

平成 31 年 4 月 1 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 685

氏 名 北本 匠

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: ニューヨーク (国名: 米国)

2. 研究課題名 (和文)

膵β細胞は膵島周囲のインスリン濃度を感知しβ細胞量を制御する3. 派遣期間: 平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Department of Medicine and Berrie Diabetes Center, Columbia University

5. 所期の目的の遂行状況及び成果

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

本研究は、糖尿病の病態形成において重要な役割を担う膵β細胞量制御機構の解明を目的としている。

糖尿病は、インスリンの相対的な作用不足による慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患である。その主な病型である 2 型糖尿病は、インスリン分泌不全あるいは、インスリン作用障害により発症し、これらは遺伝的及び環境的要因による影響を受ける。2 型糖尿病患者の病態形成における Natural history として、まずインスリン抵抗性が出現し、次いでインスリン分泌能の低下が生じることで高血糖状態に至ることが、1999 年に米国で行われたコホート研究により明らかにされた。しかし 2003 年に Butler らは膵β細胞量が境界型糖尿病の状態から健常人に比較し有意に減少していることを示した。この結果により、インスリン抵抗性が 2 型糖尿病の病態形成の主要因と考えられてきていたそれまでとは異なり、膵β細胞量の減少がその主要因であることが示唆された。

生体内における膵β細胞量制御機構の解明を目指した動物モデルとしては、マウスの膵臓を 90% 以上切除した場合や、遺伝子改変動物に対してジフテリア毒素を用いて膵β細胞を特異的に破壊したものなどが用いられてきた。いずれの場合にも、膵β細胞量が減少した直後から、残存した膵β細胞が増殖を開始することが明らかとなり、膵β細胞量減少時に生じるその制御機構について多くの知見が明らかにされてきた (Nature 2004;429:41-46; Developmental cell 2007;12:817-826; J Clin Invest 2007;117:2553-2561; Diabetes 2008;57:958-966)。一方で、いずれの動物モデルも内因性膵β細胞量減少時に対する反応をみたものであり、膵β細胞量が過剰に生じた場合に働く制御機構についての報告はみられていない。

そこで申請者は、過剰な膵β細胞が体内にあった場合に内因性膵β細胞量がどのような制御機構を受けるのかを評価し、未知の膵β細胞量制御機構を解明することを目的として、新たな動物モデルを作製した。膵β細胞株である MIN6 細胞を用いて偽膵島を作製し、野生型マウスの腎被膜下に移植 (SRT; Subrenal transplantation)を行った。偽膵島は移植後、マウス体内で徐々に増殖し、SRT マウスは、約 2 週間後から進行性に血糖の低下を示した。さらに偽膵島を移植したマウスに対してグルコース負荷試験を行ったところ、グルコース負荷 10 分後に血糖値、インスリン値は共にピークを認めた。血糖値は 30 分後には負荷前の値に戻り、負荷 10 分後のインスリン値はコントロールの 40 倍程度の上昇が確認されるが、

30 分後には負荷前の値に戻っていた。したがって、このマウスモデルでは、血糖依存的に厳密にインスリン分泌が制御されていることが確認された。また、血糖値が下がり始めた時点で、このマウスの膵β細胞量は有意に減少し、アポトーシスを起こしていることが確認された。そこで、この新たな実験モデルを用いて新たな膵β細胞量制御機構を解明することを目指した。

偽膵島移植による膵β細胞量減少と血糖値との影響を明らかにするために、移植後様々な時期における SRT マウスの膵島の組織学的検討を行った。その結果、移植後約 4 週間で、重症低血糖を起こしたマウスの膵島は萎縮し、膵β細胞量が減少していることが確認された。さらに、その程度はサンプリング直前 7 日間の血糖値の合計値 (AUC_{Glc}) に比例しており、実際に膵β細胞量を示すインスリン陽性 (INS+) 細胞量と AUC_{Glc} は強い相関を示した ($n = 12, r^2 = 0.87$)。一方、血漿インスリン濃度は AUC_{Glc} 300 以下となった時点で急激に上昇することが確認された。続いて膵β細胞量減少のメカニズムを調べるために INS+細胞サイズと TUNEL 染色によるアポトーシスの評価を行ったところ、前者は AUC_{Glc} と強い相関を示す ($n = 12, r^2 = 0.91$) 一方で、後者は AUC_{Glc} が 300 以下となってから急激に TUNEL 陽性細胞率が上昇することが判明した。続いて TUNEL 陽性率が急激に上昇する AUC_{Glc} 300 以下の SRT マウスについて定量的評価を進めたところ、コントロールに比較し (コントロールマウス; $n = 5$, SRT マウス; $n = 5$)、INS+細胞量は 20%に、INS+細胞サイズは 55%に、TUNEL 陽性率は 15 倍に増加していることが判明した。これらの結果から、異所性に移植された過剰なインスリン分泌細胞は内因性膵β細胞量とその生死に大きな影響を与えることが示唆された。さらに、細胞量は血糖値と相関する一方で、細胞死は一定以下の低血糖時にみられることから、両者は異なるメカニズムにより生じると考えられた。

