

令和元年6月9日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26461346

研究課題名(和文) 膵島の自己組織化ならびに保護機構における神経堤由来シュワン細胞の役割

研究課題名(英文) Function-structure relationship; role of the islet Schwann cells

研究代表者

佐々木 敬 (Sasaki, Takashi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90205849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵島内分泌機能疲弊のメカニズムを知るため、膵島周囲に存在するSchwann細胞と細胞の相互作用、ならびにヒト異常機能膵島の解析を行った。膵島内の微小環境はどのような構成細胞によるものであるか、酸化ストレスに対抗する抗酸化ストレス機能を構成細胞が持つのか、分泌能に影響する遺伝子異常は何かに焦点を当てた。三次元培養系における膵島内細胞間の情報伝達系の同定、さらにはヒト膵島の機能異常に際しての遺伝子異常ならびに遺伝子発現異常を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスや特定の遺伝子異常による膵内分泌機能、すなわちブドウ糖応答性インスリン分泌機能の低下は糖尿病の原因と考えられている。本研究ではその発生メカニズムを明らかにする上で、特に膵島の三次元的な構成と機能の連関、構成細胞として膵島を被覆するシュワン細胞をも考慮に入れた点がユニークな研究であった。また、低重力培養装置を用いた三次元培養法による細胞間の相互作用の検討、ならびにヒトインスリノーマ細胞におけるインスリン分泌異常を起こす遺伝子異常に焦点を当てた点は、方法論としても新規のもので、当該分野に与えるインパクトも大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, with the aim of basic research to understand the mechanism of exhaustion of islet function that causes diabetes, we analyzed the interaction between cultured Schwann cells and cultured murine cells as well as cells isolated from human insulinoma tissue. We focus on what kind of cells consisting the microenvironment of the islet, and whether the cells have antioxidant ability to defense from the oxidative stress that causes the dysfunction, and gene mutations that affect secretory ability. For these purpose, we analyzed the influence of oxidative stress on the cells of pancreatic islets by cultured cell lines, identification of a signal transduction system between intra-islet cells within a three-dimensional culture system, and gene mutation of human pancreatic insulinoma cells. We found that the mechanism of coordination in the islet microenvironment as well as the involvement of specific genes have been estimated.

研究分野：膵内分泌

キーワード：膵島障害 インスリノーマ 三次元培養法 インスリン分泌

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病の成因として、膵島の傷害、それに続く膵島の疲弊が重要なものとしてあげられる。この膵島疲弊とそれに対応する再生に関与する新規生理的システムを解明する基盤的研究が急務である。

インスリン分泌は膵島内の細胞だけから分泌が行われるが、この細胞は血管からの空間的な位置関係などがそれぞれ異なるはずである。このような微小環境が個々に異なる細胞が単に集合しただけでは、インスリン分泌はリアルタイムに変化するような生体の代謝に対して効率よくタイムリーにインスリンを分泌できるとは考えにくい。このような概念から、膵島は単なる内分泌細胞、細胞の塊であるというのではなく、膵島内の内分泌細胞どうし、あるいは非内分泌細胞と内分泌細胞との相互作用により、膵島全体が協調的な機能、シンクロナイズした機能を持つことで、効率の良いブドウ糖応答性インスリン分泌 (Glucose-stimulated insulin secretion; GSIS) を実現しているのではないかと考えられて来ている。さらに、膵島障害が大きな原因の一つである2型糖尿病では、この統合された膵島機能が障害されて引き起こされるのではないかと、この自己組織化と統合された機能の障害を突き止めれば、糖尿病の発症予防にも重要な膵島細胞の再生が判明するのではないかと考えられたのである。しかし膵島機能を統合するメカニズムは未だほとんど解明されていない。

膵島の外周を被覆する膵島 Schwann 細胞は脳 astrocytes と同種細胞で、Glutamate Transporter 経路を介して膵島の微小循環の調節、また Nrf2 経路を介して酸化ストレスによる細胞障害の保護を行っていると考えられる。また、やはり膵島を構成する間質細胞も細胞間の同期に関与する可能性もある。しかもこれらは細胞間の情報伝達を担う分子、例えば Gap junction などの分子が関与している可能性もある。このような膵島の微細環境における協調のメカニズムを知るためには、Schwann 細胞と細胞との相互作用のメカニズムを明らかにし、同時に膵島内の間質細胞との関係性も明らかにしなければならない、と考えられた。

## 2. 研究の目的

上記の背景のような研究背景のもと、本研究では培養細胞系による膵島の構築細胞への酸化ストレスの影響、三次元培養系における膵島内細胞間の情報伝達系の同定、さらにはヒト膵島の機能異常に際しての遺伝子異常ならびに遺伝子発現異常を検討する。これらにより、膵島の微細環境における協調のメカニズム、特に Schwann 細胞と細胞との相互作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

