

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461036

研究課題名(和文)モノアミンによる膵細胞分化と成熟化制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of pancreatic beta cell differentiation and maturation mechanism by monoamines

研究代表者

坂野 大介 (Sakano, Daisuke)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：40571039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：約3000種類の低分子化合物の中からマウス膵細胞の細胞分裂を促進する化合物を探索した。その結果、ドーパミンD2受容体(Drd2)のアンタゴニストであるDomperidon(DPD)を同定した。さらにDPDには細胞の自己複製能の上昇に加えて強い脱分化抑制効果と細胞死抑制効果があることを明らかにした。さらに、分子機構について調べた結果、Drd2とアデノシンA2a受容体がヘテロ複合体を形成することでアデノシンA2a受容体の機能を促進し、細胞の細胞分化・脱分化や細胞分裂・細胞死が制御されている可能性が示唆された(Sakano et al., Stem Cell Reports, 2015)。

研究成果の概要(英文)：We screened compounds that promote cell proliferation of mouse pancreatic cells using 3,000 low molecular weight compounds. As a result, Domperidon (DPD) which is an antagonist of dopamine D2 receptor (Drd2) was identified. And it was also revealed that DPD has a strong dedifferentiation suppressing effect and cell death suppressing effect in addition to an increase of self-replicating ability of cell. Furthermore, the formation of a heterodimer between Drd 2 and the adenosine A 2a receptor is important to control cell differentiation, dedifferentiation, cell division and cell death (Sakano et al., Stem Cell Reports, 2015).

研究分野：発生学、細胞生物学、分子生物学

キーワード：インスリン 細胞 分化 脱分化 モノアミン ドーパミン

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病の原因は膵β細胞が破壊されることで血糖値を下げるために必要なインスリンが産生されないことである。治療には膵臓や膵島の移植治療が効果的だが、ドナー不足が妨げとなっている。ES・iPS細胞から機能的な膵β細胞への分化機構の解明と分化細胞の移植治療への応用が可能となれば、多能性幹細胞を用いた再生医療の実現化に近づく。

1-1 哺乳類の膵臓の発生

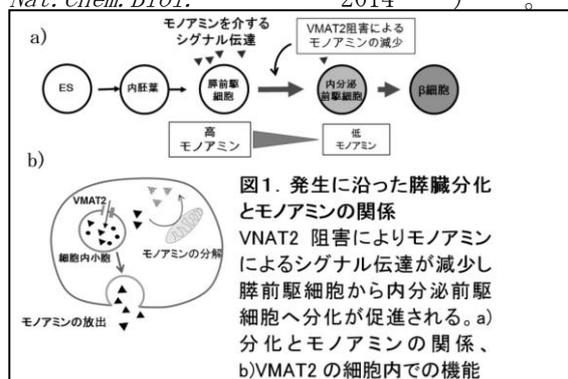
膵臓は発生過程において内胚葉から形成される臓器である。現在では分化研究によりヒトの多能性幹細胞からの胚性内胚葉や内分泌前駆細胞への分化手法の効率化が進み正常発生の主な分化経路(図1a)をある程度模倣できるようになった。しかし、現在報告されているマウス・ヒトのES・iPS細胞の分化誘導法ではインスリン産生細胞(β細胞)はインスリン以外の膵内分泌ホルモンも生産することやインスリン分泌能が低いことが問題である。一方、同じ手法で前駆細胞に分化させた細胞をマウスへ移植すると正常なホルモン生産・分泌をする。したがって、前駆細胞としては生体内で分化する細胞と比較的近いものが誘導できているが、β細胞になる最終段階の分化・成熟化過程が生体内を模倣していないのであり、このメカニズムを理解・模倣し、正常な細胞を作る必要がある。

1-2 申請者らのこれまでの研究

- ① マウス ES 細胞を M15 支持細胞上で培養し、成長増殖因子を添加することで 30% の ES 細胞が Pdx1 陽性の膵前駆細胞に分化することを報告した(Shiraki et al., 2008)。M15 細胞との共培養の効果は M15 が供給する細胞外マトリクスであり成長増殖因子の添加によって分化がさらに促進されることがわかった。この細胞外マトリクスは人工基底膜(sBM)を使用することで代用できることを明らかにした(Higuchi et al., 2010)。これらの結果から ES 細胞から内胚葉系譜への分化誘導には細胞基底膜構造など足場となる 3 次元構造が必要と考え、申請者は M15 や sBM に代わる細胞分化の足場として合成基材を用い、

