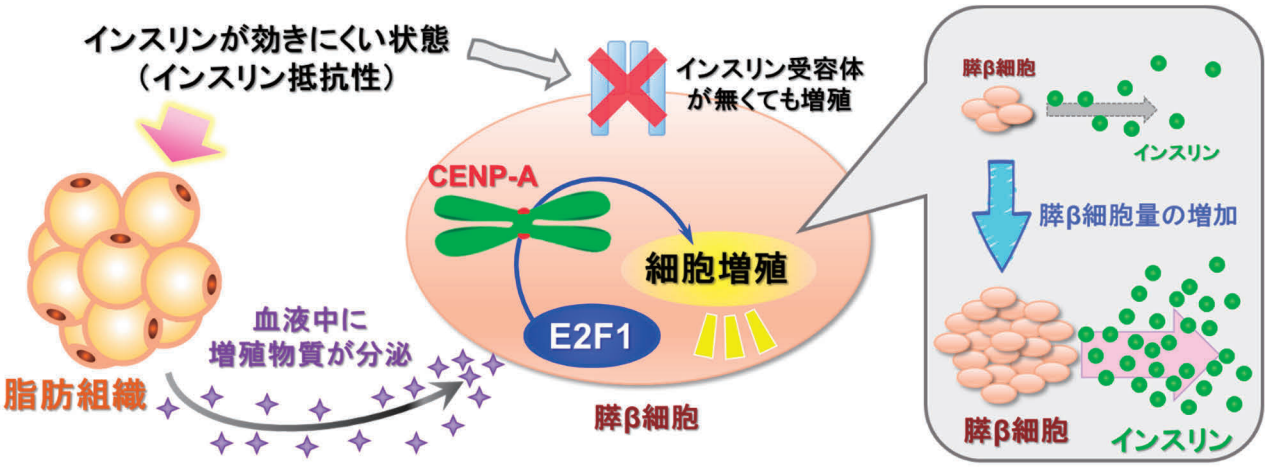
55　ヒト膵島を用いた糖尿病治療研究の基盤形成	白川　純

【目的】本研究の目的は、膵β細胞量調節機構に関する分子を同定し、その機序を明らかにすることにより、「臨床に還元できる膵β細胞に着目した糖尿病治療法開発」を目指したトランスレーショナルリサーチを展開することである。糖尿病の病態解明および治療法開発において重要な、膵島にあるインスリンを産生する膵β細胞は、生体内において他臓器との連関により機能や量が制御されている。肥満やインスリン抵抗性状態では、インスリンの需要増大に適応するため、代償的に膵β細胞の量が増加する。しかし、この過程において生体内で実際に起きている多面的な組織間ネットワークに加え、環境要因や遺伝因子、加齢との複合による膵β細胞量の調節機構は不明な点が多い。そこで、本研究では、ヒト膵島と複数の組織や細胞との共培養系の樹立や、膵島の生理学的機能を統合的に解析できる基盤を形成し、生体内環境を再現しその機序に迫る。これより、肥満やインスリン抵抗性状態における膵β細胞量を規定する機序の包括的理解から、糖尿病治療への応用を目指すことが目的である。

【方法】肥満やインスリン抵抗性時に、複雑な環境要因や臓器間ネットワークを介して、生体内で膵β細胞の量が代償的に増加している機序を、独自の共培養系を立ち上げ、膵島を統合的かつ包括的に解析できる基盤を整備し解析した。特に、短期間で膵β細胞量が急速に増大するものの、これまで膵β細胞増殖機序が不明であった急性インスリン抵抗性モデルに注目して解析した。

【結果】急性インスリン抵抗性による代償性の膵β細胞増殖は、これまで重要とされていたインスリン受容体シグナルに非依存的に膵β細胞増殖を促進させることを見出した。さらに、その膵β細胞増殖には転写因子である E2F1 を介した FoxM1/CENP-A/PLK1 の活性化によるシグナル伝達が必須であることを明らかにした。インサートメッシュを挿入したプレートと、混合比率を最適化した培地を用いて膵島を培養することにより、浮遊細胞や接着細胞などのあらゆる初代培養細胞と、接触することなく共培養する系を開発した。そこで、インスリン受容体を特異的に阻害する S961 ペプチドを、オスモティックポンプで持続注入したインスリン抵抗性マウスで、上記の膵島との組織共培養によるスクリーニングを行った。その結果、脂肪細胞と膵島の共培養にて、脂肪組織から膵β細胞を増やす液性因子が分泌されることを見出した。この現象は、マウス膵島だけでなくヒト膵島でも認められた。生体内で膵β細胞を増やすためには、膵臓だけではなく脂肪組織などの代謝臓器における臓器間ネットワークの制御が重要であることが示された。

