

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670116

研究課題名(和文) 膵島再生を規定する局所ニッチ環境の解明

研究課題名(英文) Elucidation of local, niche environment that determines pancreatic islet regeneration.

研究代表者

三木 隆司 (MIKI, Takashi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50302568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵島再生の促進は糖尿病の根治治療となり得る。しかしながら、再生を担う細胞の特性や再生の制御機構などは多くが不明である。我々は新たな膵島再生マウスを用いて再生現象を詳細に解析したところ、膵細胞の分裂が膵島量の増減を感知して制御されていること、再生が高い増殖性を有する細胞の活発な分裂により維持されること、膵島再生時には幹/前駆細胞ニッチの維持あるいは膵細胞の発生分化に関わる遺伝子群やの発現が増加することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Acceleration of islet regeneration can be a radical therapy for diabetes mellitus. However, the cells involved in the regeneration have not been characterized and its regulatory mechanism remains unclarified. By analyzing the precise regeneration processes in our mouse model, we found that  $\beta$ -cell proliferation is regulated by the changes in  $\beta$ -cell mass, that the mass is maintained by the frequent cell division of the highly proliferative cells, and that several genes involved in the maintenance of stem/progenitor niche environment or in  $\beta$ -cell development are highly expressed during regeneration.

研究分野：栄養生理学

キーワード：膵島 再生 前駆細胞 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 研究開始当初の学術的背景

糖尿病は慢性の高血糖状態を本態とする代謝疾患であり、膵細胞からのインスリン分泌障害および骨格筋や脂肪組織などのインスリン標的臓器でのインスリン作用不全(インスリン抵抗性)により発症する。以前は、インスリン抵抗性が先行して生じ、代償性の過剰インスリン分泌に伴う膵細胞の疲弊・細胞死により膵細胞量(膵島量)が減少し、糖尿病が発症・進展すると考えられてきた。ところが2003年に「糖尿病患者では発症前から進行性に膵島量が減少する」ことが発見され(Butlerら Diabetes, 2003)、膵島再生は糖尿病の根治治療として注目を浴びるようになった。

一方同時に、膵島量は成熟膵細胞のランダムな増殖により維持されるが、膵細胞の増殖能は乏しいこと(Dorら Nature 2005)も報告され、**現在は in vivo 膵島再生の可能性には否定的な意見が主流**である。

### (2) 研究開始当初の我々のデータ

しかしながら、我々が作製した膵細胞特異的変異  $K_{ATP}$  チャンネル過剰発現マウスは、膵細胞のアポトーシスによる著明な膵細胞量の減少と糖尿病を示す(Miki et al. PNAS, 1997)ものの、その後膵細胞が再生し、糖尿病が自然治癒することを見出した(Oyama et al. Diabetes, 2006)。この結果は、実質的な in vivo 膵島再生が成体マウスでも誘導可能であることを示すものであった。

## 2. 研究の目的

我々は、本研究で膵細胞特異的に細胞死を誘導できる新規のマウスモデルを作製・解析した。本マウスに細胞死を誘導すると膵島量は速やかに減少し、極めて短期間に約50%まで回復するものの、その後の増加は極めて緩徐であった。このことは、膵島量が迅速な膵島増殖により厳密に維持されていること

が示唆された。

本研究では、膵島再生現象を経時的・量的変化を詳細に解明し、膵島再生が生じている膵島局所での再生のニッチ環境を解析し、膵島量の維持機構を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 膵島再生マウスの作製

我々は膵細胞特異的に細胞死を誘導する目的で、膵細胞特異的にジフテリア毒素受容体と赤色蛍光蛋白(Tomato)を発現するマウス(RipCre; Rosa26<sup>DR/Tomato</sup> マウス)(以下、膵島再生マウス)を作製し、8週齢時にジフテリア毒素(DT)を投与し、血糖値、膵島量、細胞分裂を定量的・経時的に解析した。膵島量は、全膵臓から一定(150  $\mu$ m)間隔で組織切片を作成し、全切片の膵島面積を積分することで求めた。

