

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

本研究では、様々な代謝条件下で膵島の包括的代謝物解析を行い、膵島機能制御や、膵島機能維持に極めて重要な膵島細胞の再生に関わる代謝シグナルを明らかにするとともに、それらのシグナルを制御する鍵分子を同定し、種々のモデル系を利用して代謝シグナル間の相互作用と膵島機能や膵島細胞再生との関係、また、代謝シグナルによる細胞間の相互作用と膵島機能との関係を明らかにすることを目的としている。これまでに、新たに樹立した膵β細胞株を用いたメタボローム解析から、cAMP シグナルによるグルコース応答性インスリン分泌の増強にはリンゴ酸・アスパラギン酸シャトルが必須であること、並びに細胞間相互作用が cAMP シグナルを増強することを発見した。また、cAMP センサーである Epac2 が糖尿病治療薬のスルホニル尿素薬によって直接活性化されることや、Epac2 と結合する Rim2α がインスリン顆粒の開口放出において重要な役割を果たすと同時に Epac2 を介したインスリン分泌の増強に必須であることを示した。さらに、病態モデル動物のサンプルを用いたメタボローム解析から、膵島のリン脂質組成が他の組織とは異なること、および、食餌成分によってその組成が変化することを見出した。また、ヒトにおける糖負荷試験後の血清サンプルのメタボローム解析によって得られたデータの主成分分析から正常、境界型、糖尿病が分離できる可能性が示された。

§ 2. 研究実施体制

(1)「清野」グループ

① 研究分担グループ長: 清野 進(神戸大学大学院医学研究科、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 (三重大学大学院医学系研究科、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

(2)「稲垣」グループ

① 研究分担グループ長: 稲垣 暢也 (京都大学大学院医学研究科、教授)

② 研究項目

- ・ 膵島の代謝測定
- ・ 膵島の機能解析

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

1. 膵島機能の制御機構の解明

前年度までにインクレチン応答性の膵β細胞株(K8)とインクレチン不応性の膵β細胞株(K20)を樹立し、3次元構造(偽膵島)の形成によってK20細胞でもインクレチンによるインスリン分泌の増強反応が認められるようになることを見出していた¹⁾。今年度は、単層培養と3次元の偽膵島の2つの状態における細胞内Ca²⁺応答性の違いを2光子レーザー顕微鏡を用いてリアルタイムで解析した。単層培養細胞では、高グルコース刺激前後でCa²⁺応答性に大きな変化が見られなかったのに対し、偽膵島では高グルコース刺激後2分で細胞内Ca²⁺濃度が上昇した細胞が増え始め、刺激後15分では多くの細胞で細胞内Ca²⁺濃度が上昇した。β細胞の3次元化により、高グルコース刺激に対する細胞内Ca²⁺応答性が格段に向上することが示唆された。さらに、これらの細胞株間での包括的比較メタボローム解析をCE/MSを用いて行った。その結果、インクレチン(cAMPシグナル)応答性のK8細胞株ではグルコース代謝に関わる多くの中間代謝物が増加していたが、特にNADH産生に関わる代謝経路が亢進している可能性を見出した。このうち、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルに着目し、このシャトルの阻害薬(aminooxyacetate: AOA)を添加すると、グルコースによるインスリン分泌には全く影響しないが、インクレチンによる増強反応がほぼ完全に抑制されることを発見した。この現象は正常膵島を用いても同様に認められることから、インクレチン(cAMPシグナル)が生理的にリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルを介してグルコース代謝と相互作用し、インスリン分泌の増強効果を発揮していることが示された。また、膵β細胞のcAMPセンサーとして機能するEpac2に結合するRim2αの機能解析を実施した。Rim2αのノックアウトマウスではインスリン分泌不全に伴う耐糖能異常が認められ、