インスリン産生細胞(β細胞)に分化させる安定的かつ大量に低分子化合物をスクリーニングできる系を確立した(Sakano et al., *Nat. Chem. Biol.* 2014)。

約 1300 個の低分子化合物をスクリーニングし、インスリン陽性細胞の分化を促進する 10 のヒット化合物を同定した。最も効果が高かったものは Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) という細胞質内のモノアミン(ドーパミン、セロトニン、アドレナリンなど)を細胞内小胞へ取り込む転移酵素(図 1 b)の阻害剤であり、膵前駆細胞から内分泌前駆細胞への分化を促進した。ほかにもモノアミン代謝関連化合物が効果を示した(Sakano et al., *Nat. Chem. Biol.* 2014)。



さらに複数の化合物を組み合わせ使用し、β細胞を増加させるだけでなく成熟化(グルコース濃度に応答したインスリン分泌能をもつ)した細胞を分化させることができた。*In vitro* で誘導した細胞を糖尿病モデルマウスへ移植すると移植後 1 か月の間に**血糖値が改善**した(図2)。

1-3 モノアミンによるβ細胞量調節

一方、我々が最近明らかにした発生期のモノアミンを介した分化調節に加えて、成体の妊娠期にはセロトニン合成が活発になることで、膵β細胞の増殖が亢進し、妊娠に伴って低下するインスリン作用を補っていることが知られている。セロトニンのみならず複数のモノアミンを複合的に介する細胞間のシグナル伝達機構を解明することが糖尿病治療に貢献すると考えている。

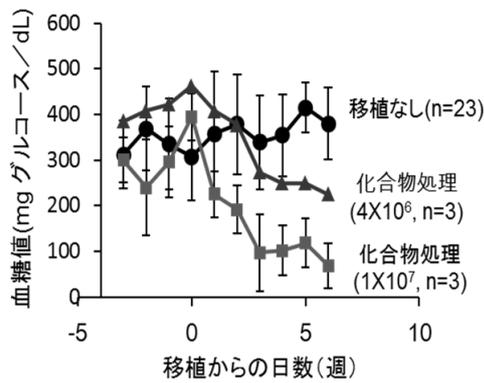


図.2 糖尿病モデルマウスへの ES 由来 β 細胞移植

AKITA マウスの腎被膜下へ異なる量の細胞数の ES 由来 β 細胞を移植した。細胞量に依存して血糖が正常値 (200 mg グルコース/dL 以下) に回復した。

2. 研究の目的

本研究では、発生期および成体の膵 β 細胞におけるモノアミンによる細胞間シグナル伝達の果たす機能について解明する。

申請者らは細胞質内に存在するモノアミンを小胞に取り込むトランスポーターの一種 Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) を阻害することで ES 細胞から膵 β 細胞への分化誘導効率が高まることを明らかにした。また、成体の β 細胞もモノアミンを介するシグナルにより増殖・細胞死が調節されていることを示唆する結果を得ている。本研究によって VMAT2 を介するモノアミンシグナルの作用メカニズムを解明することにより、効率的に機能的な β 細胞を In vitro で誘導が可能となり将来的な移植治療に貢献できる。

3. 研究の方法

3-1. 膵臓分化・を促進するモノアミン受容体を介したシグナルの標的分子の特定

VMAT2 機能の阻害が ES 細胞の分化過程を促進することから、VMAT2 が正常発生においても膵臓分化を抑制しているのか検討する。申請者らは既に Cre リコンビナーゼにより

VMAT2 遺伝子のエキソンの一部を欠損するマウスを作成している。今後インスリン、Pdx1 などのプロモーター制御下で Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配することによって膵臓系譜細胞特異的に VMAT2 を欠損させるコンディショナル KO マウスの作製を進める。マウスの正常発生における膵臓分化の表現型について免疫組織学的解析によって明らかにする。

また、全身で VMAT2 を欠損した場合胎生致死がみられるが VMAT2KO/ヘテロマウスは VMAT2 の発現が半減している。このマウスへの腹腔内グルコース負荷試験では野生型マウスに比べてインスリン分泌能が高いことを明らかにしている。

コンディショナル KO マウスや全身で VMAT2 量が低下しているマウスの表現型 (β 細胞量とインスリン分泌能) に変異が見られた場合、さらに Pdx1/GFP、Insulin1/GFP、Glucagon/GFP マウスとの交配を行い、膵臓系譜の細胞を Cell Sorter により分取する。さらにマイクロアレイ解析により VMAT2 機能低下の影響を受ける遺伝子を特定する。

