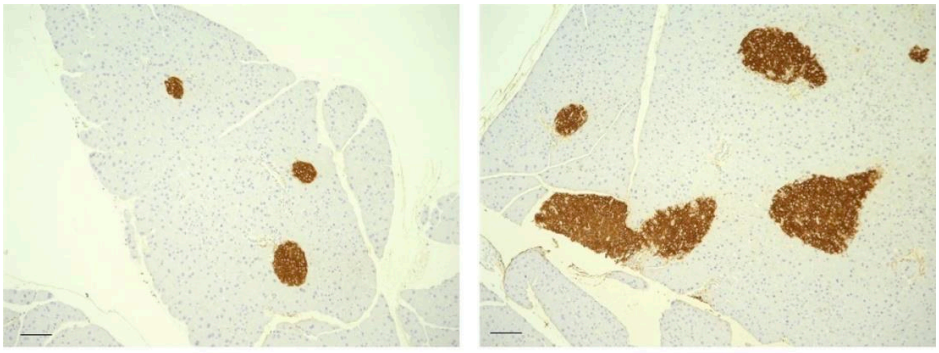
59　神経シグナルによる代償性細胞増殖制御機構の解明	今井　淳太

【目的】生物においては、臓器傷害などの個体の状況の変化に応じて、それを修復するため、あるいはその状況に適応するために実質細胞の増殖を促進する機構が存在する。本研究では、この状況に応じた細胞増殖を、神経シグナルが制御するメカニズムを解明することが目的である。

【方法】1. 膵臓に分布する迷走神経を選択的に活性化するマウスの解析：迷走神経を活性化することが膵β細胞や肝細胞の増殖において十分条件であるかは明らかでない。また、生体リズムとの関連を含め、どのタイミングでの迷走神経刺激が効果的に膵β細胞の増殖を惹起するかなど、全く不明である。そこで、光遺伝学的な手法で迷走神経遠心路を選択的に刺激する手法を想起し、それを用いて膵β細胞や肝細胞増殖を引き起こすか否かを検討した。cholinergic neuron で選択的に Cre リコンビナーゼを発現する ChAT-Cre マウスと、Cre リコンビナーゼにより誘導され、CAG プロモーター下で光活性化タンパクである ChR2 を発現するマウスを交配することにより、acetylcholine 作動性神経特異的 ChR2 発現マウスの樹立に成功した（ChAT-ChR2 マウス）。このマウスを用いて膵へ投射する迷走神経を選択的、安定的かつ持続的に刺激した際の膵β細胞増殖を観察した。2. 生きた状態で細胞増殖をモニターするマウスを用いた迷走神経活性化による細胞増殖の経時的観察 : 血中のルシフェラーゼ活性を定量することにより同一個体において膵β細胞や肝細胞の増殖をモニターできるマウスを作製した。このマウスで、肝臓 - 膵β細胞間神経ネットワーク経路を刺激した際の膵β細胞の増殖を経時的に観察した。

【結果】1. 膵臓に分布する迷走神経を選択的に活性化するマウスの解析：ChAT-ChR2 マウスを用いて、横隔膜下迷走神経を特異的に光刺激するために、光ファイバー留置手術を開発した。この方法によって膵臓に分布する線維を含む迷走神経を 2 週間にわたって刺激したところ、膵島内 BrdU 陽性細胞が対照マウスに比較して有意に増加した。このことから、持続的な迷走神経刺激によって膵β細胞増殖が誘導されることが明らかになった。さらにこのマウスにおいて 2 週間迷走神経刺激を行い、膵β細胞量を観察したところ、膵β細胞量は有意に増加した（下図）。2. 生きた状態で細胞増殖をモニターするマウスを用いた迷走神経活性化による細胞増殖の経時的観察：血中のルシフェラーゼ活性を測定することで、肝臓の増殖をモニターできるマウス（肝細胞増殖モニターマウス）において、肝臓部分切除を行った。このマウスで経時的に血中ルシフェラーゼ活性を測定したところ、組織学的な肝細胞増殖所見とほぼ一致して血中でのルシフェラーゼ活性の著明な増加が認められた。一方、膵β細胞増殖モニターマウスにおいて、肝臓への遺伝子導入によって肝臓 - 膵β細胞間神経ネットワーク経路を刺激した。このマウスで経時的に血中ルシフェラーゼ活性を測定したところ、組織学的な膵β細胞増殖所見とほぼ一致して血中でのルシフェラーゼ活性が著明に増加した。

