

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21249057

研究課題名（和文） 高次システムとしての膵島機能の発現機構とその破綻

研究課題名（英文） Mechanisms of functional expression of pancreatic islets as an integrated system and its failure

研究代表者

清野 進 (SEINO SUSUMU)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80236067

研究成果の概要（和文）：我々は新たな膵β細胞株 MIN6-K を樹立した。複数の細胞株を単層培養し、インスリン分泌を比較したところ、MIN6-K8 細胞はグルコースと cAMP 産生ホルモンであるインクレチンに応答するのにに対し、MIN6-K20 細胞はグルコースだけに応答した。しかし MIN6-K20 細胞を 3 次元構築（偽膵島）するとインクレチン応答性は正常膵島レベルまで誘導された。また 3 次元構築は膵腺房細胞からの膵β細胞への分化転換に必要であった。したがって膵β細胞の 3 次元構造は高次システムとしてのインスリン分泌能の発現に重要であることが示された。

研究成果の概要（英文）：We have newly established pancreatic β-cell lines (named MIN6-K). In monolayer culture, MIN6-K8 cells respond to both glucose stimulation and cAMP-increasing agents such as the incretin hormones, while MIN6-K20 cells respond to glucose stimulation, but not to incretins. We found that the formation of three-dimensional structure of MIN6-K20 cells (pseudoislets) drastically induces cAMP/incretin responsiveness to a level similar to that of normal pancreatic islets. We also found that formation of three-dimensional structure is required for transdifferentiation of pancreatic acinar cells to β-cells *in vitro*. These findings indicate that three-dimensional structure of pancreatic β-cells is critical in development of normal regulation of insulin secretion as an integrative system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	12,900,000	3,870,000	16,770,000
2010 年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2011 年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
総計	35,300,000	10,590,000	45,890,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

1. 研究開始当初の背景
膵島機能の根幹となるインスリン分泌は生

理的、薬理的な手法により研究されていたが、1980 年代後半まで、その分子機構は殆

ど不明であった。その後、インスリン分泌のシグナル伝達を担う個々の要素の分子的实际の解明が進み、さらに、シグナル間の相互作用が研究されることで、システムとしてのインスリン分泌機構の理解が深まった。しかし、生体内においては膵β細胞が単独で存在するのではなく、β細胞が異なる特性を有する種々の内分泌細胞と相互作用して立体構造が形成された膵島として存在する。しかも、個体レベルにおいて膵島は神経系や内分泌系などの膵島外からのシグナルを受けることにより、極めて厳密に制御されている。このような高次システムとしての膵島の理解がインスリン分泌機構の全貌やその破綻による病態の解明には必要であると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、2次元レベル、3次元レベル、4次元レベルでの解析結果を統合し、高次システムとしての膵島機能発現機構およびその破綻による病態の解明を行う。

3. 研究の方法

- ① 単層培養（2次元）系で解析するため、膵β細胞株をIT6マウスから樹立し、株間でインスリン分泌特性を比較した。
- ② 全反射型蛍光顕微鏡（TIRFM）を用いてインスリン顆粒動態を検討した。
- ③ 膵β細胞株を用いた3次元の膵島様細胞塊（偽膵島）を作製し、インスリン分泌特性を単層培養の膵β細胞株と比較検討した。
- ④ *In vitro* でマウス膵腺房細胞がインスリン分泌細胞に分化転換するメカニズムについて、3次元構造の構築に関与する細胞間接着分子およびその制御シグナルを中心に解析した。

- ⑤ 膵β細胞の特性を時間軸を加えて4次元で解析するために、Cre/loxPシステムを利用して任意のタイミングで膵β細胞を標識できるマウスを作製し、出生後1ヶ月間追跡した。