3-2. 膵 β 細胞の自己複製を促進する薬物のスクリーニング

マウス ES 細胞から分化誘導した膵 β 細胞を移植することで膵島細胞移植と同等の効果をj得るための細胞培養条件の構築を試みる。そのためこれまでに構築した低分子化合物による膵前駆細胞から β 細胞分化を促進する分化培養系を基本としてさらに β 細胞自身の増殖を促す低分子化合物をスクリーニングする。低分子化合物ライブラリーと「5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU)」を同時に培地中に添加する。EdU とインスリンを免疫組織学的に染色することによって増殖過程にある β 細胞数に与える低分子化合物の影響を調べる。細胞分化のスクリーニング実験で用いたのと同様に薬剤の標的分子が既知のライブラリーを使用し、効果のあ

る化合物に関しては標的分子の過剰発現もしくは発現抑制によりその効果を検証する。 β 細胞増殖には先行報告などからモノアミンによる制御が重要であると予想される。一般的に細胞が凝集している構造をとる生体内の膵島では β 細胞の複製はほとんど起こらない。しかし、マウス膵島を単離したのちに酵素処理により単一にした膵島細胞を用いることで β 細胞の複製能が得られることをすでに明らかにしている。生体から取り出した β 細胞をスクリーニングに用いることでES/iPS細胞由来の β 細胞の増殖に加えて、*In vitro*での分化ではなく成体から得た β 細胞の増殖に応用できる可能性を含んでいる。この手法はヒトiPS細胞を用いた治療に加えて、ドナーから得た移植源としての β 細胞を増殖させること、さらには糖尿病患者への投薬により自己の β 細胞を回復させる治療につながるかもしれない(図3)。

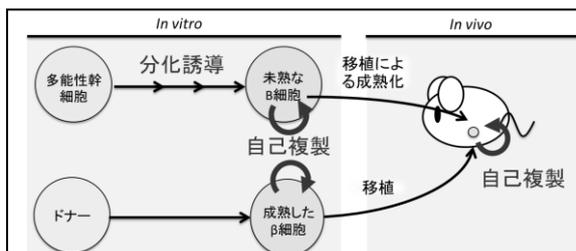


図3. β 細胞の増殖能を活性化させる化合物の探索

細胞分化効率を上昇させるだけでなく誘導した後の β 細胞を増殖させることや移植後に細胞死を抑制することは効果的な移植治療につながる。

3-3. 膵障害モデルマウスへの低分子化合物の投与

申請者らは、ストレプトゾトシン (STZ) を注射することで選択的に膵島細胞を破壊し、糖尿病を発症するマウスを作製し実験を行ってきた(Kataoka et al., 2012)。膵 β 細胞の自己複製や機能維持を促す低分子化合物をSTZ処理マウスへ投与することにより β 細胞の再生が促進するかどうか調べる。生後

7日にSTZを投薬し、50日目あたりに血糖値は500mg/dL程度に上昇し安定化する。前年度の β 細胞の自己複製を促進する薬物のスクリーニング結果をもとに薬剤を経口または尾静脈より投与する。投与後は継時的に血糖値の変動を追跡する。 β 細胞量の変化および機能評価法としてはグルコース負荷試験と血中CペプチドのELISA法による定量、抗インスリン抗体を用いた免疫組織学的解析を行う。

3-4. 膵原基組織培養系を用いたモノアミンを介するシグナル伝達機構の解明

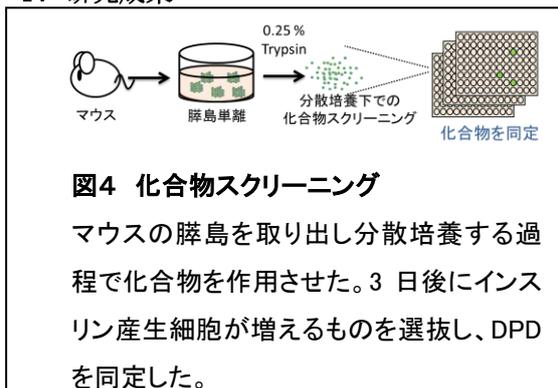
VMAT2が全身で欠損した場合E12.5付近に胎生致死となり発生期における詳細なVMAT2作用機構について解析できない。これを補い解析するためには組織培養が適している。

