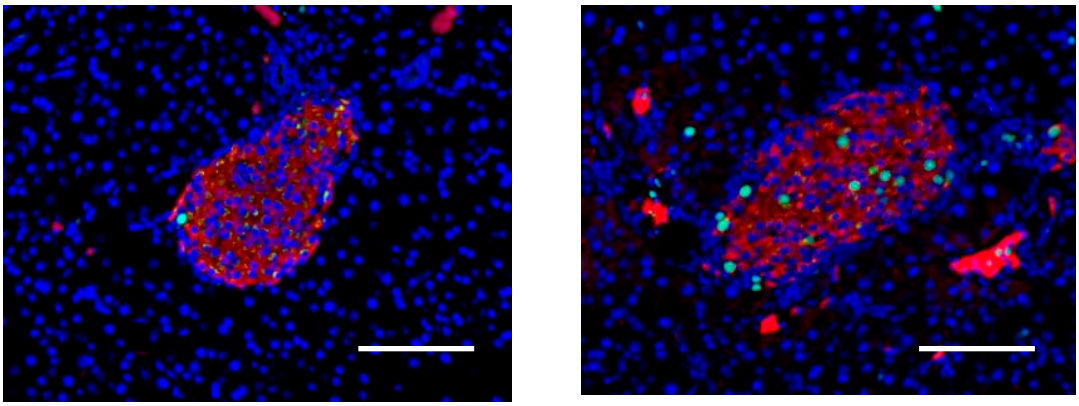
103　エクソソームmiRNAが膵β細胞増殖に及ぼす影響の解明	山田　哲也

【目的】糖尿病における膵β細胞の機能や増殖に及ぼす細胞/臓器連関の分子メカニズムは、ホルモンやアディポカインなどの液性因子や神経ネットワークを中心に様々な研究がなされているが、未だ不明な点が多い。例えば肥満によって肝臓にインスリン抵抗性が生じると膵β細胞の増殖が促進されることや、脂肪組織特異的にIR（Insulin receptor）を後天的にノックアウトしたマウスで、膵臓のβ細胞の増殖が見られたことが報告されているが、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。これらは膵β細胞の増殖促進メカニズムとして、細胞/臓器連関が重要な役割を果たしていることを示唆する。近年、様々な細胞から分泌されたエクソソームが生体内を循環し、他の細胞/臓器にエクソソーム miRNA を受け渡すことで、エクソソームが細胞/臓器連関の担い手として働くことが示された。これらの知見から、我々は生体内を循環するエクソソーム miRNA が膵β細胞増殖に与える影響を検討することとした。肥満や脂肪組織特異的に *IR* をノックアウトしたマウスの血清中エクソソーム miRNA を網羅的に解析し、これらの環境で変化した miRNA を個別に検討し、膵β細胞の増殖を促すエクソソーム miRNA の候補を探索する。本研究の成果は糖尿病の新たな治療法開発につながる可能性も想定され、大変意義深いと考えられる。

【方法】1. タモキシフェン誘導性脂肪組織特異的 *IR* ノックアウトマウスを作製した。2. *IR* ノックアウトマウスにおいて、耐糖能を評価した。3. 脂肪組織特異的 *IR* ノックアウトマウスの膵β細胞の Ki67 陽性率を測定した。4. 脂肪組織特異的 *IR* ノックアウトマウスの血清中エクソソーム miRNA を抽出し、次世代シークエンサー解析を行った。5. 高脂肪食負荷マウスと通常食マウスの血清中エクソソーム miRNA を抽出し、通常食に比して高脂肪食負荷により増えるエクソソーム miRNA の網羅的解析を次世代シークエンサーで行った。

【結果】タモキシフェン誘導性に *IR* をノックアウトするマウスモデルを作製した。*IR* ノックアウトマウスにおいて、膵β細胞の Ki67 陽性細胞数が増加し、膵β細胞の増殖促進が確認できた。これらのマウスの血清中エクソソーム miRNA を抽出し、コントロールに比して増加しているエクソソーム miRNA を探索する予定である。さらに高脂肪食負荷によって増える miRNA を 54 個抽出した。これらから、インスリン作用の減弱した脂肪細胞に由来するエクソソーム miRNA を絞り込み、膵β細胞の増殖に関係しうる miRNA を同定する予定である。

