能性が高いと考えられ、汎用性も期待されるため、特許出願した。

### クエン酸回路のインスリン分泌における役割

MIN6 細胞において、*Fhl* 遺伝子に対する shRNA をドキシサイクリン誘導性に発現させ、*Fhl* をノックダウンした細胞で、[5-<sup>3</sup>H]glucose 代謝及び[U-<sup>14</sup>C]glucose 代謝の測定、インスリン分泌実験、メタボラ

イト解析を組み合わせ、グルコース代謝とインスリン分泌のメカニズムの関連を検討した。*Fh1* のノックダウンは、細胞の生存能に影響が生じるより早期からインスリン分泌能の障害を示した。その際に、解糖系の亢進と細胞内 glutamate の低下が伴っていた。

次に、 $\alpha$ ketoglutarate から succinyl-CoA への変換を触媒する酵素を検討した。この反応には、*Ogdh* 及び *Ogdh-like (Ogdhl)* の 2 つの酵素があるので、*Ogdh*、*Ogdhl* に対する shRNA を発現させ、検討した。*Ogdh* ノックダウン細胞では、 $[5-^3\text{H}]$ glucose 代謝及び  $[U-^{14}\text{C}]$ glucose 代謝が共に低下し、多くの代謝産物が減少しているにもかかわらず、glutamate の増加を認め、インスリン分泌能が維持された。*Ogdh* ノックダウン細胞では、 $[5-^3\text{H}]$ glucose 代謝及び  $[U-^{14}\text{C}]$ glucose 代謝の増加と、glutamate の増加に伴う、インスリン分泌能の増加を認められた。これらの観察から、一貫した細胞内 glutamate レベルとインスリン分泌量の関係が推察された。その他に、*Cs* のノックダウンでも同様な傾向が認められた。

また、解糖系とクエン酸回路をつなぐ代謝経路として、mitochondrial pyruvate carrier (Mpc) が担う pyruvate の細胞質からミトコンドリアへの移送が重要である。Mpc は、Mpc1 と Mpc2 の 2 つの subunit からなるタンパクであるため、Mpc2 のノックダウンを MIN6 細胞で行った。Mpc2 タンパクを 10% 以下に低下させても、インスリン分泌は 50% 程度に低下するのみであり、解糖系の流量の低下やミトコンドリア代謝も軽度の障害を示すにとどまった。これらのことから、pyruvate が迂回してミトコンドリアに移送される経路の存在が推定された。

### Sox11 のインスリン分泌および細胞生存における役割

*Sox11* (Sry (Sex determining region Y)-box 11) は、膵  $\beta$  細胞では胎生期に発現し、 $\beta$  細胞への分化が進むとともに消滅することが知られている。MIN6 細胞におけるインスリン分泌を増強させる遺伝子の screening から、*Sox11* は glucose metabolism にも重要な役割を果たし、インスリン分泌を負に制御していることを明らかにした (Tanaka A et al. Sci Rep 2023)。一報で、*Sox11* は  $\beta$  細胞成熟化や他の複数の細胞の分化過程での Epithelial-mesenchymal transition に重要な役割を果たすことが示唆されている。2 型糖尿病における膵  $\beta$  細胞のグルコース応答性インスリン分泌の低下、 $\beta$  細胞の脱分化を含む細胞量の減少を *Sox11* がつなぐ可能性が想定され興味深く、shRNA で *Sox11* を減少させた際のインスリン分泌増強メカニズムをさらに解析している。

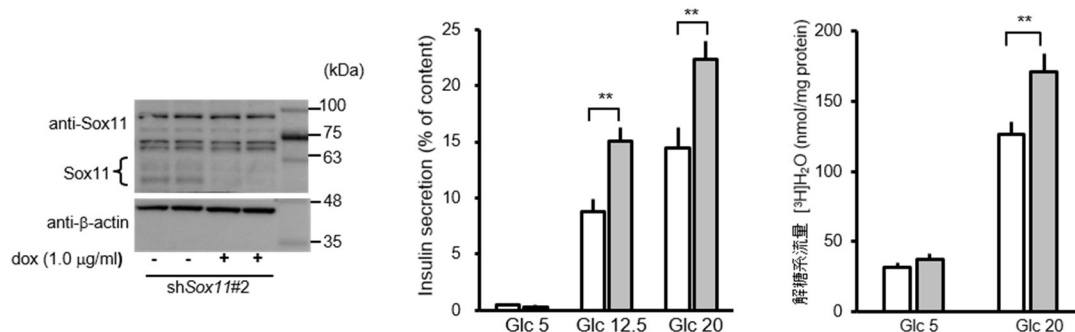
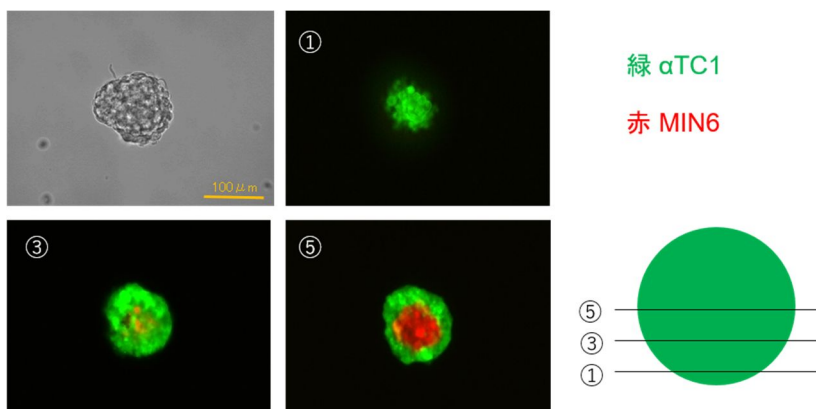


