

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基板技術」
平成 19 年度採択研究代表者

清野 進

神戸大学大学院医学研究科・教授

糖代謝恒常性を維持する細胞機能の制御機構

1. 研究実施の概要

糖代謝は生命活動において極めて本質的で根源的な生体反応である。膵臓に存在するランゲルハンス島（膵島）は血糖調節の中心的役割を果たしている。血糖を降下させるインスリンを分泌する β 細胞を含む 4 種類の内分泌細胞から構成される膵島は、異なる細胞が集合しただけの単なる細胞集団ではなく、糖代謝恒常性を維持する高次に機能統合されたシステムである。しかしながらこれまでの研究は、個々の細胞における個々の機能分子に着目した還元主義的なアプローチが主流であり、高次機能体としての膵島を解明するには至っていない。様々な代謝状態により制御される膵島機能をより高次のレベルで統合的に解明するためには、メタボローム解析を取り入れた包括的研究が不可欠である。本研究では、1) 膵島機能の制御機構の解明、2) 膵島細胞の再生制御機構の解明、3) 代謝異常と膵島機能異常との関係の解明の 3 つの課題に取り組む。本年度は、年次計画に掲げた、膵 β 細胞株における比較メタボローム解析、2 光子励起レーザー顕微鏡 (TPLSM) を用いた膵島細胞の機能および再生機能の解析、ならびに、*in vitro* で代謝異常を再現した条件での比較メタボローム解析をはじめとして、膵島機能・再生の制御機構に関わる新たな知見を得ることができた。

2. 研究実施内容 (文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

1. 膵島機能の制御機構の解明

膵 β 細胞においてインスリン分泌を惹起あるいは修飾する代謝シグナルとして ATP, cAMP, Ca^{2+} が重要である。我々はそれら代謝シグナルのセンサー分子や制御分子の機能解析を進めており、これまでに、cAMP-GEFII (Epac2) が膵 β 細胞における cAMP センサーとして、Protein kinase A (PKA) に依存しないメカニズムで、インスリン分泌をはじめとする細胞機能に関与することを報告してきた。今回、Epac2 の FRET プローブを用いることによって、糖尿病治療薬として広く使用されているスルホニル尿素 (SU) 薬が Epac2 に直接結合してインスリン分泌に関与することを偶然に発見した (論文投稿中)。SU 薬は元

来、ATP センサーである ATP 感受性カリウムチャネルに結合して、インスリン分泌を促進することが知られている。今回の発見は、cAMP と ATP という 2 つの代謝シグナルのクロストークのメカニズムを解明する糸口となる可能性がある。また、Epac2 の N 末端領域に存在する cAMP 結合ドメインを欠いたスプライスバリエント Epac2B を発見し（従って、従来の Epac2 を Epac2A と呼ぶ）、Epac2A は N 末端領域を介して細胞膜に局在することでインスリン分泌を制御することが明らかになった⁴⁾。さらに、低分子量 G タンパク質 Rab11 とその標的分子 Rip11 がインスリン分泌制御に関与することを明らかにした。特に Rip11 は PKA によってリン酸化され、cAMP によるインスリン分泌増強機構を PKA 依存性に制御すること示唆した⁵⁾。

また我々は、膵β細胞において Epac2A に結合する分子として Rim2 を同定している。Rim2 欠損マウスでは、インスリン分泌低下に基づく耐糖能障害が認められた。そこで、Rim2 によるインスリン分泌制御機構の詳細を解析するため、このマウスとインスリンプロモーター下流に SV40T 抗原を発現するトランスジェニックマウス (IT6 マウス) を交配して膵β細胞腫瘍を形成させ、Rim2 欠損膵β細胞株を樹立した。Rim2 欠損膵β細胞株ではインスリン分泌顆粒の動態が異常を呈し、グルコース応答性インスリン分泌反応が著しく減弱していたことから、Rim2 は代謝シグナルによって惹起されるインスリン分泌において重要な役割を演じていることが明らかとなった。さらに、消化管内分泌ホルモンインクレチンを分泌する細胞の発生と分化について検討した結果、マウス胎生 14 日目の消化管上皮において、インクレチン分泌細胞の集団 (2~6 個の細胞集団) が存在することが明らかになった。

インスリン分泌に重要な ATP 感受性 K⁺チャネル (K_{ATP} チャネル) の構成分子である Kir6.2 を欠損したマウスの膵灌流実験により、K_{ATP} チャネルの閉鎖によらない cAMP 誘導性のグルコース応答性インスリン分泌機構が存在することを解明した⁶⁾。詳細な解析から、cAMP により誘導されるグルコース応答性には、ニフルム酸感受性チャネルが必要であることが明かとなり、またニフルム酸感受性チャネルは、グルコース濃度の僅かな増加によるインスリン分泌応答に対して、重要な役割を担うことが示された。