IR ノックアウトマウスにおいて、膵β細胞の Ki7 陽性率の上昇がみられた



103. エクソソーム miRNA が膵β細胞増殖に及ぼす影響の解明

山田　哲也

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子内分泌代謝学分野

Key words：エクソソーム miRNA，膵β細胞，糖尿病，細胞/臓器連関，脂肪細胞

緒　言

糖尿病における膵β細胞の機能や増殖に及ぼす細胞/臓器連関の分子メカニズムは、ホルモンやアディポカインなどの液性因子や神経ネットワークを中心に様々な研究がなされているが、未だ不明な点が多い。例えば肥満によって肝臓にインスリン抵抗性が生じると膵β細胞の増殖が促進されることや、脂肪組織特異的に IR（Insulin receptor）を後天的にノックアウトしたマウスで、膵臓のβ細胞の増殖が見られたことが報告されているが［1］、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。

一方で近年、エクソソーム内に機能性 miRNA が内包されていること（以下エクソソーム miRNA）や、様々な細胞から分泌されたエクソソームが生体内を循環し、他の細胞／臓器にエクソソーム miRNA を受け渡すことで、エクソソームが細胞/臓器連関の担い手として働くことが示された［2］。研究代表者らは、骨髄移植という非生理的な条件下ではあるが、骨髄細胞が放出するエクソソーム miRNA が膵β細胞の増殖を促すことを発見した［3］。

脂肪細胞は生体内を循環する miRNA の主要な分泌源であり、脂肪細胞から放出されたエクソソーム miRNA が肝臓に取り込まれ、遺伝子発現を調節していることが示されている［4］。これらの知見から、本研究では肥満や後天的に脂肪細胞特異的に *IR* をノックアウトして脂肪組織に変化を与えることで、脂肪組織から放出されうるエクソソーム miRNA が膵β細胞増殖に与える影響を検討することとした。血清中エクソソーム miRNA を網羅的に解析し、これらの環境で変化した miRNA を個別に検討し、膵β細胞の増殖を促すエクソソーム miRNA の候補を探索する。本研究の成果は糖尿病の新たな治療法開発につながる可能性も想定され、大変意義深いと考えられる。

方　法

1.　タモキシフェン誘導性脂肪組織特異的 *IR* ノックアウトマウスの作製

アディポネクチンプロモーター制御下にタモキシフェン誘導性に Cre リコンビナーゼを活性化するマウス（以下 Cre/＋）と、IR flox/flox（以下 IR f/f）マウスを交配し、タモキシフェン誘導性脂肪組織特異的 *IR* ノックアウトマウス（以下 Cre/＋；IR f/f）を作製した。また、コントロールとして Cre リコンビナーゼを発現していない IR f/f マウス（以下+/＋；IR f/f）を作製した。

2.　予備実験：Cre/＋；IR f/f マウスと+/＋；IR f/f マウスへのタモキシフェン投与

明暗周期 12 時間、通常食で飼育した 7 週齢の雄マウス Cre/＋；IR f/f マウス（N = 1）と+/＋；IR f/f（N = 1）にそれぞれタモキシフェン 100 mg/kg を 5 日間連続投与した。5 日間連続投与終了後 3 日目に血糖測定を行った後マウスを安楽死させ、Cre/＋；IR f/f マウスと+/＋；IR f/f マウスそれぞれから eWAT（Epididymal White Adipose Tissue）、iWAT（Inguinal White Adipose Tissue）、BAT（Brown Adipose Tissue）、膵臓、肝臓、血清を採取した。

3.　血清インスリン濃度測定

モリナガ社のマウスインスリン測定キットを用いて手順書通りに血清中のインスリン濃度を測定した。

4. 定量的 PCR

eWAT、iWAT、BAT の各脂肪組織を破砕し、QIAGEN 社の miRNeasy Mini Kit を用いて手順書通りにそれぞれの RNA を抽出した。cDNA を合成し、SYBR green 法で定量的 PCR を行った後、ΔCT 法で IR の mRNA 発現量を解析した。

