

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19504

研究課題名（和文）試験管内膵 細胞増殖評価系の確立と膵 細胞量を標的とした治療標的の探索

研究課題名（英文）Establishment of an experimental system to evaluate pancreatic beta-cell proliferation in vitro that can be utilized to identify anti-diabetes therapeutics targeting pancreatic beta-cell mass

研究代表者

矢部 大介（Yabe, Daisuke）

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60378643

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膵 増殖をリアルタイムに観察可能な Fucciマウスを樹立し、その単離膵島細胞を3次元培養もしくは2次元で最長1週間の間、ex vivoで培養することに成功した。特に2次元培養においては、種々のプレートを検討するなかで、日本ジェネティクス社製マイクロSlide 1 Luerを用いることで安定して培養が可能かつ、11.1 mM グルコースを含むRPMIに膵ベータ細胞増殖作用が知られるDYRK阻害薬のひとつHarminを添加することで、ex vivoにおいても Fucciマウス由来膵ベータ細胞が増殖することを確認し、樹立したアッセイ系を用いて低分子化合物をスクリーニングしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵 細胞からのインスリン分泌の障害は糖尿病の発症や重症化を阻止するうえで克服すべき重要な課題である。インスリン分泌量は、個々の膵 細胞がインスリンを分泌する能力（膵 細胞機能）と膵 細胞の絶対量（膵 細胞量）の2つの因子により規定され前者に対しては、インクレチン薬やSU薬、グリニド薬が臨床の場で幅広く使用される。一方、後者に対しては、膵 細胞量調節の分子基盤の全容は依然不明であり、膵 細胞量を標的にした糖尿病の予防や治療の方法も一切存在しない。本研究で確立したスクリーニング系は、今後、膵 細胞量を標的とした予防や治療に資するシーズ探索に極めて有用なツールといえる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established Fucci mice in which pancreatic -proliferation can be observed in real time, and successfully cultured the isolated islet cells ex vivo for up to 1 week in 3D or 2D culture. In 2D culture, we examined various types of plates, and found that the Micro Slide 1 Luer plate manufactured by Nippon Genetics was the most suitable for stable culture, and the plate was able to contain 11.1 mM glucose in RPMI. We have confirmed that the addition of Harmin, a DYRK inhibitor known to proliferate pancreatic beta cells, to RPMI containing 11.1 mM glucose allows stable culture of pancreatic beta cells ex vivo, and have screened low molecular weight compounds using the assay system we established.

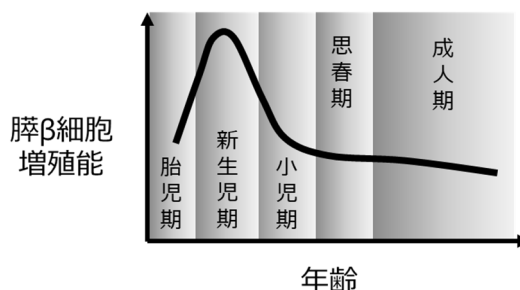
研究分野：糖尿病学

キーワード：膵 細胞量 糖尿病 低分子化合物 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

膵細胞からのインスリン分泌の障害は糖尿病の発症や重症化を阻止するうえで克服すべき重要な課題である。特に日本人を含む東アジア人は、他民族と比してインスリン分泌量が低いためインスリン分泌障害の問題はなお深刻である (*Lancet Diabetes Endocrinol* 2016;4(1):2-3)。インスリン分泌量を規定因子である膵細胞量は、糖尿病患者で膵細胞量が減少することが示されており、その重要性は明確である。さらに膵細胞量は、加齢と共に減少することが報告され、近年、わが国で激増する高齢者糖尿病の発症、重症化の原因の一翼を担うことが指摘されている。しかるに、膵細胞量調節の分子基盤の全容は依然不明であり、膵細胞量を標的にした糖尿病の予防や治療の方法も一切存在しない。

膵β細胞の自己増殖能の経年変化



研究代表者らは、日本人2型糖尿病の病態がインスリン分泌障害を主な特徴とすることに興味をもち、臨床研究を通して、インスリン分泌を増強するインクレチンの分泌や作用を高める食事のとり方やインクレチンにもとづく治療薬に関する成績を発信してきた (*Curr Diab Rep* 15(6): 602, 2015; *J Diabetes Investig*, 7(S1): 102-110, 2016)。特に、インクレチンにもとづく糖尿病薬の治療効果が残存する膵細胞量により規定される可能性を明らかにした (*J Diabetes Complications*. 29(8):1304-9, 2015; *J Diabetes Complications*. 30(7):1385-92, 2016; *J Diabet Investig* 9(4):822-830, 2018)、稲垣暢也教授 (京都大学) との共同研究で、非侵襲的膵細胞イメージング技術で評価した残存膵細胞量とインクレチン薬の血糖改善効果が正の相関を示すことを報告した (*J Diabetes Investig*., 11(6):1448-1456)。このような背景から糖尿病発症前後で膵細胞量を増加させることができれば、糖尿病の発症・重症化の予防に資することが予測される。応募者は、最近、成体マウスにおける膵細胞増殖能を簡便かつ定量的に評価できる実験系として膵細胞特異的に細胞周期プローブ **Fucci2aR** を発現する遺伝子改変マウス (**MIP-Cre; Fucci2aR** マウス) の樹立に成功 (*Diabetes*, 69(11):2340-2351, 2020) これを用いて膵細胞増殖を促進する創薬標的を同定するための実験系を確立しようとする本研究構想にいたった。