遺伝学的手法による膵臓迷走神経特異的刺激による膵β細胞量増加



対照　　迷走神経刺激

59. 神経シグナルによる代償性細胞増殖制御機構の解明

今井　淳太

東北大学 大学院医学系研究科 糖尿病代謝内科学分野

Key words：膵 β 細胞，肝細胞，迷走神経，オプトジェネティクス，時間的解析

緒　言

生物においては、臓器傷害などの個体の状況の変化に応じて、それを修復するため、あるいはその状況に適応するために実質細胞の増殖を促進する機構が存在する。本研究では、この状況に応じた細胞増殖を、神経シグナルが制御するメカニズムを解明することが目的である。

神経系による組織増殖機構は両生類を用いた研究などで数十年前から報告されていたが ［1, 2］、その後大きな進展がなく経過してきた。研究開発代表者は、肥満などのインスリン必要量が増加した際に、それに適応するために膵β細胞が増殖するメカニズムとして、肝臓 ERK 経路の活性化を契機として、肝臓→求心性内臓神経→中枢神経→遠心性迷走神経→膵ランゲルハンス島（膵島）という肝臓 - 膵β細胞間神経ネットワーク経路を介したシグナルによって制御されていることを発見した［3］。さらに、このメカニズムの検討を進め、迷走神経シグナルが選択的に膵β細胞増殖を惹起する分子メカニズムを解明した［4］。このことから、哺乳類の個体においても、代償性細胞増殖に自律神経シグナルが関与している可能性が想定される。この仕組みは、膵β細胞のみを極めて選択的に増殖誘導するものであり、神経系の持つ解剖学的特性がその組織選択性を生み出している可能性が想定される。実際、研究開発代表者は、膵内迷走神経節の多くが膵ランゲルハンス島（膵島）に近接して存在することを見出し［4］、その解剖学的特性の一端を明らかにした。一方で、肝傷害後早期の再生に関わるメカニズムとして、迷走神経シグナルを端緒とし、肝内在性マクロファージ（クッパー細胞）の活性化を介して、肝細胞に増殖シグナルが伝達されるという多段階システムを解明した［5］。膵β細胞の代償性増殖に関しては、肥満などのインスリン必要量が増加した際に膵β細胞を増やし血糖値上昇を防ぐ機構と考えられる。また、肝臓切除後再生に関しては、迷走神経肝枝を切断しておき早期再生を阻害することで、個体の死亡率が増加することを見出した。すなわち、これらの迷走神経シグナルは、膵β細胞においてはインスリン需要増大に適応するため、また肝臓においては重篤な肝傷害時に組織修復を促進するため、それぞれ代償性増殖を制御している。以上から、この神経系を介した組織適応・修復機構は、個体生存をも規定する、非常に重要な仕組みであると考えられるが、その詳細なメカニズムや分子機構は明らかでなく、神経シグナルが単独で細胞増殖を誘導しうるのかさえ、不明である。そこで、本研究では、オプトジェネティクスの技術を末梢神経系に応用し、膵への迷走神経活性化により、膵β細胞増殖が惹起されるか検討した。さらに、膵β細胞や肝細胞の増殖を生きたままモニターできるマウスを作出し、代償性細胞増殖の同一個体における経時的な解析を行った。

方　法

1. 膵臓に分布する迷走神経を選択的に活性化するマウスの解析

迷走神経を活性化することが膵β細胞や肝細胞の増殖において十分条件であるかは明らかでない。また、生体リズムとの関連を含め、どのタイミングでの迷走神経刺激が効果的に膵β細胞の増殖を惹起するかなど、全く不明である。 そこで、光遺伝学的な手法で迷走神経遠心路を選択的に刺激する手法を開発し、それを用いて膵β細胞増殖を引き起こすことが可能であるか検討した。cholinergic neuron で選択的に Cre リコンビナーゼを発現する ChAT-Cre マウスと、Cre リコンビナーゼにより誘導され、CAG プロモーター下で光活性化タンパクである ChR2 を発現するマウスを交配

することにより、acetylcholine 作動性神経特異的 ChR2 発現マウスの樹立に成功した（ChAT-ChR2 マウス）。このマウスを用いて膵へ投射する迷走神経を選択的、安定的かつ持続的に刺激した際の膵β細胞増殖を観察した。