5. 膵臓の蛍光免疫染色

摘出した膵臓をパラフィン包埋したプレパラートを作製した。脱パラフィン化後、抗原賦活化処理を行い、ブロッキング後に抗インスリン抗体と抗 Ki67 抗体を混合して一晩反応させた。翌日 Alexa 568、Alexa 488 で標識した二次抗体と反応させ、DAPI 染色を行った。インスリン陽性細胞のうち、Ki67 陽性細胞率を Image J を用いて計測した。

6. Cre/＋；IR f/f マウスと＋/＋；IR f/f マウスへのタモキシフェン投与

明暗周期 12 時間、通常食で飼育した 7 週齢の雄マウス Cre/＋；IR f/f マウス（N=7）と＋/＋；IR f/f（N=7）にそれぞれタモキシフェン 100 mg/kg を 5 日間連続投与した。5 日間連続投与終了後 3 日目に血糖測定を行った後マウスを安楽死させ、Cre/＋；IR f/f マウスと＋/＋；IR f/f マウスそれぞれから eWAT、iWAT、BAT、膵臓、肝臓、血清を採取した。また、タモキシフェン投与開始日から連日血糖測定を行った。

7. 血清中エクソソーム miRNA と eWAT miRNA の次世代シーケンサー解析

Cre/＋；IR f/f マウスと＋/＋；IR f/f 雄マウスそれぞれ 7 匹から、1 匹あたり 110μL の血清をプールし、Cre/＋；IR f/f マウスと＋/＋；IR f/f マウスの血清サンプルを 770μL ずつ得た。QIAGEN 社の miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit で Exosome を血清から分離した後、miRNeasy Micro Kit を用いて手順書通りに血清中エクソソーム RNA を抽出した。また、eWAT から抽出した RNA を各個体から等濃度でプールし、Cre/＋；IR f/f マウスと＋/＋；IR f/f マウスの eWAT RNA サンプルを作製した。これら 4 サンプルの miRNA 発現を QIAseq miRNA-Seq により網羅的に測定しており、詳細な解析を進める。

8. 高脂肪食負荷マウスと通常食マウスの血清中エクソソーム miRNA の次世代シーケンサー解析

明暗周期 12 時間、通常食で飼育した 8 週齢の C57 BL/6J 雄マウスを、8 週間高脂肪食（N = 10）または通常食（N = 10）を負荷する群と 16 週間高脂肪食（N = 10）または通常食（N = 10）を負荷する群に分けた。8 週間または 16 週間負荷した後マウスを安楽死させ、血清サンプルを採取した。それぞれの群 10 匹から、1 匹あたり 100μL の血清サンプルをプールし、6 と同様の方法でエクソソーム miRNA を抽出した。これら 4 サンプルの miRNA 発現を QIAseq miRNA-Seq により網羅的に測定し詳細な解析を行った。

9. 統計学的解析

統計学的な有意差検定は、スチューデントの t 検定で行った。$P < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

結　果

1. 予備実験：タモキシフェン誘導性脂肪組織特異的に IR をノックアウトした

eWAT、iWAT、BAT のそれぞれにおいて、＋/＋；IR f/f マウスに比して Cre/＋；IR f/f マウス群で IR の mRNA 発現量が低下していることを確認した（eWAT：50.4%、iWAT：34.0%、BAT：20.5%）。

2. 予備実験：IR ノックアウトマウスにおいて耐糖能は低下した

＋/＋；IR f/f マウスに比して Cre/＋；IR f/f マウス群で血糖値上昇（144 vs 223 mg/dL）、インスリン濃度上昇（1.34 vs 2.84μU/mL）、HOMA-IR の上昇（0.48 vs 1.56）が見られ、耐糖能の低下が示唆された。