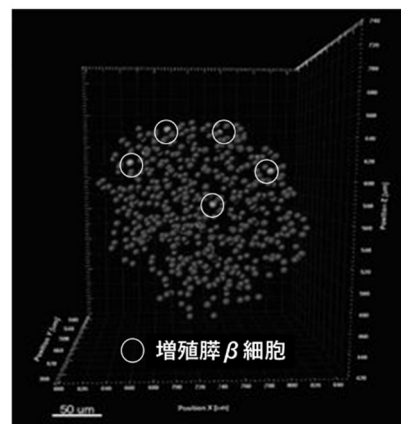
2. 研究の目的

膵細胞増殖をリアルタイムに観察可能なマウスから膵島細胞を単離し、低分子化合物スクリーニング系を樹立し、膵細胞増殖薬の創薬標的を同定するための実験系を確立することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

研究代表者らは成体における膵細胞増殖能を簡便かつ定量的に評価できる実験系として膵細胞特異的に細胞周期プローブ **Fucci2aR** を発現する遺伝子改変マウス (**MIP-Cre; Fucci2aR** マウス) を作成し、高脂肪食負荷や妊娠などの膵細胞刺激に反応して膵細胞が増殖することを明らかにしている (左図、 *Diabetes* 69(11):2340-2351, 2020)。本研究では本ツールを活用し、低分子化合物スクリーニング系を樹立、膵細胞増殖薬の創薬標的を同定すべく以下の研究を実施する。

膵β細胞増殖の新規定量法の樹立



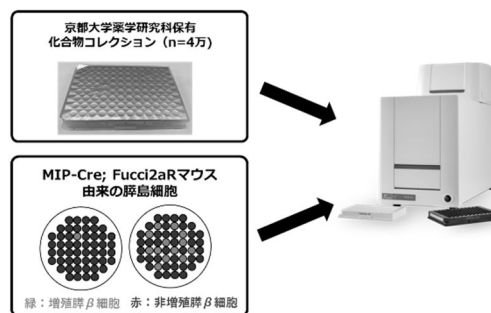
1) 膵細胞増殖に関するハイスループットスクリーニング系の確立

RIP-Cre; Fucci2aR マウス由来の膵島細胞を 96 穴プレートで単層培養し、膵細胞増殖因子のひとつグルコキナーゼ活性薬 (GKA) などを用いて膵細胞増殖をモニターできる系を確立する。

2) 膵細胞増殖を促進する低分子化合物のスクリーニング

1) で樹立した膵 細胞増殖に関するハイスループットスクリーニング系を用いて、京都大学薬学研究科ファーマコゲノミクス・ケモゲノミクス創薬コアラボの保有する低分子化合物ライブラリー (Sigma-aldrich 社既知の阻害剤 1,200 化合物、GPCR をターゲットにした指向性ライブラリー 2,000 化合物、ChemDiv 社 drug-like 構造多様性ライブラリー約 10,000 化合物を含む) をスクリーニングする。

膵β細胞増殖薬のハイスループット・スクリーニング



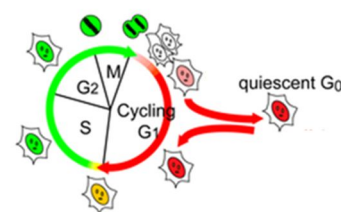
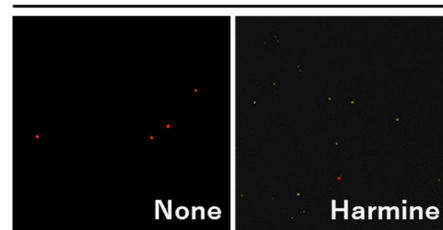
3) 候補化合物の膵 細胞増殖に対する効果の検証と分子機構の解明

2) にて同定した候補化合物を RIP-Cre; Fucci2aR マウスに投与し、膵 細胞増殖に対する効果を生体内で評価すると共に、経口ブドウ糖負荷試験を行い耐糖能やインスリン分泌能を評価する。さらに剖検症例から得られたヒト膵島やヒト iPS 細胞から分化誘導した膵 細胞に候補化合物を添加し、膵 細胞増殖に対する効果を確認する。さらに候補化合物の標的分子を NanoBRET™ Target Engagement Assay などを用いて同定する。