2. 生きた状態で細胞増殖をモニターするマウスを用いた迷走神経活性化による細胞増殖の経時的観察

血中のルシフェラーゼ活性を定量することにより同一個体において膵β細胞や肝細胞の増殖をモニターできるマウスを作製した。このマウスで、肝臓部分切除を行った際の肝細胞の増殖や、肝臓 - 膵β細胞間神経ネットワーク経路を刺激した際の膵β細胞の増殖を経時的に観察した。

結果および考察

1. 膵臓に分布する迷走神経を選択的に活性化するマウスの解析

ChAT-ChR2 マウスを用いて、横隔膜下迷走神経を特異的に光刺激するために、光ファイバー留置手術を開発した。この方法によって膵臓に分布する線維を含む迷走神経を 2 週間にわたって刺激したところ、膵島内 BrdU 陽性細胞が対照マウスに比較して有意に増加した。このことから、持続的な迷走神経刺激によって膵β細胞増殖が誘導されることが明らかになった。さらにこのマウスにおいて 2 週間迷走神経刺激を行い、膵β細胞量を観察したところ、膵β細胞量は有意に増加した（図 1）。

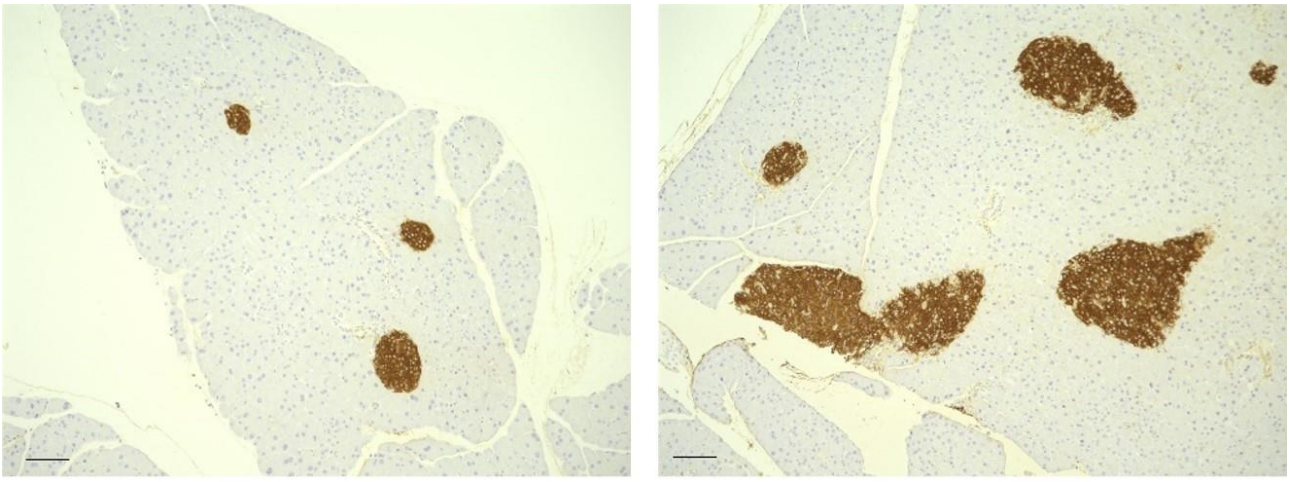


図 1. 光遺伝学的手法による膵臓迷走神経特異的刺激により、膵β細胞量が有意に増加した
茶色：膵β細胞領域（スケールバー：100μm）。

この結果は、膵β細胞増殖の効率的な誘導とそれによるβ細胞量の増加にとって迷走神経の活性化が十分であることを初めて示したものである。近年、頸部留置電極を用いた電気的迷走神経刺激療法は、てんかんやうつ病、炎症性腸疾患の治療現場に応用されている。すでに活用されているこれらの技術を応用することにより、膵臓迷走神経活性化はインスリン分泌が欠乏した糖尿病に対する現実的で有望な治療選択肢になる可能性が考えられる。

2. 生きた状態で細胞増殖をモニターするマウスを用いた迷走神経活性化による細胞増殖の経時的観察

血中のルシフェラーゼ活性を測定することで、肝臓の増殖をモニターできるマウス（肝細胞増殖モニターマウス）において、肝臓部分切除を行った。このマウスで経時的に血中ルシフェラーゼ活性を測定したところ、組織学的な肝細胞増殖所見とほぼ一致して血中ルシフェラーゼ活性の著明な増加が認められた（図 2a）。