膵島の構造のうち、周囲を覆う Schwann 細胞の由来は、neural crest 由来細胞でしか活性化しない cre-wnt1 プロモータ下の EGFP の transgene gene の発現、S100 および gfap タンパクの発現を観察した。

酸化ストレスの膵島細胞に及ぼす影響については、培養系に  $H_2O_2$  を添加することでこれを simulate し、さらに Schwann 細胞からの酸化ストレス保護作用についても両細胞の混合培養系への GSIS の検討を行うことで観察した。

三次元空間的な膵島構築とその意義については、低重力下培養装置による実験を行なった。またこの情報伝達機構の検討については、マウス gap junction の構成分子である Cx36 の siRNA による knock down、およびゲノム編集技術による遺伝子改変によった。

膵島機能異常のヒト症例における検討では、我々の担当した臨床一例について慈恵医大倫理委員会の承認のもと、手術材料のインスリノーマからゲノム DNA、total RNA およびタンパク質成分を抽出し、全ゲノム解析、RNA-Seq ならびにリン酸化タンパクのスクリーニングをピーズ法にておこなった。

## 4. 研究成果

### 【平成26年度】

初年度は、膵島周囲に存在する in vivo 解析に先立ち、peri-islet Schwann cell の in vitro での解析を可能とする準備を行った。まず neural crest でだけ発現する遺伝子プロモータ wnt1 で EGFP が発現するマウスを観察し、膵島周囲の Schwann 細胞がまさに neural crest 由来であることを確認した。さらに、この膵島周囲の Schwann 細胞では S100 および gfap タンパクの発現を共焦点レーザー顕微鏡と免疫染色法にて観察することで、確かに膵島周囲の Schwann 細胞は astroglia 細胞と同種同等であることを突き止めた。これに基づき、islet Schwann 細胞の in vitro 実験を施行するためにマウス astroglia 由来の培養細胞 IMS32 細胞をその樹立者より入手した。この培養細胞を用いて酸化ストレス応答の変化を in vitro の系で検証する計画を立てた。また研究分担者らと実験の手順や当該分野における新規理論的背景について、議論を重ねた。

### 【平成27年度】

平成27年度は引き続き、この膵島系の障害による細胞機能の変化の検討を行なった。モデルシステムとしては、マウス培養細胞を用いた。特にブドウ糖応答性インスリン分泌機能を有するβ細胞が、膵島というコンパートメントにおいてどのような細胞の相互作用による機序で分泌調節がなされているのかについて検討した。マウス樹立β細胞である MIN6 細胞を用い、

グルコース刺激に対する応答性を種々の条件で調べた。まず膵島の構成細胞として膵島周囲に存在する神経堤由来Schwann細胞の樹立株であるIMS32細胞をMIN6と共に共培養したところ、単独培養に比較して1細胞あたりのMIN6からのブドウ糖応答性インスリン分泌に増強効果が観られた。しかしIMS32のconditioned mediumにはこのような増強作用はなかった。以上のことは膵島内の構築において、シュワン細胞は液性因子を介さずにβ細胞への直接的な接触による保護、インスリン分泌促進作用を有することを示唆していると考えた。さらに糖尿病を惹起するとされている酸化ストレスのモデルとして、過酸化水素 $H_2O_2$ による培養細胞系への暴露処理を行ったところ、細胞死が惹起された。MTTアッセイにより細胞死が起こっていない条件を設定して再度調べると、 $H_2O_2$ 容量依存的にインスリン分泌を抑制した。また一方で、この $H_2O_2$ によるインスリン分泌不全は、IMS32の共培養によっても回復せず、膵島Schwann細胞による酸化ストレス作用はこの培養条件では観察できなかった。

【平成28年度】

前年度までの検討にてβ細胞を神経堤由来Schwann細胞とともに共培養するとブドウ糖応答性インスリン分泌(glucose-stimulated insulin secretion; GSIS)が亢進することを見出した。平成28年度は、この現象をより正確に検証することとした。

マウスβ細胞 (Min6) は培養する細胞密度によりインスリン分泌能が異なることが予想される。そこで、まずMn6細胞単独で様々な密度で培養を行うときに、一細胞あたりにおけるGSIS能を決定する方法を確立した。すなわち、Min6細胞を1wellあたりの細胞数を一定にしたときの培地中インスリン濃度をELISA法で測定した。Min6一細胞あたりへの換算はRealtime PCRにて定量した細胞特異的遺伝子、Glut2 mRNA量により換算(標準化)した。その結果、Min6単独培養では細胞密度が増すとGSISは低下する変化が測定された。またSchwann細胞株であるIMS32細胞と共培養した。これによると、Min6一細胞あたりのGSISは同じMin6細胞数であってもIMS32との共培養により亢進する傾向を示した。さらに間葉系細胞由来の線維芽細胞NIH3T3細胞とも共培養したが、同様の傾向であった。