一方、膵島細胞の比較メタボローム解析に関しては、そのツールとして利用するため、グルコース応答性、インクレチン (cAMP シグナル) 応答性のインスリン分泌反応を指標にして 4 種のマウス膵β細胞株を樹立した。すなわち、グルコース、インクレチンともに良好な応答性を示す細胞株 (K8)、グルコース応答性は認められるがインクレチンに反応しない細胞株 (K20)、グルコース応答性は認められないがインクレチンには反応する細胞株 (K113)、グルコース、インクレチンいずれにも反応しない細胞株 (K13) である。これらの細胞株ではいずれも、人工的に 3 次元の偽膵島を形成させるとインクレチンによるインスリン分泌の増強反応が亢進した。このことは、膵β細胞の 3 次元構築によって cAMP シグナルが増強されたことを意味する。実際に cAMP 産生量は 3 次元の方が多く、cAMP の下流シグナルも亢進していることが判明した。さらに、GC/TOF-MS を用いて 2 次元培養の細胞と 3 次元培養の細胞との比較メタボローム解析の予備実験を行ったところ、3 次元培養によって、解糖系、クエン酸回路、アミノ酸代謝系の多くの代謝物の量が増加することを見出した。今後は、水溶性低分子代謝物の検出能力の高い CE/TOF-MS を用い、インスリ

ン分泌制御に関わる代謝シグナルの解析を進める。

2. 膵島細胞の再生制御機構の解明

我々はこれまでに膵腺房細胞が *in vitro* でインスリン分泌細胞へ分化転換できることを報告しているが、その詳しいメカニズムは不明であった。今回、膵腺房細胞がインスリン分泌細胞に分化転換する際には PI3 キナーゼの活性化が必須であり、その阻害によって脱分化状態が誘導・維持できることを見出した。また、細胞の単離操作によるカドヘリン依存性細胞接着の破壊と再構成が膵腺房細胞の分化転換を惹起すること、PI3 キナーゼは E-カドヘリンと β カテニンの安定性に関与して細胞間接着を制御していることを発見した^{1,2)}。これは、細胞接着と分化転換の関係を初めて直接的に示した研究となった。

また我々は、膵 β 細胞 ATP 感受性カリウムチャネルのチャネルサブユニットである Kir6.2 のドミナントネガティブ変異体トランスジェニックマウスにおいて、膵 β 細胞が自然に再生し、膵島内に出現する DBA (レクチンの一種) 結合性細胞が前駆細胞として機能する可能性を見出している。今回、DBA 結合性細胞を単離・培養することに成功し、純化した DBA 結合性細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、DBA 結合性細胞は膵臓の発生段階で認められる転写因子を強発現するなど、に未分化な膵臓の細胞の特性を有することが実証された。

さらに、膵 β 細胞を選択的に標識した遺伝子操作マウス (MIP-GFP/CAG-mRFP マウス) を用いて、*in vivo* で膵 β 細胞を 2 光子励起レーザー顕微鏡 (TPLSM) により追跡観察した。まず正常分化過程の解析を目的として、新生仔期の膵臓を継続的に観察したところ、GFP 陽性細胞 (インスリンプロモーターが活性化している細胞) は膵島、膵導管部分、腺房領域など様々な部位から出現すること、インスリン染色と GFP 陽性細胞が一致しないことがあること、GFP 陽性だった細胞が GFP を失う場合があることなどが明らかとなった。つまり、正常分化の過程で膵 β 細胞は予想以上にダイナミックに変化しているものと考えられた。

3. 代謝異常と膵島機能異常との関係の解明

我々は膵 β 細胞代謝-分泌関連メカニズムとその異常に関して継続的に研究を続けてきた。今回、膵 β 細胞 Na^+/K^+ ATPase 抑制による、インスリン分泌抑制機序を検討した。その結果、 Na^+/K^+ ATPase 抑制薬ウアバインによる Na^+/K^+ ATPase 抑制は、非受容体型チロシンキナーゼ Src を活性化し、内因性 ROS 産生を増強することにより、ミトコンドリア TCA 回路の抑制および ATP 産生障害をきたし、結果的に高濃度グルコース刺激下でのインスリン分泌障害を惹起することを明らかにした³⁾。さらに 2 型糖尿病モデル動物 Goto-Kakizaki (GK) ラットを用いた検討により、糖尿病状態の膵島では、内因性 Src 活性化および ROS 産生増強が起こっており、それによりグルコースによる ATP 産生障害およびインスリン分泌障害が生じることを明らかにした。本成果は β 細胞代謝-分泌関連障害における Src 活性化を介した ROS 産生機構の重要性を示している³⁾。