4. 研究成果

(1) 2, 3次元レベルでの膵島機能発現機構の解明

①膵β細胞株の樹立とインスリン分泌特性の解析：膵β細胞腫瘍を形成するIT6マウスから膵β細胞株を複数樹立し、2次元単層培養を行った。これらの細胞株のインスリン分泌特性を比較したところ、正常膵島と同様にグルコース、インクレチン（GLP-1）に応答してインスリン分泌反応を示すMIN6-K8細胞と、グルコースには応答性は示すがインクレチンに反応しないMIN6-K20細胞を見出した（図1A）。MIN6-K20細胞ではMIN6-K8細胞と同様にインクレチンによる細胞内cAMP産生の増加は認められたことから、cAMP産生以降のシグナルの障害が示唆された。

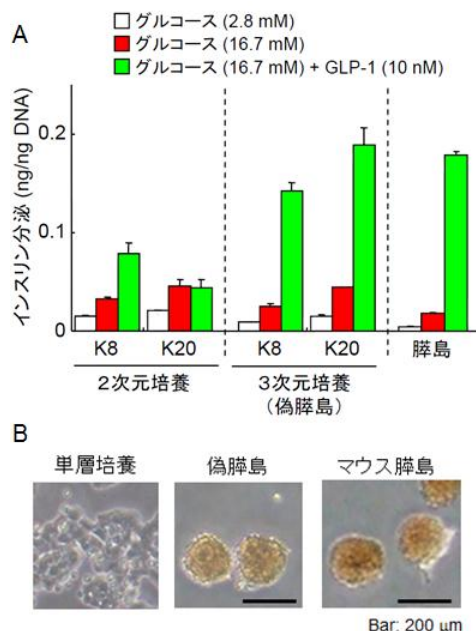


図1 MIN6-K細胞のインスリン分泌特性と偽膵島形成によるインスリン分泌能の向上

正常膵島のグルコース応答性インスリン分泌は、インクレチン刺激が加わると、グルコース単独刺激に比べ、4倍以上増加することが知られている。しかし、膵島をバラバラにして2次元単層培養するとインクレチン応答性は2倍程度の増加に留まってしまう。この低下の原因はほとんど明らかにされていない。そこで我々は3次元培養することで、膵β細胞のインスリン分泌能が回復するかを検討するために、MIN6-K8およびK20から偽膵島を作製した(図1B)。偽膵島のインスリン含量は両細胞株とも正常膵島と同等まで増加した。興味深いことに偽膵島形成によりMIN6-K8細胞のインクレチン応答性が正常膵島と同程度まで増強された。しかも単層培養ではインクレチンに反応しないMIN6-K20細胞でもインクレチン応答性が誘導された(図1A)。GLP-1によるcAMP産生量は偽膵島では2次元培養より著しく増加しており、偽膵島形成によってcAMP産生能が亢進したことが明らかとなった。またcAMPアナログ8-Br-cAMPによるインスリン分泌増強が単層培養に比べ、偽膵島では増加していたことから、偽膵島ではcAMP産生以降のシグナルも亢進していることが示された。さらに偽膵島ではATPの産生量が増加していることから、細胞内代謝も亢進している可能性も考えられた。以上の結果から2次元培養した膵β細胞株から偽膵島を形成させると、グルコース代謝は亢進しインクレチン/cAMPシグナル応答性が誘導されることから、膵β細胞の3次元構造の構築は正常なインスリン分泌能の獲得に重要であることが明らかになった。

②インスリン分泌におけるインクレチン/cAMPシグナルの重要性和その作用機構:インクレチンによるインスリン分泌増強は、ある一定濃度以上のグルコース存在下でのみ

発揮される。興味深いことに、マウスの膵灌流実験において、グルコース濃度を少しずつ段階的に上昇させると、インスリン分泌はほとんど惹起されない(図2A)が、GLP-1存在下ではグルコース濃度の段階的な上昇に伴いインスリン分泌が惹起されることが明らかになった(図2B)。食事の摂取によって、