### (2) 異所性膵島移植の膵島再生への影響

膵島量の制御機構を明らかにするために、膵島再生マウスの腎皮膜下に野生型マウスより単離した膵島を移植し、膵島再生を解析した。

### (3) 膵島再生を担う細胞の解析

膵島再生を担う細胞が、残存膵細胞の増殖によるのか、あるいは他の細胞からの新生によるのかを検証する目的で、再生マウスには Tomato をジフテリア毒素受容体と共発現させている。DT投与により Tomato 陽性細胞を死滅させた後、Tomato 陰性細胞が増加するのであれば残存する膵細胞が増殖したことを意味し、Tomato 陽性細胞が増加するのであれば非膵細胞から膵細胞が新生したことを意味する。そして再生後の膵島でインスリンおよび Tomato を免疫染色し、膵島再生を担う細胞の系譜を解析した。さらに、細胞分裂した細胞を核酸誘導體である BrdU の連続投与により標識・定量した。

#### (4)再生時の膵島内ニッチ環境の解析

膵島再生が誘導される際の分子制御機構を解明する目的で、DT 投与後の膵島再生マウスの膵島を単離し、造血幹細胞などで解明された幹/前駆細胞のニッチ環境の形成・維持に関わる分子群の発現を qPCR により定量解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1)膵島再生マウスでの膵島再生の解析

まず膵島再生マウスでの膵島再生を解析した。本マウスに DT を投与したところ、投与 6 日後に膵島量は DT 非投与時の 34% に減少したが、投与 14 日後には 55% まで回復した (図 1)。

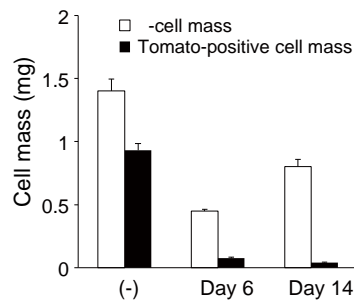


図1 膵島再生マウスの再生時の膵島量

である Kir67 陽性の膵細胞は投与 6 日後に著明に増加したものの、14 日後以降、Kir67 陽性率は急激に低下し、膵島量の増加もほとんど見られな

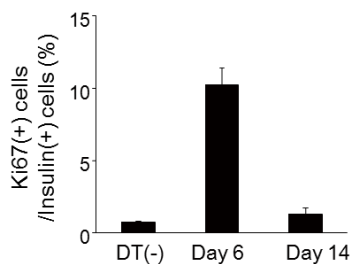


図2 再生時の分裂細胞数の変化

った (図 2)。この結果から、**膵細胞が活発な細胞分裂により再生する能力を有していることが直接的に証明**された。本マウスでは DT 投与後でも随時血糖は正常であり、高血糖による再生促進の影響は除外され、膵島量減少が感知され、膵島再生を惹起した可能性が示唆された (Morita et al. 論文投稿中)。

##### (2)膵島量感知機構の解析

次に **膵島再生マウスの腎皮膜下に膵細胞を移植し、後に DT により本来の膵細胞に細胞死を誘導し、膵島再生を解析**した。興味深いことに、膵島再生は比較的少数 (300-500 個) の膵島移植により有意に抑制され、過剰量の移植によりほぼ停止した (Mukai et al. 論文投稿準備中)。膵島を移植した腎臓と膵臓は解剖学的に隔離されていること、移植膵島の神経性制御は否定的であることから、移植膵島由来の液性因子が膵臓での膵島再生を抑制的に制御していることが明らかになった。

膵細胞由来の膵島再生抑制因子を同定する目的で、まずインスリンの関与を検討した。この目的で持効型インスリンを連日投与したところ、膵島再生は有意に抑制され、**インスリンが重要な再生抑制因子として機能**

することが示された。その作用機序として、インスリンが直接膵細胞の増殖を抑制する可能性と、インスリンにより血糖値が低下し、膵細胞からのインスリン分泌の仕事量が軽減し増殖が抑制されている可能性の 2 つが考えられた。Kahn らによる膵細胞特異的なインスリン受容体ノックアウトマウスの解析から膵細胞のインスリンシグナルはむしろ増殖や維持に必要であると報告されていることから、後者 ( ) の可能性が考えられ、現在解析を進めている。