この効果を受けて、Min6がIMS32から分泌される物質により影響を受けたためかどうかを知るため、IMS32のconditioned mediumをMin6の培地へ添加したところ逆にGSISは抑制されることが判明した。これは共培養のGSIS亢進メカニズムが、少なくとも培地中への分泌物質を介しているのではないことを示している。そこで、次に細胞間の接触による情報伝達装置を介するインスリン分泌機能の協調作用について検討することとした。情報伝達装置としてのマウス細胞のgap junctionについては、その構成分子であるCx36のsiRNAによるknock downを試みた。その結果、GSISの低下傾向が観られたが、有意差が得られなかった。これはsiRNA導入時の操作の影響が強く、統計学的な有意差を持った明確な結果は得られなかった可能性がある。そこで次年度に向け、ゲノム編集技術、三次元培養を応用した方法等を計画した。

【平成29年度】

生体の膵内分泌の構造単位である膵島の三次元構造をin vitroで再現し、これがインスリン分泌(GSIS)にどのように影響するかを検討する計画ウィ実行した。マウスβ細胞株Min6細胞とSchwann由来の培養細胞であるIMS32細胞を二次元ではなく、マトリゲル基底膜マトリックスを用いて三次元培養した。すると、Min6単独に比べてこの共培養によりGSISにおけるインスリン分泌量が平均で3倍に増加した。さらに三次元培養に基づく形態的变化を観察を培養状態のまま観察の可能なデジタル顕微鏡を用いて行った。当該年度における三次元培養は、微小重力環境下における培養の可能な細胞培養装置ZEROMO<sup>R</sup>(北川鉄工所)をCO<sub>2</sub> incubator内に設置することで行った。予備的な実験として、 $0.5 \times 10^5$ /mlのIMS32細胞を12wellプレートへ4ml/wellでseedした。培養した細胞を観察したところ、平常の1G下での培養に比べGを下げたZEROMOによる低重力培養条件では細胞のサイズが大きくなり、プレートから上部に向かって立体的に増殖していることが観察され、Min6細胞とSchwann細胞の三次元的な接着による情報伝達がインスリン分泌の亢進に関与していることが考えられた。

以上の実験結果から、GSISの増加は細胞間の分子、特にGap junctionを構成するConnexin 36(GJD2)タンパクが関与している可能性が示唆される。そこでGjd2を欠失させたIMS32細胞がWTと同様にMin6細胞のGSISにおけるインスリン分泌量を増大させるかどうか、さらに共培養した際に形態的にどのような変化が観察されるのかについて知るため、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用いGjd2遺伝子の欠損したIMS32細胞の作成を計画した。しかしこれまでのところGjd2遺伝子欠損IMS32細胞は培養皿底面への接着能が極端に低下し増殖能も低く、実験に供与できる細胞クローンを得ることが困難な状況である。

【平成30年度】

ヒトに発生したインスリノーマでは、Glucose-induced insulin secretion(以下GSIS)に観るような生体の恒常性維持のための調節機能は失われて栄養素に非依存的に調節が失われて不適切な過剰分泌を起こす。このことに着目して、最終年度の主な検討として、我々の担当した臨床一例について慈恵医大倫理委員会の承認のもと手術材料のインスリノーマからゲノムDNA、total RNAおよびタンパク質成分を抽出した。これと対比させながら、同一人(インスリノーマ患者)のgermlineのゲノムを反映していると考えられる末梢血の有核細胞からのゲノムと比較した。血球(germline)のゲノムの解析としては16億5千万リード・2,480億塩基、インスリノーマのゲノムの解析では19億2千万リード・2,879億塩基の解析を行ったところ、国際標準UCSC hg19と比較した変異としては、血球とインスリノーマ合計で130万箇所、シーケンズの精度の