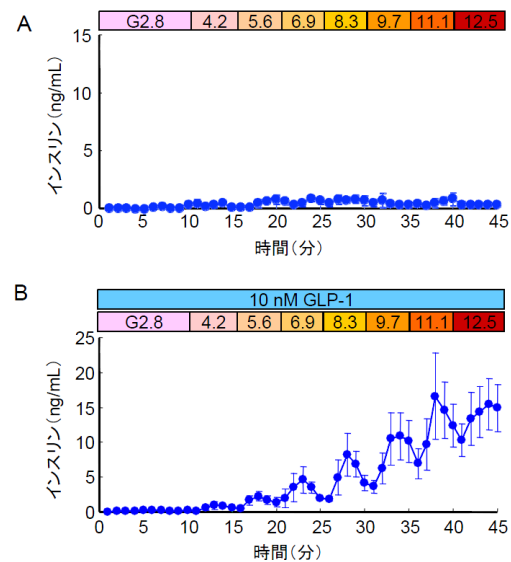


図2 段階的なグルコース濃度上昇に対するインスリン分泌反応(マウス膵灌流実験)

血糖値が5 mM前後から8 mM程度まで徐々に上昇することやインクレチン濃度が上昇することを考慮すると、GLP-1によるグルコース応答性インスリン分泌の誘導は血糖値の維持において重要な役割を担っていると考えられる。

我々は以前、インクレチン/cAMPによるインスリン分泌の増強には、PKA依存性経路とPKA非依存性経路が存在し、後者はEpac2によって担われていることを明らかにした。さらにEpac2と相互作用する分子として、開口分泌関連分子Rim2αを同定した。本研究ではインスリン開口分泌過程でのRim2αの役割を2次元レベルで解析できる全反射型蛍光顕微鏡TIRFMを用いて検討した。その結果、Rim2α欠損マウスから樹立した膵β細胞株に

において、細胞膜にドッキングしたインスリン顆粒数は減少し、さらにグルコース応答性インスリン分泌が障害されていた。この細胞株に Rab3 と結合できない Rim2 α 変異体を導入したところ、ドッキングしたインスリン顆粒数は増加したが、インスリン分泌は回復しなかった。一方、Munc13-1 と結合できない Rim2 α 変異体を導入した細胞株では、ドッキングしたインスリン顆粒数は増加しなかったが、インスリン分泌は回復した。したがって Rim2 α は Rab3 および Munc13-1 と相互作用することでインスリン顆粒のドッキングおよびプライミングステップを決める重要な役割を果たすことが明らかになった。

さらに、Epac2 と結合できない Rim2 α 変異体を Rim2 α 欠損 β 細胞株に発現させたところ、グルコース刺激によるインスリン分泌は回復したにも関わらず、Epac 特異的 cAMP アナログ 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM 刺激によるインスリン分泌増強の回復は認められなかった (図 3)。したがって、Rim2 α は cAMP 依存性、Epac2 依存性のインスリン分泌増強に必須の分子であることが明らかとなった。

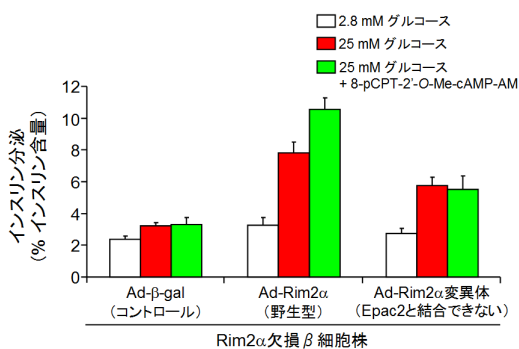


図 3 Epac2 と結合できない Rim2 α 変異体のインスリン分泌増強に対する効果

また、我々は Epac2 の活性化を Living cell でモニターできる Epac2 の FRET (fluorescence resonance energy transfer) プローブを作製した。このプローブを β 細胞に発現することで、