4. 研究成果

膵 増殖をリアルタイムに観察可能な Fucci マウスを岐阜大学において新たに樹立し、その単離膵島細胞を、マトリゲルを用いた3次元培養もしくは後述する2次元で最長1週間の間、*ex vivo* で培養することに成功した。安定した培養系構築にあたり各種条件検討に多くの時間を要したが、2次元培養においては、種々のプレートを検討するなかで、日本ジェネティクス社製マイクロ Slide 1 Luer を用いることで安定して培養が可能することに成功した。確立した培養条件において、11.1 mM グルコースを含む培地 (RPMI) に膵 細胞増殖作用が知られる DYRK (dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A) 阻害薬のひとつ Harmine が *ex vivo* においても Fucci マウス由来膵 細胞が増殖することを確認しえた (図

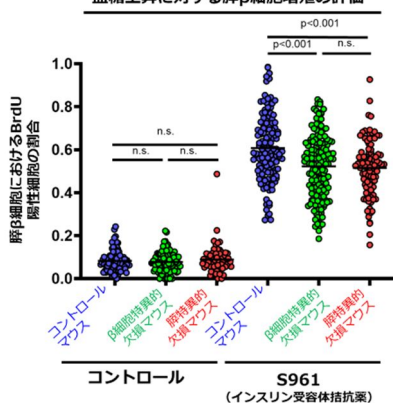
βFucciマウス由来膵島細胞の2D培養下におけるHarmineへの応答



Fucci マウス由来膵島細胞の 2D 培養下における Harmine への応答)。膵β細胞増殖を誘導する目的でグルコース濃度を 20.0 mM まで上昇させるもしくは、GKA (glucose kinase activate) 活性薬を添加した場合には Fucci マウス由来膵β細胞の増殖は認めなかった。現在、樹立したアッセイ系を用いて低分子化合物のスクリーニングを実施している。

さらに、上述のアッセイ系の樹立と並行して、生体内においてグルコースが膵 細胞増殖を促進することに着目し、膵 細胞に発現され、グルコースにより活性化される転写因子 ChREBP (Carbohydrate response element binding protein) が、膵 細胞増殖を制御する可能性を検討した。ChREBP floxed マウスおよび膵 細胞特異的もしくは膵・十二指腸特異的に Cre recombinase を発現する RIP-Cre マウス及び Pdx1-Cre マウスを交配し、作出した膵 細胞特異的 ChREBP 欠損マウス、膵・十二指腸特定 ChREBP 欠損マウスにおいて ChREBP 欠損マウスにおいて 細胞増殖を評価した。インスリン受容体拮抗薬 S961 投与により血中グルコースを上昇させた際に生じる膵 細胞増殖が膵 細胞特異的 ChREBP 欠損マウス、膵・十二指腸特定 ChREBP 欠損マウスにおいて有意に抑制されることを観察している (図 ChREBP 欠損マウスにおける血糖上昇に対する膵 細胞増殖の評価)。

ChREBP欠損マウスにおける血糖上昇に対する膵β細胞増殖の評価



現在、膵 細胞増殖刺激を加えた同マウスおよびコントロールマウスから膵島を単離し、シングルセルレベルでのトランスクリプトーム解析 (scRNA-seq) を実施することで、ChREBP の下流で活性化される遺伝子プログラムの全容を明らかにしつつある (投稿準備中)。今後、ChREBP や下流遺伝子プログラムを標的とした低分子化合物のスクリーニングを行い、同定したシーズをもとに膵 細胞量を標的とした創薬研究を実施する。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yermek R, Wang L, Kaneko K, Han W, Seino Y, Yabe D, Yada T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 D-Allulose cooperates with glucagon-like peptide-1 and activates proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus and central injection inhibits feeding in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications.	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） 10.3390/nu14153117	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 Ueno S, Seino Y, Shihomi H, Maekawa R, Tanaka Y, Yamamoto M, Hori M, Yokota K, Masuda A, Himeno T, Tsunekawa S, Kamiya H, Nakamura J, Kuwata H, Fujisawa H, Shibata M, Takayanagi T, Sugimura Y, Yabe D, Hayashi Y, Suzuki A	4. 巻 14
2. 論文標題 High Protein Diet Feeding Aggravates Hyperaminoacidemia in Mice Deficient in Proglucagon-Derived Peptides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 975 ~ 975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu14050975	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 Fujiwara Yuta, Yamane Shunsuke, Harada Norio, Ikeguchi-Ogura Eri, Usui Ryota, Nakamura Toshihiro, Iwasaki Kanako, Suzuki Kazuyo, Yabe Daisuke, Hayashi Yoshitaka, Inagaki Nobuya	4. 巻 320
2. 論文標題 Carbonic anhydrase 8 (CAR8) negatively regulates GLP-1 secretion from enteroendocrine cells in response to long-chain fatty acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G617 ~ G626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00312.2020	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0件

〔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
研究分担者	劉 彦言 (Liu Yanyan) (10845796)	岐阜大学・大学院医学系研究科・研究員 (13701)	
研究分担者	飯塚 勝美 (Iizuka Katsumi) (40431712)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

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