高いリードに限ると54万箇所（以下PASSとする）があった。またPASSのうち、血球で変異が無く、インスリノーマで変異があるものは67遺伝子で、またPASSのうち、インスリノーマで変異が無く、血球で標準と比較して変異があるものが92遺伝子であった。さらにこのPASSのうち、エクソン部分の変異は9,0787箇所、うちPathogenic 41箇所、Likely Pathogenic 7箇所であることが判明した（但し、これらは血球とインスリノーマの双方でUCSC hg19と異なっていてgermline由来であると考えられた）。このexon部分の48箇所のvariationについて、GSISなど生体の恒常性維持希望と関連する遺伝子について、今後はその機能変異の同定を行うことで、膝島の自己組織化と生体恒常性維持のメカニズムが明らかにできる道が開かれた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Sasaki T. Sarcopenia, frailty circle and treatment with sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors. *J Diabetes Investig.* 査読あり, 2019 Mar;10(2):193-195. doi: 10.1111/jdi.12966.
2. Samukawa Y, Haneda M, Seino Y, Sasaki T, Fukatsu A, Kubo Y, Sato Y, Sakai S. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Luseogliflozin, a Selective SGLT2 Inhibitor, in Japanese Patients With Type 2 Diabetes With Mild to Severe Renal Impairment. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 査読あり, 2018 Nov;7(8):820-828. doi: 10.1002/cpdd.456.
3. Sasaki T, Sugawara M, Fukuda M. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor-induced changes in body composition and simultaneous changes in metabolic profile: 52-week prospective LIGHT (Luseogliflozin: the Components of Weight Loss in Japanese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus) Study. *J Diabetes Investig.* 査読あり, 2019 Jan;10(1):108-117. doi: 10.1111/jdi.12851.
4. Seino Y, Sasaki T, Fukatsu A, Imazeki H, Ochiai H, Sakai S. Efficacy and safety of luseogliflozin added to insulin therapy in Japanese patients with type 2 diabetes: a multicenter, 52-week, clinical study with a 16-week, double-blind period and a 36-week, open-label period. *Curr Med Res Opin.* 査読あり, 2018 Jun;34(6):981-994. doi: 10.1080/03007995.2018.1441816.
5. Okita N, Higami Y, Fukai F, Kobayashi M, Mitarai M, Sekiya T, Sasaki T. Modified Western blotting for insulin and other diabetes-associated peptide hormones. *Sci Rep.* 査読あり, 2017 Jul 31;7(1):6949. doi: 10.1038/s41598-017-04456-4.
6. Seino Y, Yabe D, Sasaki T, Fukatsu A, Imazeki H, Ochiai H, Sakai S. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor luseogliflozin added to glucagon-like peptide 1 receptor agonist liraglutide improves glycemic control with bodyweight and fat mass reductions in Japanese patients with type 2 diabetes: A 52-week, open-label, single-arm study. *J Diabetes Investig.* 査読あり, 2018 Mar;9(2):332-340. doi: 10.1111/jdi.12694.
7. Sakai S, Kaku K, Seino Y, Inagaki N, Haneda M, Sasaki T, Fukatsu A, Kakiuchi H, Samukawa Y. Efficacy and Safety of the SGLT2 Inhibitor Luseogliflozin in Japanese Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Stratified According to Baseline Body Mass Index: Pooled Analysis of Data From 52-Week Phase III Trials. *Clin Ther.* 査読あり, 2016 Apr;38(4):843-862.e9. doi: 10.1016/j.clinthera.2016.01.017.

8. Haneda M, Seino Y, Inagaki N, Kaku K, Sasaki T, Fukatsu A, Kakiuchi H, Sato Y, Sakai S, Samukawa Y. Influence of Renal Function on the 52-Week Efficacy and Safety of the Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Luseogliflozin in Japanese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Clin Ther. 査読あり, 2016 Jan 1;38(1):66-88.e20. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.10.025.
9. Seino Y, Inagaki N, Haneda M, Kaku K, Sasaki T, Fukatsu A, Ubukata M, Sakai S, Samukawa Y. Efficacy and safety of luseogliflozin added to various oral antidiabetic drugs in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. J Diabetes Investig. 査読あり, 2015 Jul;6(4):443-53. doi: 10.1111/jdi.12316.
10. Nemoto M, Sasaki T. High-throughput screening of small interfering ribonucleic acid identifies important modulators in islet dysfunction and apoptosis. J Diabetes Investig. 査読あり, 2015 Jul;6(4):390-2. doi: 10.1111/jdi.12283.
11. Sasaki T, Seino Y, Fukatsu A, Ubukata M, Sakai S, Samukawa Y. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety of Luseogliflozin in Japanese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Single-blind, Placebo-controlled Trial. Adv Ther. 査読あり, 2015 Apr;32(4):319-40. doi: 10.1007/s12325-015-0200-x.
12. Sasaki T, Seino Y, Fukatsu A, Ubukata M, Sakai S, Samukawa Y. Absence of Drug-Drug Interactions Between Luseogliflozin, a Sodium-Glucose Co-transporter-2 Inhibitor, and Various Oral Antidiabetic Drugs in Healthy Japanese Males. Adv Ther. 査読あり, 2015 May;32(5):404-17. doi: 10.1007/s12325-015-0209-1.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤本 啓

ローマ字氏名：Fujimoto Kei

所属研究機関名：東京慈恵会医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 40372974

(2)研究協力者

研究協力者氏名：根本昌実、河野 緑、吉澤幸夫

ローマ字氏名：Nemoto Masami, Kouno Midori, Yoshizawa Yukio

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。