3. 予備実験：Cre/＋；IR f/f において膵β細胞の Ki67 陽性率上昇が見られた

＋/＋；IR f/f マウスに比して Cre/＋；IR f/f マウス群で膵β細胞の Ki67 陽性率が増加（0.48 vs 3.7%）した（図 1）。

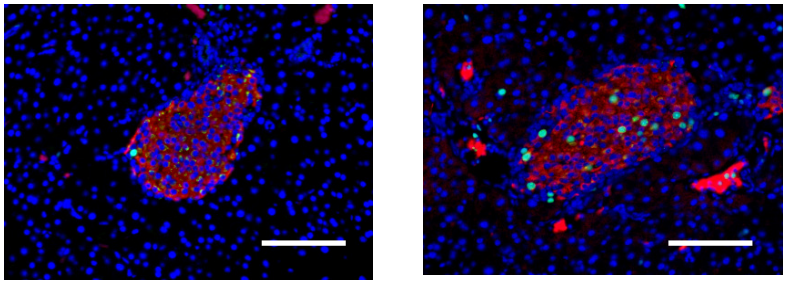


図 1. Cre/＋；IR f/f 群で膵β細胞の Ki67 陽性率の上昇

左：＋/＋；IR f/f の膵臓蛍光免疫組織染色。

右：Cre/＋；IR f/f の膵臓蛍光免疫組織染色。

Cre/＋；IR f/f で Ki67 陽性細胞が増加していた。

（赤：インスリン、緑：Ki67、青：DAPI、スケールバー：100μm）

4. タモキシフェン誘導性脂肪組織特異的に *IR* をノックアウトした

結果 1～3 の少数サンプルでの検討で得た知見をもとに、サンプル数を 7 匹に増やして IR の mRNA 発現量解析を行った。eWAT、iWAT、BAT いずれの群においても Cre/＋；IR f/f マウス群で IR の mRNA 発現量は有意に低下（図 2a～c）した。

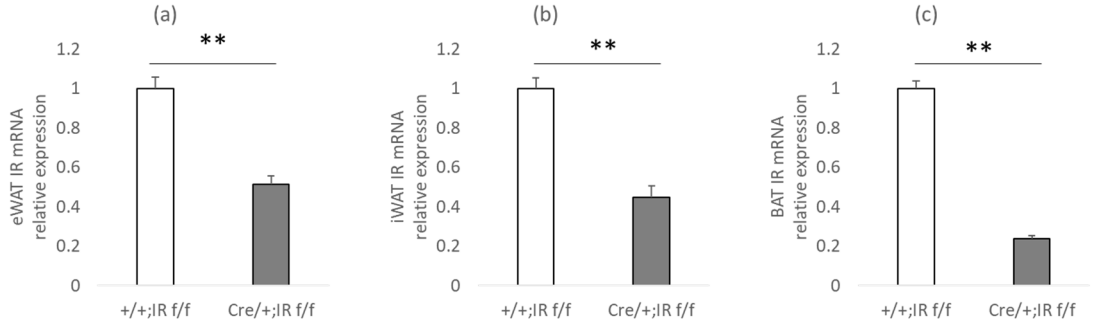


図 2. タモキシフェン誘導性に脂肪組織特異的に IR の mRNA 発現量が相対的に低下した

Cre/＋；IR f/f 群で、(a) eWAT（$p < 0.001$）、(b) iWAT（$p < 0.001$）、(c) BAT（$p < 0.001$）の IR mRNA 発現量が低下した。