既報では、膵β細胞の増殖・生死には細胞外糖濃度、電気的発火、インスリンシグナルのいずれも重要であることが示されている。重症低血糖を示した SRT マウスは低血糖に暴露され、過分極の状態となり、インスリン分泌を停止していることから Auto/paracrine によるインスリンシグナルの減弱が起こっていると考えられた。これらの要因が膵β細胞死に与える影響を評価するため、低血糖 (LG: 1mM Glucose-DMEM)、過分極 (DZ: 200 μ M Diazoxide)、インスリンシグナル阻害 (HNMPA: 100 μ M HNMPA)、高濃度インスリン (HI: 1000nM Insulin)、といった各条件が、MIN6 細胞の生存に与える影響について評価した。

通常の培養条件 (25mM glucose DMEM) と比較すると、LG ではわずかながら有意に生存細胞数が減少したが (85.8 ± 21.1 [a.u. (%)], $p < 0.01$)、DZ や HI ではこれらの変化が見られなかった。一方、HNMPA は劇的に生存細胞数を減少させた ($21.7\% \pm 0.5$ [a.u. (%)], $p < 0.01$)。さらに、低血糖および HNMPA 添加時のいずれの条件においても TUNEL 陽性細胞数の増加がみられ、アポトーシスによる細胞死が生じていると考えられた。続いて低血糖及びインスリンシグナル阻害時のアポトーシスの signal pathway について考察を進めた。細胞内 ATP の需要と産生のバランスが崩れると、ER ストレスや酸化ストレスが誘発され、アポトーシスを起こすことが知られている。重症低血糖時の SRT マウスの膵β細胞においては、細胞内 ATP は減少していると考えられる。そこで低血糖時に ER ストレスにより誘導されるアポトーシスにおいて中心的な役割を担う CHOP の遺伝子発現を評価した。その結果、低血糖時には有意に CHOP の遺伝子発現上昇が確認された。一方 DZ では CHOP の発現は有意に減少し、インスリン添加では変化はみられなかった。HNMPA 添加時には、有意ではあるものの、低血糖時ほどの変化は確認されなかった。低血糖時の CHOP の遺伝子発現変化は、糖以外の重要な ATP 基質であるグルタミンを除去することで一層強い発現上昇がみられた。

低血糖時と HNMPA 添加時において、CHOP の遺伝子発現変化に差がみられたことから、両者は異なる経路を介したアポトーシスが生じている可能性を示唆する。そこで、両条件において、アポトーシスの主要なシグナル経路である Caspase 経路の活性化を評価するため、Cleaved Caspase3 をウエスタンブロッティングにより評価した。その結果、低血糖時には Cleaved Caspase3 の発現がみられたが、HNMPA 添加時には検出されなかった。従って、低血糖と HNMPA によるインスリンシグナル阻害は異なる経路を介してアポトーシスを誘導していると考えられた。

続いて、HNMPA による細胞死誘導効果に関する膵β細胞特異性を評価するために、MIN6 細胞以外の膵β細胞株である β TC や INS-1 および、他の組織の細胞株 (ミドリザル腎細胞株; COS-1 cells、マウス血管内皮細胞株; MAE cells) を用いて同様の実験を行った。その結果、 β TC や INS-1 では MIN6 と同様に有意な細胞数の減少が確認された。一方で、COS-1 や MAE では細胞死は確認されなかった。

これらの結果から、インスリンシグナルは、膵β細胞特異的に生存及びその特性の維持に対して重要な役割を担っていることが示唆された。

$AUC_{Glc} < 300$ の SRT マウス体内の膵β細胞は、インスリン分泌を停止し、膵β細胞周囲のインスリン

濃度は低下していると考えられる。その場合、SRT マウス体内の膵β細胞に対するインスリンシグナルは減弱し、細胞死が誘導された可能性がある。この仮説を証明するために、MIN6 細胞を腎被膜下の代わりに、膵臓内に直接移植 (IPT; Intra-pancreas transplantation)することで、膵β細胞周囲のインスリン濃度を上昇させ、細胞死が減少するのか評価を行った。移植した偽膵島と内因性膵β細胞を区別するために、偽膵島作製には緑色蛍光色素蛋白 (GFP)を恒常的に発現させた MIN6 細胞を用いた。