##### (3)膵島再生を担う細胞の解析

本マウスでは膵細胞の約 80% に Tomato が発現し、DT 投与により Tomato 陽性細胞の大部分が死滅したことから、Tomato 陽性の膵細胞には理論通りジフテリア毒素受容体が共発現していることが明らかになった。膵島再生後の膵島を Tomato とインスリンで免疫二重染色したところ再生後に増殖する膵細胞はほとんどが Tomato 陰性であり、**細胞死誘導後に残存する膵細胞の増殖が誘導**されることが示された (図 1、3)。同様の

結果は、既に他の研究者によっても報告されている (Teta Dev Cell 2007, Xia JCI 2013)

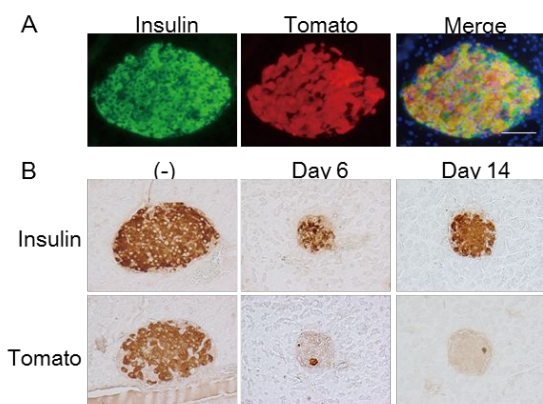


図3 残存膵β細胞からした再生膵島の組織像  
A. 細胞誘導前の膵島の蛍光免疫染色像  
B. 細胞死誘導なし(-)、6日、14日後の膵島像

が、これらは全て成熟膵細胞の散発的 (sporadic) な細胞分裂によることが示されている。しかしながら、本マウスで個々の膵細胞の細胞分裂の有無を標識・定量したところ、**膵島が再生しても「分裂しない膵細胞数」は全く減少しなかった。**このことは**現在、世界で広く認識されている「膵細胞の分裂を担う幹/前駆細胞は存在しない」という定説を覆す極めて重要な発見**である (Mukai et al. 論文投稿準備中)。

#### (4)再生時の膵島内ニッチ環境の解析

そこで我々は、本マウスで膵島再生時にどのような細胞が活性化され、細胞増殖が誘導されるかを解析する目的で、再生中の膵島を単離し、種々の遺伝子発現を定量解析した。その結果、**細胞分裂を表す Ki67 と、既知の再生遺伝子 Reg の発現が増加した。**興味深いことに、**Ki67 と Reg の発現誘導は腎皮膜下への膵島移植により消失した**(図4)。さらに

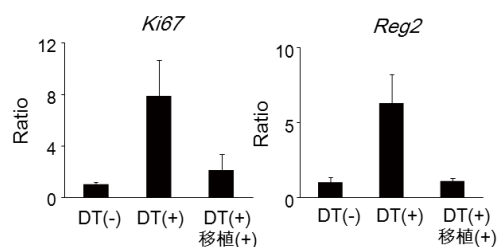


図4 再生時の再生関連遺伝子の発現変化

骨髄幹/前駆細胞や癌幹細胞の維持に重要な

遺伝子群が再生膵島で発現していることが明らかになり、膵島内で膵細胞の幹/前駆細胞のニッチ環境が活性化されていることが示された。さらに、**通常は胎仔期の未熟な膵細胞のみに発現する転写因子の発現が認められた。**これらの結果から、本マウスでは、**残存膵細胞のなかに含まれている少数の幹/前駆細胞がニッチ環境の活性化を介して脱分化、増殖、再分化し、膵島が再生することが明らかになった。**

今後これらの幹/前駆細胞を今後同定し、脱分化、増殖、再分化の制御機構を解明することにより、膵島再生を促進する糖尿病の再生治療を確立するための学術的な基盤が構築できるものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Seino Y, Ogata H, Maekawa R, Iida A, Harada N, Miki T, Inagaki N, Tsunekawa S, Seino S, Oiso Y, Hamada Y. Fructose induces  $K_{ATP}$  channel-independent GIP and GLP-1 secretion and  $K_{ATP}$  channel-dependent insulin secretion. *J Diabetes Investig.* 査読有、in press

DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.10.006.