インスリン開口分泌における cAMP/Epac2 シグナルの役割の解明や Epac2 を活性化する新たな化合物の探索が可能になった。

③膵腺房細胞の分化転換：マウス膵腺房細胞が *in vitro* でインスリン分泌細胞に分化転換するメカニズムについて、3次元構造を構築する細胞間接着の役割を中心に解析した。単離した膵腺房細胞を EGF 存在下で培養するとカドヘリン依存性細胞接着が形成されるが、E-カドヘリンの中和抗体を利用して spheroid の形成を抑制すると、分化転換が強く抑制される一方、未分化な膵細胞への脱分化が生じた。すなわち、細胞間接着による 3次元構造の構築は、細胞分化にきわめて重要な影響を及ぼす。特に、生理的に機能するインスリン分泌細胞を誘導するためには 3次元構造の構築が重要である。

(2) 4次元レベルでの膵島機能発現機構の解明とその破綻による病態の解明

出生後の β 細胞量の維持のメカニズムとして非 β 細胞からの新生はほとんどないと言われているが、確定的な見解は存在しない。そこで、Insulin 2 遺伝子座に Cre-recombinase と改変型エストロゲン受容体の融合タンパク質を導入したノックインマウス (Ins2-CreER マウス) と、誘導性 (loxP 配列組換え後) に蛍光タンパク質 (YFP) を発現する R26R-YFP ノックインマウスを交配した Ins2-CreER/R26R-YFP ダブルノックインマウスを独自に開発した。このマウスでは、理論的にはタモキシフェンを投与することで任意の時期に β 細胞を選択的に標識することができると考えられるが、実際に、約 30% の β 細胞が標識された。このマウスを用いることによって、実際の β 細胞の分化、新生のメカニズムが明らかとなれば、将来的な

再生医療の実現に有用な情報となると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Seino S, Takahashi H, Takahashi T, Shibasaki T. Treating diabetes today: a matter of selectivity of sulphonylureas. *Diabetes Obes Metab* 14:9-13, 2012
2. Seino S, Shibasaki T, Minami K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest* 121:2118-2125, 2011
3. Koyanagi M, Asahara S, Matsuda T, Hashimoto N, Shigeyama Y, Shibutani Y, Kanno A, Fuchita M, Mikami T, Hosooka T, Inoue H, Matsumoto M, Koike M, Uchiyama Y, Noda T, Seino S, Kasuga M, Kido Y. Ablation of TSC2 enhances insulin secretion by increasing the number of mitochondria through activation of mTORC1. *PLoS One* 6:e23238, 2011
4. Seino S, Shibasaki T, Minami K. Pancreatic beta-cell signaling: toward better understanding of diabetes and its treatment. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86:563-577, 2010
5. Minami K, Miyawaki K, Hara M, Yamada S, Seino S. Tracing phenotypic reversibility of pancreatic β -cells *in vitro*. *J Diabetes Invest* 1:242-251, 2010
6. Minami K, Doi R, Kawaguchi Y, Nukaya D, Hagiwara Y, Noguchi H, Matsumoto S, Seino S. In vitro generation of insulin-secreting cells from human pancreatic exocrine cells. *J Diabetes Invest* 2:271-275, 2011
7. Nakamura K, Minami K, Tamura K, Iemoto K, Miki T, Seino S. Pancreatic β -cells are generated by neogenesis from non- β -cells after birth. *Biomed Res* 32:167-174, 2011
8. Minami K, Miyawaki K, Hara M, Yamada S, Seino S. Tracing phenotypic reversibility of pancreatic β -cells *in vitro*. *J Diabetes Invest* 1:242-251, 2010
9. Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, Takahashi H, Mizoguchi A, Uriu Y, Mori Y, Miyazaki J-i, Miki T, Seino S. Rim2 α determines docking and priming states in insulin granule exocytosis. *Cell Metab* 12:117-129, 2011
10. Iwasaki M, Minami K, Shibasaki T, Miki T, Miyazaki J-I, Seino S. Establishment of new clonal pancreatic β -cell lines (MIN6-K) useful for study of incretin/cAMP signaling. *J Diabetes Invest* 1:137-142, 2010
11. Granot Z, Swisa A, Magenheimer J, Stolovich-Rain M, Fujimoto W, Manduchi E, Miki T, Lennerz JK, Stoeckert CJ, Jr., Meyuhas O, Seino S, Permutt MA, Piwnicka-Worms H, Bardeesy N, and Dor Y. LKB1 regulates pancreatic beta cell size, polarity, and function. *Cell Metab* 10: 296-308, 2009
12. Fujimoto W, Miki T, Ogura T, Zhang M, Seino Y, Satin LS, Nakaya H, Seino S. Niflumic acid-sensitive ion channels play an important role in the induction of glucose-stimulated insulin secretion by cyclic AMP in mice. *Diabetologia* 52:863-872, 2009
13. Seino S, Takahashi H, Fujimoto W, Shibasaki T. Roles of cAMP signalling in insulin granule exocytosis. *Diabetes Obes Metab*, 11:180-188, 2009
14. Sugawara K, Shibasaki T, Mizoguchi A, Saito T, Seino S. Rab11 and its effector Rip11 participate in regulation of insulin granule exocytosis. *Genes Cells* 14: 445-456, 2009