また、我々は生命維持システムの基本となる糖代謝制御機構やその破綻による病態の解明に関連して、新たな代謝調節のメカニズムを検討する目的で、東京大学大学院田口良教授との共同研究により膵島のリン脂質解析を行った。コラゲナーゼ法および Ficoll-Conrey 密度勾配遠心

法により、野生型および疾患(肥満・糖尿病)モデル動物(ラット・マウス)から単離した膵島よりリン脂質含有分画を固相抽出した後、抽出産物を用いて LC/MS/MS により含有全リン脂質解析を行った。具体的には、通常食下での野生型ラットと疾患モデルラットとの比較とともに、摂餌内容(通常食、高脂肪食)の違いによる膵島含有リン脂質の変化も検討した。まず、膵島を用いた脂質解析が可能か否かを検討し、単離膵島を用いて LC/MS/MS を使用することでリン脂質の網羅的解析が可能であることを確認した。次に単離膵島を用いたリン脂質含有分画抽出条件を検討し、ラットでは 1 匹分、マウスでは 3 匹分の膵島量で全リン脂質の解析可能となる条件を同定した。また野生型ラットおよびマウス膵島細胞は他の組織と異なり、特徴的な含有リン脂質組成を認めた。すなわち、ラット・マウスとも他の組織に比し n-6 の 20:4 アラキドン酸が膜リン脂質に多く特にホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンにその傾向が認められた。野生型(C57BL6)と過食を伴う肥満・糖尿病モデル動物 KK-Ay に対して普通食と高脂肪食をそれぞれ 4 週間投与したもののから単離した膵島組織での解析では、野生型においても肥満糖尿病モデル動物においても摂餌内容(餌組成)の違いにより膵島含有リン脂質組成に違いが生じることが判明した。すなわち、高脂肪食で n-3 系である 22:6(DHA)の増加が認められ、普通食では相対的に n-6 系の 18:2(リノール酸)の増加が認められた。後者の解析で高脂肪食には 22:6、普通食に 18:2 が多く存在することが判明した。また、KK-Ay では、高脂肪食摂餌下において、膵島リン脂質により大きな変化が生じ、投与期間を 8 週間に延長したものでその変化がより大きくなる傾向を認めた。

3. 研究実施体制

①研究分担グループ長： 清野 進(神戸大学、教授)

②研究項目

研究の総括

メタボローム解析

膵島細胞機能の解析

膵島細胞維持機構の解析

(2)溝口グループ

①研究分担グループ長： 溝口 明(三重大学、教授)

②研究項目

膵島細胞の形態学的解析

膵島細胞機能の形態学的解析

(3)稲垣グループ

①研究分担グループ長： 稲垣 暢也(京都大学、教授)

②研究項目

膵島の代謝測定

膵島の機能解析

(4) 清水グループ

①研究分担グループ長： 清水 謙多郎(東京大学、教授)

②研究項目

メタボローム解析におけるインフォマティクス支援

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Minami K, Seino S. Pancreatic acinar-to-beta cell transdifferentiation in vitro. *Front Biosci* 13:5824-5837, 2008
2. Minami K, Okano H, Okumachi A, Seino S. Role of cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic exocrine-to-endocrine transdifferentiation. *J Biol Chem* 283:13753-13761, 2008
3. Kominato R, Fujimoto S, Mukai E, Nakamura Y, Nabe K, Shimodahira M, Nishi Y, Funakoshi S, Seino Y, Inagaki N. Src activation generates reactive oxygen species and impairs metabolism-secretion coupling in diabetic Goto-Kakizaki and ouabain-treated rat pancreatic islets. *Diabetologia* 51:1226-1235, 2008
4. Niimura M, Miki T, Shibasaki T, Fujimoto W, Iwanaga T, Seino S. Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J Cell Physiol* 219:652-658, 2009
5. Sugawara K, Shibasaki T, Mizoguchi A, Saito T, Seino S. Rab11 and its effector Rip11 participate in regulation of Insulin granule exocytosis. *Genes to Cells* 14:445-465, 2009
6. Fujimoto W, Miki T, Ogura T, Zhang M, Seino Y, Satin LS, Nakaya H, Seino S. Niflumic acid-sensitive ion channels play an important role in the induction of glucose-stimulated insulin secretion by cyclic AMP in mice. *Diabetologia* in press.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)