5. Cre/＋；IR f/f マウス群において耐糖能の悪化が見られた

タモキシフェン投与開始後 5 日目より、*IR* をノックアウトした群で有意に血糖が上昇し（図 3）、耐糖能が悪化した。

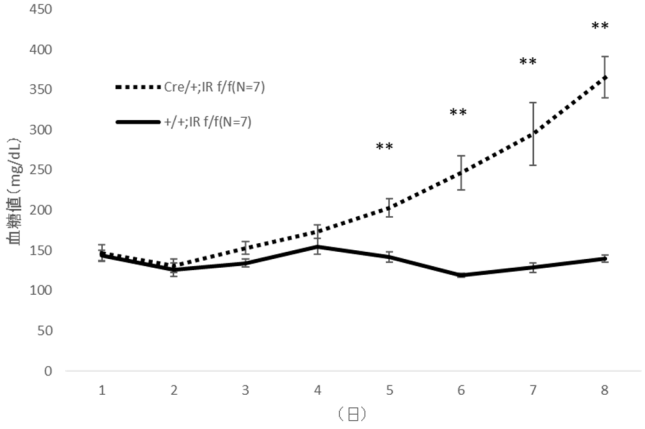


図 3. Cre/＋；IR f/f 群で耐糖能が悪化した

タモキシフェン投与開始 5 日目より、Cre/＋；IR f/f 群で血糖が有意に上昇した（各日 $p < 0.001$）。

6. Cre/＋；IR f/f マウス群において脂肪組織は萎縮し、肝重量は増加した

IR をノックアウトした群で eWAT、iWAT、BAT の重量が低下（図 4a～c）し、脂肪組織は萎縮していた。また、肝重量は増加（図 4d）し脂肪肝を呈していた。

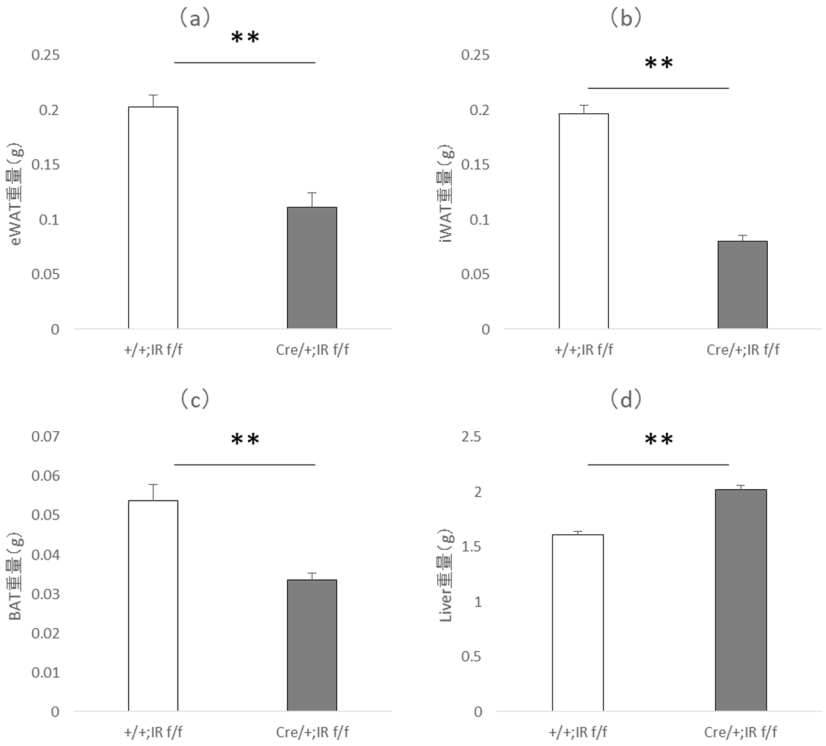


図 4. Cre/＋；IR f/f 群で脂肪組織の萎縮がみられ、肝重量が増加した
Cre/＋；IR f/f 群で（a）eWAT（$p < 0.001$）、（b）iWAT（$p < 0.001$）、（c）BAT（$p < 0.001$）の重量が減少した。また、Cre/＋；I R f/f 群で（d）肝重量の増加が認められた（$p < 0.001$）。

7. Cre/＋；IR f/f マウス群において膵β細胞の増殖がみられた

IR ノックアウト群において、膵β細胞の Ki67 陽性率が有意に増加した（図 5）。

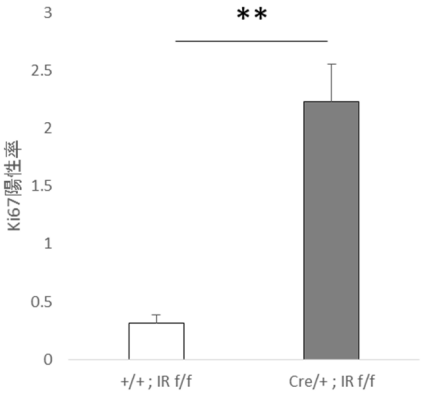


図 5. Cre/＋；IR f/f 群で膵β細胞の Ki67 陽性率が増加した
Cre/＋；I R f/f 群で膵β細胞の Ki67 陽性率が有意に増加し（$p < 0.001$）、膵β細胞の増殖促進が示唆された。