IPT マウスの膵臓内に移植された MIN6 細胞は細胞塊を形成し、継時的に増殖することが確認された。そして、増殖とともに SRT マウスと同様の血糖推移を辿り、 AUC_{Glc} と血漿インスリン濃度の関係性も同様であったことが確認できたため、SRT マウスと同様に AUC_{Glc} と膵β細胞量との関係について検討を行った。その結果、IPT においても、INS+細胞数、細胞サイズは AUC_{Glc} と強い相関を示した ($n = 12$, $r^2 = 0.86$; $r^2 = 0.86$)。しかし、TUNEL 陽性細胞率の検討結果から、 $AUC_{Glc} < 300$ の状態に至った IPT マウスは、SRT マウスに比較し、アポトーシスを起こしている INS+細胞が有意に少ないことが判明した (1.22 ± 0.16 vs 2.83 ± 0.29 (%), $p < 0.001$)。しかし同条件下においては、INS+細胞量も IPT マウスで有意に減少していた。

$AUC_{Glc} < 300$ のIPTマウスにおいて、細胞死が少ないにも関わらず、INS+細胞量も減少していた原因として、インスリン合成を停止している膵β細胞の存在が疑われた。そこで、膵β細胞特異的に赤色蛍光タンパクであるtdTomatoを発現させたマウス (*Rip-Cre(+); Rosa26-tdTomato*)を用いて運命追跡実験を行った。 $AUC_{Glc} < 300$ のSRTマウス、IPTマウスのTomato陽性細胞 (Tomato+)を観察した結果、IPTマウスでは、SRTマウスに比較し、INS-/Tomato+細胞が多く観察され、Tomato+細胞量が有意に多く残存していることが確認された。この結果は、インスリン分泌を停止している膵β細胞がIPTマウスにおいてより多く見られていることを示す。INS-/Tomato+細胞の機能的な状態を確認するために、膵β細胞の機能に重要な特異的転写因子であるMafA及びPdx1の膵島内の発現変化を免疫染色により評価した。コントロール群では、MafAはほぼ全ての膵β細胞に様に発現がみられた。しかし、SRT及びIPT両マウスでは、共にMafAの発現は著しく減少していた。Pdx1は通常の膵島では、MafAと同じく様に核内に分布し、酸化ストレスなどにより核外移行し、転写制御されていることが知られている。SRTとIPTでは共にPdx1の核外移行がみられた。従って、SRTとIPTに共通する低血糖そのものがMafA及びPdx1を介して、膵β細胞の機能を低下させたと考えられた。

最後に SRT マウスにおいてみられた $AUC_{Glc} < 300$ 時の MafA の発現低下、Pdx1 の核外移行、インスリン顆粒の合成低下といった一連の変化には可塑性があるのかを評価した。 $AUC_{Glc} < 300$ の SRT マウスに対して移植腎摘出を行うことで偽膵島を取り除いた。その結果、マウスは一時的に著しい高血糖を示したが、4 日以内に正常血糖に戻り、その状態が維持された。この経過は、膵β細胞自身が機能的に正常化していることを示唆する。そこで、移植腎摘出 4 日目の膵β細胞における、インスリン、MafA、Pdx1 の発現を評価したところ、全て正常化していることが確認された。さらにマウスの状態が安定したと考えられる腎移植摘出後 3 週間の時点で形態学的評価を行った結果、膵β細胞のサイズは元のサイズに戻り、細胞量も 2 倍に増殖していることが確認された。

本研究結果から、MIN6 細胞を用いた偽膵島移植により、内因性の膵β細胞の量及び機能は過剰なβ細胞の存在により大きく影響を受けることが明らかとなった。SRT マウスの膵β細胞では、アポトーシスが增加すると共に、膵β細胞量が減少したが、これらは異なるメカニズムによると考えられた。それは、前者は重度の低血糖時に急激に増え、後者は AUC_{Glc} と相関していたためである。

既報と同様、本研究でも低血糖により、MIN6 細胞のアポトーシスの誘導が確認され、*In vivo*においても、SRT マウスと IPT マウスの膵β細胞は重症低血糖時にアポトーシスの増加が確認された。しかし、膵臓内に偽膵島を移植した IPT マウスが、腎被膜下に移植した SRT マウスよりも、膵β細胞死が有意に少なかったことから、この違いは移植部位からの何かしらの液性因子、すなわち、インスリン、亜鉛、IAPP、GABA など、によると考えられた。HNMPA によりインスリン分泌細胞のアポトーシスが劇的に誘導されたことから、これらの中でもインスリンシグナルが重要な働きを担うと考えられた。

インスリンシグナルが膵β細胞の機能及び量に重要であることは、すでにインスリンシグナル分子、すなわちインスリン受容体、IRS-2, Akt, PDK1 あるいは mTOR、の遺伝子改変マウスモデルを用いた研究によっても示されてきている。従ってインスリンシグナルは、膵β細胞の生存と機能の維持重要であると言える。