申請者らは胎生12.5日目の膵原基を取り出し、膵 β 細胞まで分化させる培養系を構築している((Sakano et al., *Nat. Chem. Biol.* in press)。前年度のKOマウス実験により推定される標的分子の機能が膵 β 細胞分化・成熟化に関与する分子機構が本培養系においても機能するか検証する。手法としては促進剤または阻害剤のほかshRNAを生産するレンチウイルスベクターまたはRNAiを用いたノックダウン実験を行う。

3-5. ヒト細胞への応用

上記の研究によりマウスES細胞から効率的に β 細胞へ誘導できた場合、おなじ分化機構の調節によりヒトES細胞さらにはヒトiPS細胞からの膵 β 細胞誘導に応用できるか否かについて検討する。すでに申請者らのグループではヒトiPS細胞からインスリン産生細胞誘導手法の確立を行い、さらなる効率化を目指している。また、移植実験に関しては糖尿病モデルマウスの腎皮膜下へ移植し評価する。

4. 研究成果

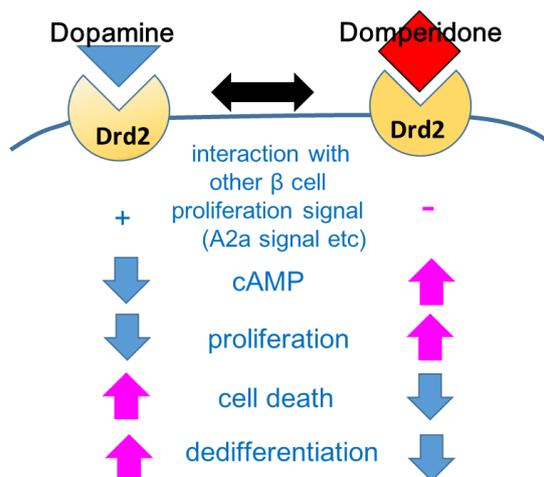
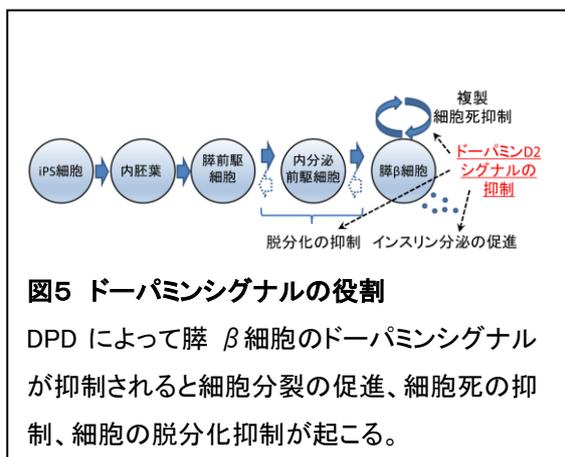


まず、マウスから膵臓の膵島を取り出し、約1200の低分子化合物をひとつずつ培地に添加してβ細胞数の細胞分裂を促進するものを探索した(図4)。

そして、ドーパミン D2 受容体の阻害剤であるドンペリドン (DPD) という化合物によってβ細胞特異的に細胞数が増えること発見した。このβ細胞が増える要因としては、細胞自身の自己複製能を高めることや細胞死を抑制すること、脱分化を抑制する働きがあることがわかった。脱分化とは一旦インスリンを産生・分泌できるように成熟化したβ細胞がインスリンの発現が低下したり、分泌能を失ったり“β細胞らしさ”をなくしてしまう状態である。通常、膵島の細胞を試験管内で培養を続けることにより、経時的に脱分化が進むことが知られているが、DPD の作用によりβ細胞らしさをより長い期間保てることがわかった(図5)。

これまでも生体から取り出したβ細胞を試験管内で増やす目的でさまざまな研究が進んできました。たとえば、ゼブラフィッシュの稚魚の膵β細胞を薬剤により壊した後にアデノシン A2a 受容体 (ADORA2A) を活性化させると膵β細胞数の回復が促進することが報告されている。さらにヒトやマウスの膵島の細胞を培養する過程でもアデノシンシグナルを活性化させると膵β細胞数の分裂が活性化することが報告されている。興味深いことに我々が発見した DRD2 の阻害によるβ細胞