8. 高脂肪食負荷マウスにおいて 54 個の血清中エクソソーム miRNA 発現量が増加した

QIAseq miRNA-seq で得られた生のリード数データに対して RPM 正規化を行い、高脂肪食負荷 8 週で 1.2 倍以上、16 週負荷で 1.5 倍以上に増えたエクソソーム miRNA が 54 個確認された。高脂肪食負荷 16 週の個々のサンプルの評価でも有意な発現増加を示す miRNA を認めた（図 6）。なお、標準化は geNORM で抽出された内在性コントロールである miR-24a-3p で行った。

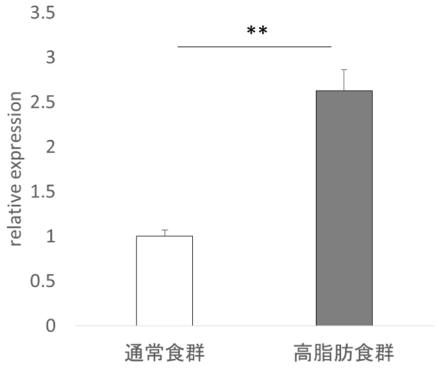


図 6. 高脂肪食群において、血清中エクソソーム miRNA の発現量が有意に増加した
次世代シークエンサー解析で高脂肪食群において発現量が増加している 54 個のエクソソーム miRNA のうち、16 週高脂肪食負荷後では約 2.5 倍の発現増加を示す miRNA を認めた（$p < 0.001$）。

考　察

まず、タモキシフェン誘導性に *IR* をノックアウトするマウスモデルを確立した。これらのマウスでは既報通り膵β細胞の Ki67 陽性率が増加しており、*IR* をノックアウトすることで変化した何らかの因子が、膵β細胞の増殖を促していると考えられる。我々は、その因子として生体内を循環するエクソソーム miRNA を想定し、次世代シーケンサーを用いて候補となるエクソソーム miRNA 検討していく予定である。肥満マウスにおける血清エクソソーム miRNA の次世代シーケンサーでの網羅的解析は行っており、これらの次世代シーケンサー解析の結果を統合し、膵β細胞の増殖を促すエクソソーム miRNA の候補を絞り込んでいく。

今後はさらに、絞り込んだ候補 miRNA を単離した膵島に添加し、インスリン分泌や増殖に及ぼす影響を検討する予定である。また、同定された miRNA やその anti-miRNA をモデルマウスに投与し、膵β細胞の増殖や機能に及ぼす影響を検討する予定である。

共同研究者・謝辞

本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1） Sakaguchi M, Fujisaka S, Cai W, Winnay JN, Konishi M, O'Neill BT, Li M, García-Martín R, Takahashi H, Hu J, Kulkarni RN, Kahn CR. Adipocyte Dynamics and Reversible Metabolic Syndrome in Mice with an Inducible Adipocyte-Specific Deletion of the Insulin Receptor. Cell Metab. 2017 25:448–462. PMID: 28065828 DOI: 10.1016/j.cmet.2016.12.0082017

2) Hadi Valadi1,3, Karin Ekström1,3, Apostolos Bossios1 , Margareta Sjöstrand1 , James J. Lee2 and Jan O. Lötvall. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007 9;654-59. PMID: 17486113　DOI: 10.1038/ncb1596.

3) Tsukita S, Yamada T, Takahashi K, Munakata Y, Hosaka S, Takahashi H, Gao J, Shirai Y, Kodama S, Asai Y, Sugisawa T, Chiba Y, Kaneko K, Uno K, Sawada S, Imai J, Katagiri H. MicroRNAs 106b and 222 Improve Hyperglycemia in a Mouse Model of Insulin-Deficient Diabetes via Pancreatic beta-Cell Proliferation. EBioMedicine. 2017 15; 163–172. PMID: 27974246　DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.12.002

4) Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, Rao TN, Winnay JN, Garcia-Martin R, Grinspoon SK, Gorden P, Kahn CR. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. Nature. 2017 542; 450–455. PMID: 28199304　DOI: 10.1038/nature21365