Oarada M, Takahashi-Nakaguchi A, Abe T, Nikawa T, Miki T, Gono T. Refeeding with glucose rather than fructose elicits greater hepatic inflammatory gene expression in mice. *Nutrition.* 31, 757-765. 査読有、31 巻、2015、757-765 DOI: 10.1016/j.nut.2014.11.014.

Matsushita K, Kitamura K, Rahmutulla B, Tanaka N, Ishige T, Satoh M, Hoshino T, Miyagi S, Mori T, Itoga S, Shimada H, Tomonaga T, Kito M, Nakajima-Takagi Y, Kubo S, Nakaseko C, Hatano M, Miki T, Matsuo M, Fukuyo M, Kaneda A, Iwama A,

Nomura F. Haploinsufficiency of the c-myc transcriptional repressor FIR, as a dominant negative-alternative splicing model, promoted p53-dependent T-cell acute lymphoblastic leukemia progression by activating Notch1. *Oncotarget* 査読有、6 巻、2015、5102-5117. DOI: なし

Lee EY, Kaneko S, Jutabha P, Zhang X, Seino S, Jomori T, Anzai N, Miki T. Distinct action of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor miglitol on SGLT3, enteroendocrine cells, and GLP1 secretion. *J Endocrinol.* 査読有、224 巻、2015、205-214 DOI: 10.1530/JOE-14-0555.

Mukai E, Ohta T, Kawamura H, Lee EY, Morita A, Sasase T, Miyajima K, Inagaki N, Iwanaga T, Miki T. Enhanced vascular endothelial growth factor signaling in islets contributes to cell injury and consequential diabetes in Spontaneously Diabetic Torii rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 査読有、106 巻、2014、303-11 DOI: 10.1016/j.diabres.2014.08.023.

Kawamoto K, Yabe S, Konno M, Ishii H, Nishida N, Koseki J, Fukuda S, Tomimaru Y, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Tanemura M, Ito T, Lee EY, Mukai E, Miki T., Doki Y, Mori M, Hamazaki T, Nagano H, Okochi H. Murine insulinoma cell-conditioned medium with BETA2/Neurod1 transduction efficiently induces the differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into  $\beta$ -like cells both in vitro and in vivo. *J Stem Cell Res Ther.* 査読有、4 巻、2014、1-9 DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7933.1000221>

Ogata H, Seino Y, Harada N, Iida A, Suzuki K, Izumoto T, Ishikawa K, Uenishi E, Ozaki

N, Hayashi Y, Miki T., Inagaki N, Tsunekawa S, Hamada Y, Seino S, Oiso Y.  $K_{ATP}$  channel as well as SGLT1 participates in GIP secretion in the diabetic state. *J Endocrinol.* 査読有、222 巻、2014、191-200. doi: 10.1530/JOE-14-0161.

Kitamoto T, Sakurai K, Tachibana K, Yokoh H, Ishikawa K, Miki T., Yokote K. A case of Type 1 diabetes with nocturnal hypoglycemia after desensitization therapy for insulin allergy. *Diabetes Care.* 査読有、36 巻、2013、89-89 DOI:10.2337/dc12-2591

Seino Y, Miki T., Fujimoto W, Lee EY, Takahashi Y, Minami K, Oiso Y, Seino S. Cephalic phase insulin secretion is  $K_{ATP}$  channel-independent. *J Endocrinol.* 査読有、218 巻、2013、25-33 DOI: 10.1530/JOE-12-0579.

Oarada M, Miki T., Kohno S, Sakai K, Nikawa T, Yoneyama M, Gono T. Refeeding with a standard diet after a 48-h fast elicits an inflammatory response in the mouse liver. *J Nutr Biochem.* 査読有、24 巻、2013、1314-1323.