数の増加はこれらの先行研究の結果と関連することがわかってきた。具体的には DRD2 が ADORA2A との相互作用によりアデノシンシグナルの阻害をしていることが予想された。DPD は DRD2 の ADORA2A に対する阻害を抑制することでアデノシンシグナルの機能を促進している(図6)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

1. **Sakano D**, Choi S, Kataoka M, Shiraki N, Uesugi M, Kume K, Kume S. Dopamine D2 receptor-mediated regulation of pancreatic b cell mass. *Stem Cell Reports*, 7, 95-109, 2016. (査読あり)
2. **Sakano D**, Shiraki N, Kuem S. Pancreatic differentiation from murine embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 1341, 417-23, 2016. (査読あり)
3. Nakashima R, Morooka M, Shiraki N, **Sakano D**, Ogaki S, Kume K, Kume S. Neural cells play an inhibitory role in

pancreatic differentiation of pluripotent stem cells. *Gens to cells* 20, 1028-1045, 2015. (査読あり)

[学会発表] (計8件)

1. **坂野大介**、崔 成翼、片岡正光、白木伸明、糸昭苑 モノアミンシグナルによる膵β細胞の増殖・分化の制御. 第89回日本生化学会年会 2016年9月26日(宮城)
2. **坂野大介**、園田雄輝、上船史弥、崔 成翼、片岡正光、糸昭苑、Monoamine signals control the proliferation and function of pancreatic beta-cells 第38回日本分子生物学会年会 2015年12月2日(兵庫)
3. **坂野大介**、糸昭苑、モノアミンを介したシグナル伝達による膵島の構造・機能の制御、第3回細胞凝集研究会、2015年11月20日(鹿児島)
4. **坂野大介**、崔 成翼、片岡正光、糸昭苑、A chemical screening for compounds that promote the replication 第37回日本分子生物学会年会2014年11月26日(神奈川)
5. **坂野大介**、モノアミンシグナルによる膵β細胞の分化・増殖制御、厚生労働省「ヒト幹細胞情報化推進事業」SKIP Seminar、2016年9月30日(東京)
6. **Sakano D**, Shiraki N, Kikawa K, Yamazoe T, Kataoka M, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsumoto S, Nakagata N, Anderson O, Stainier D, Endo F, Kume K, Uesugi M, Kume S., Monoamine mediating signals control the late-stage pancreatic beta cell differentiation, KEY Forum: From stem cell to organs. September 4-5 2014 (Kumamoto, Japan)
7. **Sakano D** Shiraki N, Kikawa K, Yamazoe T, Kataoka M, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsumoto S, Nakagata N, Anderson O, Stainier D, Endo F, Kume K, Uesugi M, Kume S., VMAT2 identified as a regulator of late-stage pancreatic beta-cell differentiation, ISSCR 12th Annual Meeting. June 17-21, 2014 (Vancouver, Canada)

8. **坂野大介**、日経BP社第12期バイオファイナンスギルド 第10回セミナー iPS細胞実用化の可能性 -インスリン分泌細胞のES細胞からの誘導法- 2014年5月22日(東京)

[図書] (計6件)

1. **坂野大介**、糸昭苑、-ヒト多能性幹細胞からの機能的な膵β細胞の作出-、Diabetes Update4 メディカルレビュー社、4(2)、13-14、2015(査読なし)
2. **坂野大介**、糸昭苑、-糖尿病における再生医療の現状と展望-、Animus LSI メディエンス社、84、35-38、2015(査読なし)
3. **坂野大介**、糸昭苑、膵β細胞研究の進化と展望「多能性幹細胞から膵β細胞への分化を制御するシグナル Islet Equality、メディカルレビュー社、3(3)、18-21、2014(査読なし)
4. **坂野大介**、糸昭苑「特集 糖尿病-診断・治療 update-」「膵β細胞・膵島の再生研究」、最新医学社、69(1)、36-41、2014(査読なし)
5. **坂野大介**、糸昭苑、iPS細胞を用いた膵β細胞研究の最前線、Diabetes Journal 糖尿病と代謝、協和企画、42(1)、1-6、2014(査読なし)
6. **坂野大介**、糸昭苑、幹細胞を用いた膵β細胞誘導研究、Diabetes Frontier 膵島バイオロジーの新たな展開、協和企画、42(1)、1-6、2014(査読なし)

[その他]

ホームページ等

「ドーパミンD2受容体を介して膵臓のβ細胞量が調節される」

http://educ.titech.ac.jp/bio/news/2016_07/052422.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂野 大介 (SAKANO Daisuke)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：40571039