[学会発表] (計 14 件)

1. Seino S: Control of insulin granule exocytosis, FASEB Summer Research Conferences (Colorado, USA), 2011.8.14
2. Seino S: Control of insulin granule exocytosis, Danish-Japanese Workshop on Molecular Diabetology (Copenhagen, Denmark), 2011.10.21
3. Seino S: Mechanisms of insulin secretion and type 2 diabetes, Beta Cell Workshop 2011: Programming Beta Cell Development, Impairment and Regeneration (Helsingør, Denmark), 2011.10.25
4. Seino S: Treating diabetes today: a matter of selectivity, Satellite Symposium of IDF World Diabetes Congress -Treatment of type 2 diabetes: a matter of proof (Dubai, United Arab Emirates), 2011.11.4
5. Seino S: Cell signaling in insulin secretion. The 5th Annual Chicago Diabetes Day, The University of Chicago Diabetes Research and Training Center (Chicago, USA), 2010.5.15
6. Seino S: Symposium on "Insulin Secretion": SUR1 to Epac2. 70th Scientific Sessions, American Diabetes Association (Orlando, USA), 2010.6.29
7. Seino S: The cell signaling in insulin secretion: a story of molecular targets of ATP, cAMP, and sulfonylurea. The 46th Annual Meeting of EASD, The 4th Albert Renold Lecture (Stockholm, Sweden), 2010.9.21
8. Seino S: Novel aspects on the molecular regulation of insulin secretion. EASD islet study meeting 2010 (ISG2010) (Tällberg, Sweden) 2010.9.24
9. Seino S: Mechanisms of insulin secretion: interplay of glucose metabolism, cAMP signaling, and sulfonylurea. Kick-off Workshop,

Strategic Japanese-Danish Cooperative Program on Molecular Diabetology (Kobe, Japan) 2011.3.8

10. Seino S: Pancreatic beta cell signaling: for better understanding and treatment of diabetes, Plenary Lecture, 15th Korea-Japan Symposium on Diabetes Mellitus (Jeju, Korea) 2009.11.21
11. Seino S: Role of Epac2 in insulin secretion, Danish-Japanese Workshop on Molecular Diabetology (Copenhagen, Denmark) 2010.3.23
12. Seino S: New approaches toward understanding mechanisms of insulin secretion, The 36th International Congress of Physiological Sciences, (Kyoto, Japan) 2009.7.28
13. Seino S: Diabetes, Research and Training Center (DRTC) Seminar: Pancreatic β -cell signaling: for better understanding and treatment of diabetes, Washington University School of Medicine (St Louis, USA) 2009.10.13
14. Seino S: Recent Advances in Beta Cell Biology: Scientific and Clinical Implications (hosted by the Banting and Best Diabetes Center, University of Toronto) Signal transduction in the islet beta cell (Toronto, Canada) 2009.10.16

[その他]

ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清野 進 (SEINO SUSUMU)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80236067

(2) 研究分担者

柴崎忠雄 (SHIBASAKI TADAO)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00323436