一方で生理的環境下における膵β細胞のインスリンシグナルの重要性を明確にした研究はない。特に膵β細胞に対するインスリンの Autocrine action については、以下の 3 点から懐疑的な意見がなげかけら

れている。1) 慢性的な高濃度インスリンに膵β細胞が暴露されているとする場合、インスリン受容体はdownregulateするはずであり、IRSシグナルも低下するはずである。2) 膵β細胞から分泌されたインスリンはその微小循環の中で早急にその周囲から流れ出ていくはずである。3) インスリン以外にも膵β細胞のIRSシグナルに関わる成長因子がある。これらの点を明らかにした研究報告はみられていない。しかし、本研究結果において、IPTマウスはSRTマウスに比較し、膵β細胞のアポトーシスが減少したこと、インスリン受容体拮抗薬により、MIN6細胞死が誘導されたことから、膵β細胞自身から分泌されたインスリンがその生存において重要な役割を果たしていることが示唆された。

驚くべきことに、INS-/Tomato+の細胞、すなわち、インスリン染色陰性の膵β細胞がIPTマウスにおいて高頻度にみられ、SRTマウスにおいてはわずかであった。飢餓状態にある膵β細胞は、p38δ/PKD1シグナルを介してインスリン顆粒に対するAutophagyを起こし、細胞内エネルギー源を維持していることが知られている(*Science*. 2015;347:878-882)。PKD1は栄養素がない状態では、p38δを介して不活性化し、不活性化したPKD1はインスリン分泌を抑制する。本研究において、低血糖状態となったSRT及びIPTマウスの内因性膵β細胞では、このようなメカニズムを介してインスリン顆粒の分解が生じたと考えられる。そして、IPTマウスにおいては、膵島内に移植された偽膵島から分泌された高濃度のインスリンにより生存が可能となり、インスリン顆粒がない膵β細胞 (INS-/Tomato+)が確認されたと考えられた。

MafAとPdx1はインスリン遺伝子の発現に対してシナジー的に働き、転写制御を行っている。MafAの転写及び、Pdx1の核内局在は細胞外グルコース濃度により制御されていることが知られている。MafAの発現変化及びPdx1の局在変化はSRT、IPTマウスで同様にみられたことから、これらのマウス膵β細胞のMafAの免疫染色の減弱は低血糖によるものと考えられる。しかしながら、低血糖によるMafAの発現減弱のメカニズムについては本研究では明らかにできていない。さらにSRT及びIPTマウスの膵β細胞においてPdx1の細胞質への局在変化は、Pdx1による転写制御の減弱及び、インスリン顆粒合成の低下を示唆する。インスリン顆粒の破壊に加え、こうしたMafA及びPdx1の発現・細胞内局在変化もまたSRT及びIPTマウスにおけるインスリン染色強度の減弱に寄与しているものと考えられた。そして、偽膵島移植部位の違いにより、IPTマウスの膵島内局所のインスリン濃度はSRTマウスに比較し高くなると考えられるため、IPTマウスでより多くのINS-/Tomato+細胞がみられたと考えられた。

SRTマウスにおいて、腎皮膜下に移植した偽膵島を除去した後、4日後には血糖値は正常化した。このことは膵β細胞の機能的な回復を示唆する。MafAやPdx1の発現は正常化し、膵β細胞のサイズも元に戻ったが、INS陽性細胞量はAUC_{Glc} < 300時の2倍にとどまり、正常状態のマウスより低値であった。この原因は明らかではないが、低血糖の重症度や期間によってもRecoverする膵β細胞量は影響をうけるものと考えられる。

膵β細胞の生存について、AUC_{Glc}が300以下となった時に急激にアポトーシスの増加を認めた一方で、膵β細胞量はAUC_{Glc}と強い正の相関を示すことから、膵β細胞の生存と膵β細胞量は異なるメカニズムで制御を受けていると考えられた。インスリンシグナル阻害剤によるMIN6細胞特異的な細胞死誘導と、IPTによるアポトーシスが減少したことから、膵島局所のインスリン濃度が膵β細胞の生存に重要であることが明らかとなった。膵島局所インスリン濃度が高まることで膵β細胞の死は減少するが、引き換えに生存した膵β細胞内インスリン顆粒量は減少するものと思われた。また、SRTマウスとIPTマウス、いずれにおいても、インスリンにより厳密に制御を受ける血糖値と膵β細胞量は強い相関を示しており、膵β細胞量の制御には血糖が重要であると考えられた。

以上のことから、インスリンは膵β細胞の生存と細胞量の制御において、直接的、あるいは血糖を介して間接的に異なる役割を担うと考えられた。

これらの成果は、Original ArticleとしてMetabolism Clinical and Experimentalに受理された。