急性インスリン抵抗性下において脂肪式由来の液性因子が臓器連関を介して膵β細胞増殖を促進する



55. ヒト膵島を用いた糖尿病治療研究の基盤形成

白川　純

群馬大学 生体調節研究所 代謝疾患医科学分野

Key words：糖尿病，膵β細胞，ヒト膵島，臓器連関，液性因子

緒　言

糖尿病治療における目標の1つとして、膵臓の膵島に存在し、インスリンを産生する膵β細胞の機能および量を増大させることにより、糖尿病の発症・進展を抑制もしくは遅延させ、さらには糖尿病状態から回復させることが挙げられる。そのため我々は、ヒト膵島を用いた細胞増殖やアポトーシスによる膵β細胞量調節の分子機構について報告してきた。しかし、ヒトの生体内における膵β細胞量の調節は、糖尿病の発症に寄与が高い加齢に伴う経時的変化や食生活、運動不足、ストレス等の環境要因と遺伝要因が複合しており、生体内の複雑な臓器間ネットワークにより制御されている。

特に、やせ型の日本人では、肥満などによるインスリン抵抗性を代償するための膵β細胞増大機構が障害されているため、軽度の肥満により容易に糖尿病を発症することが、日本人に特異的な2型糖尿病疾患感受性遺伝子群のGWAS（genome-wide association study）による解析や、日本人と欧米人の病理組織の解析から示されている。すなわち、肥満やインスリン抵抗性時に、複雑な環境要因や臓器間ネットワークを介して、生体内で膵β細胞の量が代償的に増加している機序が明らかとなれば、日本人の膵β細胞を増やす治療法開発に直結する。現在、国内外でも生体内の代謝における臓器連関に関して精力的に解析されているが、それは単一遺伝子の欠損マウスや、1つの臓器・組織から他の1つの臓器・組織への影響についての解析がほとんどであり、本研究のように個体における多臓器の連関を経時的に解析している研究は報告されていない。

ヒトとマウスとは、膵島・膵β細胞において様々な点が異なるため、ヒトの糖尿病治療に応用するためには、ヒト膵島を用いた解析を行うことが必須である。しかし、本邦においては、移植用に単離されたヒト膵島を研究に転用することは困難であったため、膵β細胞株や遺伝子改変マウスなどの動物モデルを用いた研究が主流であり、ヒト膵β細胞に関しての本邦からの報告はほとんどなかった。我々は、アジアで初めてヒト膵島の研究使用をカナダのIsletCoreで公式に認定され、日本で唯一、健常者と2型糖尿病ドナーの両者の新鮮ヒト膵島を定期的に用いて研究を行っている。

本研究では、ヒト膵島と複数の組織や細胞との共培養系の樹立や、膵島の生理学的機能を統合的に解析できる基盤を形成し、生体内環境を再現しその機序に迫る。これより、肥満やインスリン抵抗性状態における膵β細胞量を規定する機序の包括的理解から、糖尿病治療への応用を目指すことを目的として研究を実施した。

本研究の主な成果は、*Cell Rep.* 41(1):111436, 2022.［1］に掲載された。

方法および結果

1. 膵島の統合的解析系の構築

膵島の解析において、従来の遺伝子改変マウス、perifusion分泌解析、シングルセルRNA-Seq、超解像度顕微鏡（STED）による画像解析に加えて、①機能的なリン酸化タンパクの解析が可能なPhos-tag diagonal electrophoresisを立ち上げ、②複数のリボソームが会合したmRNAを単離しタンパク質の翻訳状態を評価できるPolysome Profilingを膵島で確立し、③膵島の細胞外活動電位を測定できる膵島専用の吸引機能付きMicro-Electrode Array（MEA、微小電極アレ

イ）を日本で初めて導入した。さらに④不均一な膵島細胞のタンパク質の発現や修飾を膵島細胞種毎に区別して解析できるシングルセルウエスタンブロットも立ち上げ、⑤膵島における細胞内カルシウム濃度や脱分極のダイナミクスを生理的なタイムラプスイメージングで観察可能なマイクロ流体システムや⑥アルギン酸ファイバーを共培養の環境に最適な形態にプログラムする 3D バイオプリンターを導入しており、膵島を統合的かつ包括的に解析できる基盤を整備した。これより、個々の膵島細胞レベルにおける細胞生理学的解析から、膵島組織としての翻訳後修飾まで、膵島細胞の可塑性を統合的に解析できる系を確立した（図 1）。