一方、膵β細胞増殖モニターマウスにおいて、肝臓への遺伝子導入によって肝臓 - 膵β細胞間神経ネットワーク経路を刺激した。このマウスで経時的に血中ルシフェラーゼ活性を測定したところ、組織学的な膵β細胞増殖所見とほぼ一致して血中ルシフェラーゼ活性の著明な増加が認められた（図 2b）。

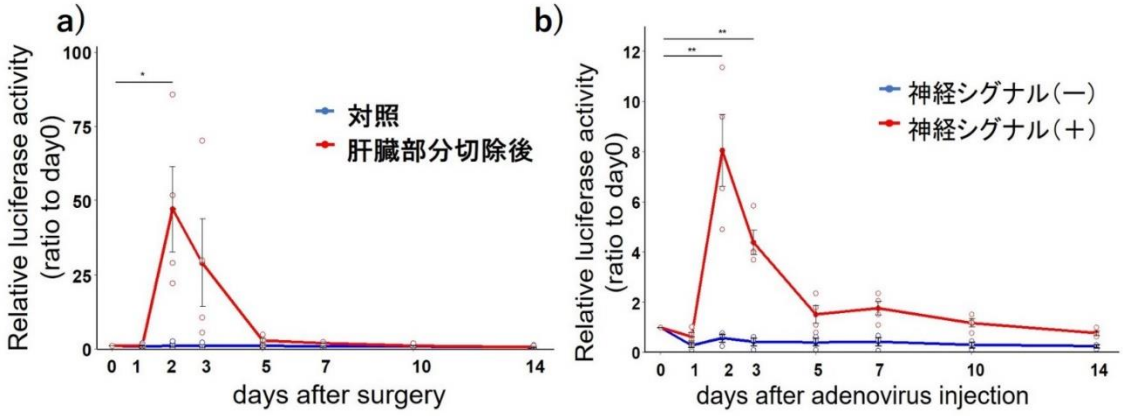


図 2. 各細胞増殖モニターマウスの血中ルシフェラーゼ活性の時系列変化

a) 肝臓部分切除を行った肝細胞増殖モニターマウスの血中ルシフェラーゼ活性。

b) 肝臓 - 膵β細胞間神経ネットワーク経路を刺激した膵β細胞増殖モニターマウスの血中ルシフェラーゼ活性。

$p<0.05$ **、$p<0.01$ v.s. control（one-way ANOVA にて検定）。

この結果から、血液のアッセイという簡便な方法により、生体内における様々な種類の標的細胞の増殖を経時的に観察できる新規な方法の開発に成功した。このシステムにより、生体内における数多くの細胞増殖の経時的観察の実現が期待される。特に、膵β細胞の *in vivo* モニタリングが可能であったことから、非常に少数の細胞集団の増殖も観察可能と考えられ、今後の活用が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である、東北大学大学院生命科学研究科の松井広先生、森澤陽介先生、フランス国立科学研究センターの Pierre Chambon 教授と Daniel Metzger 博士に感謝申し上げます。

文　献

1) Singer M. The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity. Q Rev Biol. 1952;27(2):169-200. PubMed PMID: 14949331.

2) Lebowitz P, Singer M. Neurotrophic control of protein synthesis in the regenerating limb of the newt, Triturus. Nature. 1970;225(5235):824-7. doi: 10.1038/225824a0. PubMed PMID: 4313294.

3) Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, et al. Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. Science. 2008;322(5905):1250-4. Epub 2008/11/22. doi: 322/5905/1250 [pii]10.1126/science.1163971. PubMed PMID: 19023081.

4) Yamamoto J, Imai J, Izumi T, Takahashi H, Kawana Y, Takahashi K, et al. Neuronal signals regulate obesity induced beta-cell proliferation by FoxM1 dependent mechanism. Nat Commun. 2017;8(1):1930. doi: 10.1038/s41467-017-01869-7. PubMed PMID: 29208957; PubMed Central PMCID: PMCPMC5717276.

5) Izumi T, Imai J, Yamamoto J, Kawana Y, Endo A, Sugawara H, et al. Vagus-macrophage-hepatocyte link promotes post-injury liver regeneration and whole-body survival through hepatic FoxM1 activation. Nat Commun. 2018;9(1):5300. doi: 10.1038/s41467-018-07747-0. PubMed PMID: 30546054; PubMed Central PMCID: PMCPMC6294142.