

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670462

研究課題名(和文) 膵 細胞増殖・分化における消化管ホルモン IBCAP の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pancreatic beta-cell proliferation and differentiation mechanism by novel intestinal secretory protein IBCAP (betagenin).

研究代表者

横尾 友隆 (Yokoo, Tomotaka)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：80400688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は新規消化管ホルモン因子 Betagenin = IBCAP を同定し解析を行ってきた。今回、Betagenin の分泌産物の構造解析を進め、得られた情報から合成ペプチドを作製し、その活性を評価した。その結果、Betagenin 合成ペプチドにおいても膵 細胞増殖促進作用を持つ事を強く示唆する結果を得た。さらに、iPS 細胞から膵 細胞への分化誘導の際に Betagenin を添加すると効率を高めることから、Betagenin は膵 細胞の分化、再生にも有用である可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Betagenin is another intestine-specific secretory protein with β -cell augmenting activity, identified in our laboratory. In the current study, we investigated putative β -cell transdifferentiation function of betagenin. First, betagenin synthetic peptide, based on the sequence of the purified secreted protein, stimulated the proliferation of MIN6 cells. In addition, we have results suggesting that betagenin may contribute to the induction of iPS cell differentiation to β -cells. Our findings indicate that betagenin have an activity to induce not only proliferation but also differentiation of β -cells. Betagenin may be used as a potent inducer for pancreatic β -cell regeneration.

研究分野：代謝内分泌学

キーワード：糖尿病 膵 細胞

1. 研究開始当初の背景

日本人のライフスタイルの欧米化により、糖尿病、脂質異常症や肥満といった生活習慣病患者は増加の一途をたどっている。そのため、疾患メカニズムの解明、より有効な治療法の確立が世界的にも急務となっている。

また、現在、世界中で行われている膵臓の再生、あるいは ES/iPS 細胞などからの膵β細胞への分化誘導に関する研究では、再生した膵臓、膵β細胞からのインスリン分泌制御やグルコース応答性、分泌量に問題を多く抱えており、未だにその確立した方法はできていない。

我々は以前より消化管に注目し、新しい消化管ホルモンの探索を行い、新規消化管特異的分泌タンパク遺伝子 Betagenin = IBCAP を同定した。この Betagenin は機能の一部として、膵β細胞の増殖促進作用を持つことが判明している。さらに、マウスにアデノウイルスで Betagenin を強制発現すると肝臓にインスリン陽性細胞が出現すること、また、iPS 細胞に Betagenin を添加すると膵β細胞への分化誘導効率を高めることを見出しており、Betagenin は膵臓の再生や膵β細胞分化に有用であることが強く示唆されていた。

2. 研究の目的

この Betagenin は膵β細胞において増殖促進作用を持つことが明らかとなっているが、膵β細胞分化に関しても何らかの関連を持つことが示唆されている。

そこで本計画では、膵臓β細胞の機能恒常性維持を担う可能性を持つ液性因子 Betagenin を標的として、膵β細胞の増殖・分化促進作用のメカニズム解明を目的とした。将来的には、膵臓移植や膵臓再生医療への応用も含め、特に 1 型糖尿病への治療展開を目指した。

3. 研究の方法

本研究は、われわれが発見した新規消化管

ホルモン Betagenin について、糖尿病治療薬の創薬や膵β細胞への再生医療などの応用へ向けての検討を行った。

具体的には、「Betagenin による膵β細胞に対する増殖効果および分化に与える影響」について検討を行い、Betagenin は糖尿病治療あるいは膵再生医療の標的となりうるか明らかにするために以下の検討を行った。

(1) Betagenin 活性体の構造決定

Betagenin 遺伝子産物は切断されて分泌および活性化される可能性を示唆するデータを得ているため、まずその構造を決めた。まず、Betagenin 強制発現培養上清を作製し、そこから膵β細胞増殖を指標として HPLC 精製した。その活性フラクションを LC-MS/MS 解析することで、活性体候補の 1 次構造を検討した。

(2) Betagenin 合成ペプチドと膵β細胞増殖

Betagenin 合成ペプチドによる膵β細胞増殖促進作用を検討するために、膵β細胞の培養細胞株である MIN6 細胞での EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) の取り込みを指標に増殖能を検討した。

(3) Betagenin 合成ペプチドと膵β細胞分化

Betagenin の増殖以外の機能として膵β細胞への分化に関与するかについて検討した。

具体的には、Betagenin を添加することで iPS 細胞から膵β細胞に分化させる従来の方法より改善効果が認められるかどうかについて比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) Betagenin 活性体の構造決定