図 2

Sox11 の発現抑制によるインスリン分泌および解糖系流量の増加 (白: 対象細胞 灰色 Sox11 抑制)

### 偽膵島を用いた検討

$\alpha$ TC1 細胞と MIN6 細胞を 1 スフェロイドあたりの細胞数が 200 個になるように Sphericalplate 5D™ に混合して播種したところ、24 時間後には microwell に均一な大きさのスフェロイドが形成され、これを偽膵島とした。 $\alpha$ TC1 細胞と MIN6 細胞を同時に、混合比率を変えて播種すると、いずれの比率においても MIN6 細胞は球体の中心部に位置し、 $\alpha$ TC1 細胞が MIN6 細胞を囲むように辺縁部に位置していた。MIN6 細胞と  $\alpha$ TC1 細胞に繊維芽細胞株である NIH-3T3 細胞をそれぞれと混合して播種しても、特徴的な細胞分布を示さなかったことから、 $\alpha$ TC1 細胞と MIN6 細胞を合わせたときに生じる構造は両細胞の特異的な親和性によって形成される構造であると考えられた。



しかし、MIN6 細胞に  $\beta$  細胞の identity の確立に重要な役割を担う転写因子 Pdx-1 の dominant negative 体を発現させておくと、この局在は崩れる傾向を示した (投稿準備中)。

図 3 RFP を発現する MIN6 細胞と GFP を発現する  $\alpha$ TC1 細胞から作製した偽膵島

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tanaka A, Kosuda M, Yamana M, Furukawa A, Nagasawa A, Fujishiro M, Kohno G, Ishihara H.	4. 巻 13
2. 論文標題 A large-scale functional analysis of genes expressed differentially in insulin secreting MIN6 sublines with high versus mildly reduced glucose-responsiveness	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32589-2.	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 Ishihara H	4. 巻 13
2. 論文標題 Metabolism-secretion coupling in glucose-stimulated insulin secretion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 463-470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13340-022-00576-z	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 Kosuda M, Watanabe K, Koike M, Morikawa A, Saito H, Kohno G, Ishihara H.	4. 巻 89
2. 論文標題 Glucagon responses to glucose challenge in patients with idiopathic postprandial syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 102-107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1272/jnms.JNMS.2022_89-205.	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 Furukawa A, Tanaka A, Yamaguchi S, Kosuda M, Yamana M, Nagasawa A, Kohno G, Ishihara H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Using recombinase-mediated cassette exchange to engineer MIN6 insulin-secreting cells based on a newly identified safe harbor locus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 2129-2140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13646.	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 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石原寿光
2. 発表標題 グルカゴン・膵 細胞研究のoverview
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 盛川愛 齊藤一樹 河野玄太 田久保正洋 小須田南 石原寿光
2. 発表標題 膵a細胞株aTC1およびb細胞株MIN6からなる偽膵島の形態とインスリン分泌応答
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野玄太 山名碧 小須田南 石原寿光
2. 発表標題 グルコース応答性インスリン分泌におけるTCA回路酵素の役割の検討
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原寿光
2. 発表標題 グルカゴン分泌制御機構研究の新展開：膵島の統合的理解を目指して
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会関東甲信越地方会（WEB開催）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原寿光
2. 発表標題 効率的に遺伝子発現修飾が可能なMIN6細胞の作製と応用
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術総会（WEB開催）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小須田 南、渡邊 健太郎、小池 将夫、盛川 愛、斎藤 一樹、河野 玄太、石原 寿光
2. 発表標題 Postprandial syndrome におけるグルカゴン分泌の解析
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術総会（WEB開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田久保正洋，小須田南，長澤瑛子，山名碧，江頭富士子，渡邊健太郎，今津博雄，石原寿光
2. 発表標題 2型糖尿病の経過中に多脾症合併膵体尾部低形成症が判明した1例
3. 学会等名 第58回日本糖尿病学会関東甲信越地方会（WEB開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西岡秀典，山名碧，長澤瑛子，小須田南，渡邊健太郎，石原寿光
2. 発表標題 ミトコンドリアピルビン酸輸送担体欠損インスリン分泌細胞株の樹立と解析
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会（WEB開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishihara H, Nishioka H, Yamana M, Nagasawa A, Kosuda M, Koike M, Kohno G, Saito H
2. 発表標題 Roles of glycolysis distinct from mitochondrial metabolism for signal generation in Insulin secreting cells
3. 学会等名 American Diabetes Association 80th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 動物細胞の染色体上への外来遺伝子の挿入方法	発明者 石原 寿光	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、J36141A1	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	小須田 南  (KOSUDA Minami)  (40811609)	日本大学・医学部・助手   (32665)	

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