〔学会発表〕(計 12 件)

#### 国際学会

Lee EY, Zhang X, Miki T. (2014) Mechanism and physiological roles of glucose sensing in enteroendocrine cells. **50<sup>th</sup> EASD Annual Meeting.** Vienna, Austria, 9/15-19.

Mukai E, Morita A, Hiratsuka A, Takatani T, Lee EY, Miki T. (2014) Dual roles of a DPP-4 inhibitor on cytoprotection and proliferation of pancreatic  $\beta$ -cells in a mouse model of  $\beta$ -cell injury/regeneration. **50<sup>th</sup> EASD Annual Meeting.** Vienna, Austria, 9/15-19.

Lee EY, Sakurai K, Toda C, Minokoshi Y, Miki T. (2013) Unsuppressed Lipolysis in Adipose Tissue by Insulin Is Critical for Glucose Homeostasis under High Fat Diet. **49<sup>th</sup> EASD Annual Meeting**. Barcelona, Spain, 9/23-27.

## 国内学会

Takashi Miki, Eun Young Lee, Yasuhiko Minokoshi (2015) 肝臓における代謝産物感知と糖代謝制御 Symposium in A better understanding of liver metabolism by multifaceted approaches. **第 92 回日本生理学会**、神戸国際会議場他 (兵庫県、神戸市) 3/21-23.

李恩瑛、張錫麟、三木隆司 (2014) 腸内分泌 L 細胞のグルコース感知と脳への情報伝達 **第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会**、大阪国際会議場他 (大阪府、大阪市) 5/22-24.

尾方秀忠、三木隆司 (17 人中 1 1 番目) 他 (2014) 単糖類は  $K_{ATP}$  チャネル依存性の経路と非依存性の経路により GIP 分泌を惹起する。 **第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会**、大阪国際会議場他 (大阪府、大阪市) 5/22-24.

森田亜州華、三木隆司 (6 人中 6 番目) 他 (2014) DPP- 阻害薬による膵 細胞死抑制と増殖促進-膵 細胞傷害/再生マウスを用いた検討- **第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会**、大阪国際会議場他 (大阪府、大阪市) 5/22-24.

Takashi Miki (2014) インスリンによる脂肪組織-肝臓間の代謝産物の動態制御。 Symposium in Maintenance of Glucose Homeostasis through Tissue-tissue Interaction. **第 91 回日本生理学会**、鹿児島大学 (鹿児島県、鹿児島市) 3/16-18.

櫻井健一、三木隆司 (5 人中 5 番目) 他 (2013) 高脂肪餌により糖尿病を発症する

変異インスリン受容体ノックインマウスの肝臓における遺伝子発現。 **第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会**、ホテル日航熊本他 (熊本県、熊本市) 5/16-18.

清野祐介、三木隆司 (16 人中 1 1 番目) 他 (2013) プログルカゴン遺伝子 GFP ノックインマウスにおける膵 細胞由来 GIP の分泌機構の解明。 **第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会**、ホテル日航熊本他 (熊本県、熊本市) 5/16-18.

李恩瑛、三木隆司 (5 人中 5 番目) 他 (2013) インスリン受容体変異マウスの高脂肪食感受性糖尿病発症のメカニズム。 **第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会**、ホテル日航熊本他 (熊本県、熊本市) 5/16-18.

向英里、三木隆司 (9 人中 9 番目) 他 (2013) VEGF シグナル阻害は SDT ラットにおける細胞傷害と糖尿病発症を抑制する。 **第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会**、ホテル日航熊本他 (熊本県、熊本市) 5/16-18.

[図書] (計 2 件)

三木隆司 他、丸善出版株式会社、ギャノン生理学原書 24 版 (肝臓の輸送機能と代謝機能) 2013、pp582-592 (全 860 ページ)

三木隆司 他、医歯薬出版株式会社、イオンチャネル病の全て・医学のあゆみ別冊 (ATP 感受性  $K^+$ チャネルと疾患) 2013、pp131-136 (全 146 ページ)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

千葉大学大学院医学研究院代謝生理学研究室ホームページ:

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/physiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 隆司 (MIKI, Takashi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 50302568