今回、Betagenin の分泌産物の構造解析を進め、Betagenin 強制発現細胞の培養上清から LC-MS/MS で活性体の候補フラグメントの情報を得た。

この得られた情報に基づきペプチドを合

成し、その活性を確認、評価するために以後の検討にこのペプチドを用いた。

(2) Betagenin 合成ペプチドと膵β細胞増殖

これまでの Tg マウスや KO マウスの結果から、*in vivo* において Betagenin に膵臓ラ氏島あるいは膵β細胞増殖促進作用があることが判明している。

そこで、今回作製した合成 Betagenin ペプチドにおいてもこの増殖作用があるか否かについて、*in vitro* の実験系を用いて検討を行った。その結果、この Betagenin 合成ペプチドには MIN6 細胞において EdU 取り込みが増加していたことから、膵β細胞増殖刺激作用を持つ事を強く示唆する結果を得た。

(3) Betagenin 合成ペプチドと膵β細胞分化

今回、ヒト iPS 細胞から膵β細胞への分化誘導において、Betagenin 活性体合成ペプチドを加えることで、インスリン陽性細胞の誘導効率が劇的に上昇することを見出した。

今後は、膵細胞への分化誘導における Betagenin ペプチドのさらなる有用性、あるいは、膵島移植における生着率やその後の増殖に影響を与える可能性を詳細に検討する必要がある。具体的には、iPS 細胞あるいは膵前駆細胞からの膵β細胞への分化誘導において、どのタイミングで Betagenin ペプチドを添加するか、あるいは、どのように用いれば最も分化の効率アップを図ることが出来るかについて、既存の方法と比較しながら検討する必要がある。

今回の結果から、Betagenin には膵β細胞増殖刺激作用および膵β細胞への分化誘導作用を持つと言う事を強く示唆する結果を得た。

in vitro においても膵β細胞の増殖が見られることから、Betagenin は GLP-1 等のインクレチンと比べてもより強力な膵β細胞増殖作用を有していると言える。このように、

Betagenin は第3のインクレチンとなる可能性があるが、膵β細胞増殖に関しては、既存のインクレチンよりもアドバンテージを持っていると考えられる。

Betagenin は他の消化管ホルモンと有意なホモロジーを持たない独自のタンパクであることと今回得られた結果から、Betagenin を用いた糖尿病治療は今後の糖尿病治療を変える可能性があると考えられる。Betagenin は膵β細胞増加作用および、膵β細胞への分化促進作用と併せて考えると、糖尿病に対する根源的治療薬となる可能性が示唆された。今後、膵ラ氏島、膵β細胞の移植や再生医療も含め、糖尿病、特に1型糖尿病の治療への応用が期待される。

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1件)

Tang N, Matsuzaka T, Suzuki M, Nakano Y, Zao H, Yokoo T, Suzuki-Kemuriyama N, Kuba M, Okajima Y, Takeuchi Y, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Shimada M, Nakagawa Y, Yahagi N, Yamada N, Shimano H. Ablation of Elov16 protects pancreatic islets from high-fat diet-induced impairment of insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014, **450**(1): 318-23. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.113.
査読有

[学会発表](計4件)

横尾友隆、渡邊和寿、飯田薫子、鈴木浩明、高島成二、島野仁、山田信博、岡崎康司、豊島秀男、新規消化管ホルモン Betagenin は膵β細胞の増殖を刺激し糖尿病を改善する、第13回 RCGM フロ

ンティアシンポジウム, 埼玉医科大学
創立 30 周年記念講堂 (埼玉県日高市),
2015.10.31-11.1

Toyoshima H, Yokoo T, Betagenin, a novel
intestinal hormone, increases β -cell and
alleviates diabetes. 第 58 回 日本糖尿病
学会年次学術集会, 下関市民会館 (山
口県下関市), 2015.5.23

Yokoo T, Yamashita-Sugahara Y, Watanabe
K, Tada-Iida K, Suzuki H, Shimano H,
Yamada N, Okazaki Y, Toyoshima H,
Effect of Betagenin on Pancreatic beta-cell
Proliferation and Differentiation, 第 12 回
RCGM フロンティア国際シンポジウム,
埼玉医科大学創立 30 周年記念講堂 (埼
玉県日高市), 2014.11.1

菅原泉、横尾友隆、渡邊和寿、飯田薫
子、鈴木浩明、島野仁、山田信博、岡
崎康司、豊島秀男, iPS 細胞を用いた、
新規消化管ホルモン IBCAP が膵 β 細胞
分化に与える影響の検討, 第 57 回 日
本糖尿病学会年次学術集会, 大阪国際
会議場 (大阪府大阪市), 2014.5.22

〔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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

横尾 友隆 (YOKOO TOMOTAKA)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 80400688

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岡崎 康司 (OKAZAKI YASUSHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 80280733

豊島 秀男 (TOYOSHIMA HIDEO)
埼玉医科大学・医学部・客員准教授
研究者番号 : 20197966