Rim2 α ノックアウトマウスから単離した膵 β 細胞ではドッキングしたインスリン顆粒数が減少していることを見出した。Rim2 α 欠損膵 β 細胞株を作製し、各種 Rim2 α 変異体を用いてさらに詳細な検討を行ったところ、Rim2 α と Rab3 との相互作用がインスリン顆粒のドッキングに必要であることが明らかとなると同時に、ドッキングはインスリン顆粒の細胞膜への膜融合を抑制するブレーキの役割を果たすと考えられた。一方、Rim2 α と Munc13-1 との相互作用はインスリン顆粒のプライミングに必要であることが示された。さらに、Epac2 と Rim2 α の相互作用は Epac2 を介したインスリン分泌の増強に必須であることも明らかとなった³⁾。また、膵 α 細胞において、GLP-1 刺激によって産生された低濃度の cAMP は PKA 依存性に電位依存性 Ca²⁺チャネル活性を阻害することでグルカゴン分泌を抑制するのに対し、アドレナリン刺激によって産生された高濃度の cAMP は Epac2 を介して電位依存性 Ca²⁺チャネルを活性化することでグルカゴン分泌を促進することが明らかになった²⁾。

2. 膵島細胞の再生制御機構の解明

膵 β 細胞の分化・発生・再生に関わる運命を追跡するため、また、その過程での細胞の分取を可能にしてメタボローム解析を含む様々な解析に利用するため、膵 β 細胞を選択的に標識するシステムを2系統開発した。ひとつは、インスリンプロモーターにより緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するMIP-GFPマウスと全ての細胞で赤色蛍光タンパク質(RFP)を発現するCAG-mRFPマウスを交配したMIP-GFP/CAG-mRFPマウスであり、これを用いて、成体膵 β 細胞をin vitroで胎児の膵細胞と共培養すると、一旦脱分化して増殖し、培養条件によって再びインスリンを発現する細胞(β 細胞)へ再分化できることを証明した⁴⁾。脱分化、増殖、再分化の各段階で細胞をソーティングすれば原理的にはメタボローム解析も可能である。また、もうひとつのシステムは任意のタイミングで膵 β 細胞を標識できるIns2-CreER/R26R-YFPマウスである。本マウスにおいてタモキシフェン投与により約30%の膵 β 細胞が標識され、生理的条件下で標識後12カ月まで観察したところ、膵 β 細胞の標識率に有意な変化は認められなかった。また、STZ投与による膵 β 細胞傷害時においても標識率は変化せず、これらの条件下では膵 β 細胞の維持における非 β 細胞の寄与はほとんどないものと考えられた。一方、出生直後から2週間では膵 β 細胞の標識率に有意な変化はなかったが、4週目の標識率は有意に低下した⁸⁾。また、このとき、YFPで標識されない数個から数十個のインスリン陽性細胞のクラスターが散見された。これらの結果は、出生直後の β 細胞の増加には、既存の β 細胞の自己複製だけでなく非 β 細胞からの新生も寄与する可能性を示している。さらに、ヒト膵外分泌細胞からインスリン分泌細胞が誘導できることを示した⁷⁾。

3. 代謝異常と膵島機能異常との関係の解明

糖尿病状態における膵島機能障害の機序について、活性酸素種産生機構の過剰作用による代謝破綻の重要性⁶⁾、糖尿病状態で過剰発現する核内蛋白によるミトコンドリア機能制御の破綻の重要性⁵⁾について明らかにしてきた。これらの膵 β 細胞機能障害機構は糖尿病状態に特有の代謝異常により惹起されると考えられるが、具体的にどのような代謝メディエーター、代謝経路が

重要であるかは明らかになっていない。また糖尿病の成因としては遺伝因子のみならず環境因子が重要であり、環境因子の一つとして飽和脂肪酸の過剰摂取が糖尿病発症に重要な因子であることが疫学的にも示されている。糖尿病における膵島機能異常において重要な役割を果たす代謝異常の詳細を明らかにする目的で、糖尿病モデル動物を用いて、摂餌条件を含む様々な条件下で質量分析器を用いた脂質メタボローム解析および膵島機能解析を行った。

昨年度までの解析で代謝に関与する組織におけるリン脂質組成は摂取する飼料の組成により変化することを明らかにした。今年度は各臓器レベルでその組成変化がどのような影響をもたらすのか、野生型ラットとGKラットを用いて検討した。精製飼料投与下にEPAを2週間投与した後に膵島組織を単離し、グルコースによる刺激に対する反応性を比較した。その結果、野生型ラットではEPA投与群と非投与群においてインスリン分泌に明らかな差が認められなかったが、GKラットではEPA投与群から単離した膵島組織の方がグルコースによるインスリン分泌が増強していた。これらの結果より脂肪毒性によるインスリン分泌障害に着目し、野生型ラットより単離した膵島を飽和脂肪酸であるパルミチン酸に曝露することにより、インスリン分泌障害モデルを作成して、膵島におけるEPAのインスリン分泌に対する影響を検討した。パルミチン酸を曝露しない単離膵島においてはEPA曝露により、グルコースによるインスリン分泌は変化しなかった。しかし、パルミチン酸を曝露した膵島において著明に低下していたインスリン分泌は、EPA曝露により回復した。これらの結果は、インスリン分泌障害において重要な役割を果たす脂質メディエーター、脂質代謝経路のメタボロームを用いた検索の良いモデルとなりうると考え、さらなる解析を予定している。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Iwasaki M, Minami K, Shibasaki T, Miki T, Miyazaki J-I, Seino S. Establishment of new clonal pancreatic β -cell lines (MIN6-K) useful for study of incretin/cAMP signaling. *J Diabetes Invest* 1:137-142, 2010. (DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00026.x)
2. De Marinis YZ, Salehi A, Ward CE, Zhang Q, Abdulkader F, Bengtsson M, Braha O, Braun M, Ramracheya R, Amisten S, Habib AM, Moritoh Y, Zhang E, Reimann F, Rosengren AH, Shibasaki T, Gribble F, Renström E, Seino S, Eliasson L, Rorsman P. GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca^{2+} channel-dependent exocytosis. *Cell Metab* 11:543-553, 2010. (DOI: 10.1016/j.cmet.2010.04.007)
3. Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, Takahashi H, Mizoguchi A, Uriu Y, Mori Y, Miyazaki J-i, Miki T, Seino S. Rim2 α determines docking and priming states in insulin granule exocytosis. *Cell Metab* 12:117-129, 2010. (DOI: 10.1016/j.cmet.2010.05.017)
4. Minami K, Miyawaki K, Hara M, Yamada S, Seino S. Tracing phenotypic reversibility of pancreatic β -cells *in vitro*. *J Diabetes Invest* 1:242-251, 2010. (DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.0051.x)
5. Yoshihara E, Fujimoto S, Inagaki N, Okawa K, Masaki S, Yodoi J, Masutani H. Disruption of TBP-2/Txnip ameliorates insulin sensitivity and secretion without affecting obesity. *Nature Communications* 1:127, 2010. (DOI: 10.1038/ncomms1127)
6. Mukai E, Fujimoto S, Sato H, Oneyama C, Kominato R, Sato Y, Sasaki M, Nishi Y, Okada M, Inagaki N. Exendin-4 suppresses Src activation and reactive oxygen species production in diabetic GK rat islets in an Epac-dependent manner. *Diabetes* 60:218-226, 2011. (DOI: 10.2337/db10-0021)
7. Minami K, Doi R, Kawaguchi Y, Nukaya D, Hagiwara Y, Noguchi H, Matsumoto S, Seino S. In vitro generation of insulin-secreting cells from human pancreatic exocrine cells. *J Diabetes Invest* in press (DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00095.x)
8. Nakamura K, Minami K, Tamura K, Iemoto K, Miki T, Seino S. Tracing pancreatic β -cells by inducible Cre/loxP system. *Biomed Res* in press DOI 未定

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)