図 1. 膵島・代謝組織の統合的な解析

膵島や幹細胞由来オルガノイド等におけるミトコンドリア機能や微量タンパクの解析に加え、シングルセルレベルでのタンパク質の翻訳・修飾、代謝、電気生理学等を統合的に解析し完結できるシステムを構築していく。さらに、生体内環境の再構築に向けた基盤も整備した。

2. 全身性の急性インスリン抵抗性下では、膵β細胞のインスリン受容体非依存的に膵β細胞増殖を促進した

膵β細胞に発現しているインスリン受容体は慢性的なインスリン抵抗性に対する代償性の膵β細胞増殖に重要であることが示されている［2］。インスリン受容体アンタゴニストである S961 を皮下に移植したオスモティックポンプを用いて、コントロール（IR-floxed）マウスおよび膵細胞β特異的インスリン受容体欠損（βIRKO）マウスに持続投与した。S961 によりインスリン抵抗性が誘導され、著明な高血糖および高インスリン血症を認めたが WT と βIRKO に差を認めなかった。S961 を 9 日間投与後に膵組織を解析したところ、IR-floxed と βIRKO の両者で同等の膵β細胞量の増加および膵β細胞増殖の促進を認めた（図 2）。

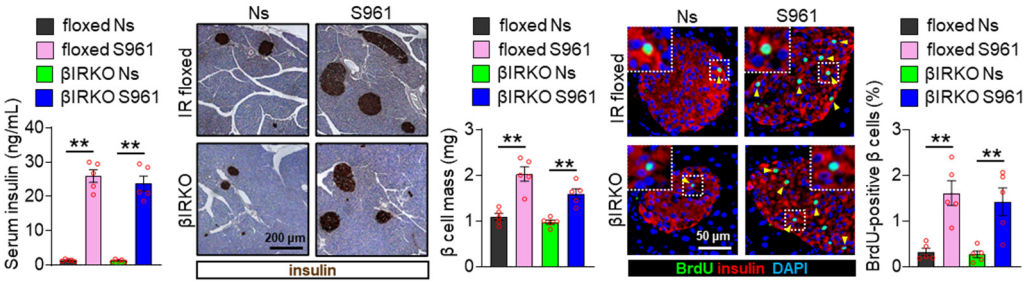


図 2. S961 によるインスリン受容体非依存的な膵β細胞増殖

S961 および生理食塩水（Ns）を皮下に移植したオスモティックポンプで、9 日間持続投与した後の、IR-floxed および βIRKO マウスにおける膵β細胞量（左：インスリン染色）および膵β細胞増殖（右：BrdU 取り込み）。**p＜0.01（one-way ANOVA）。

インスリン受容体シグナルで重要な役割を果たす IRS-2 を欠損したマウスにおいても、野生型マウスと同様の S961 による膵β細胞増殖を認めた。これより、S961 による急性インスリン抵抗性を介した膵β細胞増殖はインスリン受容体に非依存的であることが示された。

3. S961 による膵β細胞増殖は FoxM1/PLK1/CENP-A pathway および E2F1 を介している

FoxM1/PLK1/CENP-A pathway は、慢性のインスリン抵抗性に対する代償性の膵β細胞増殖に必須のシグナル伝達経路である[2, 3]。S961 を 7 日間持続投与したマウス膵島の網羅的遺伝子発現を解析したところ、FoxM1/PLK1/CENP-A pathway の活性化を示唆する細胞周期の G2M 期の分子が発現上昇していた（図 3A）。組織学的に解析すると、IR-floxed とβIRKO の両者で、S961 投与後の膵β細胞では FoxO1 の核内集積および CENP-A の発現上昇を認めた（図 3B）。上流の転写因子解析を行ったところ E2F1 を中心とした E2F ファミリーが同定され、E2F1 の阻害薬により S961 による膵β細胞量の増加、膵β細胞増殖、FoxM1/PLK1/CENP-A pathway の活性化が抑制された（図 3C～G）。以上より、S961 による膵β細胞増殖では、FoxO1 の核外移行に非依存的に E2F1 を介して、FoxM1/PLK1/CENP-A pathway を活性化していることが示唆された。

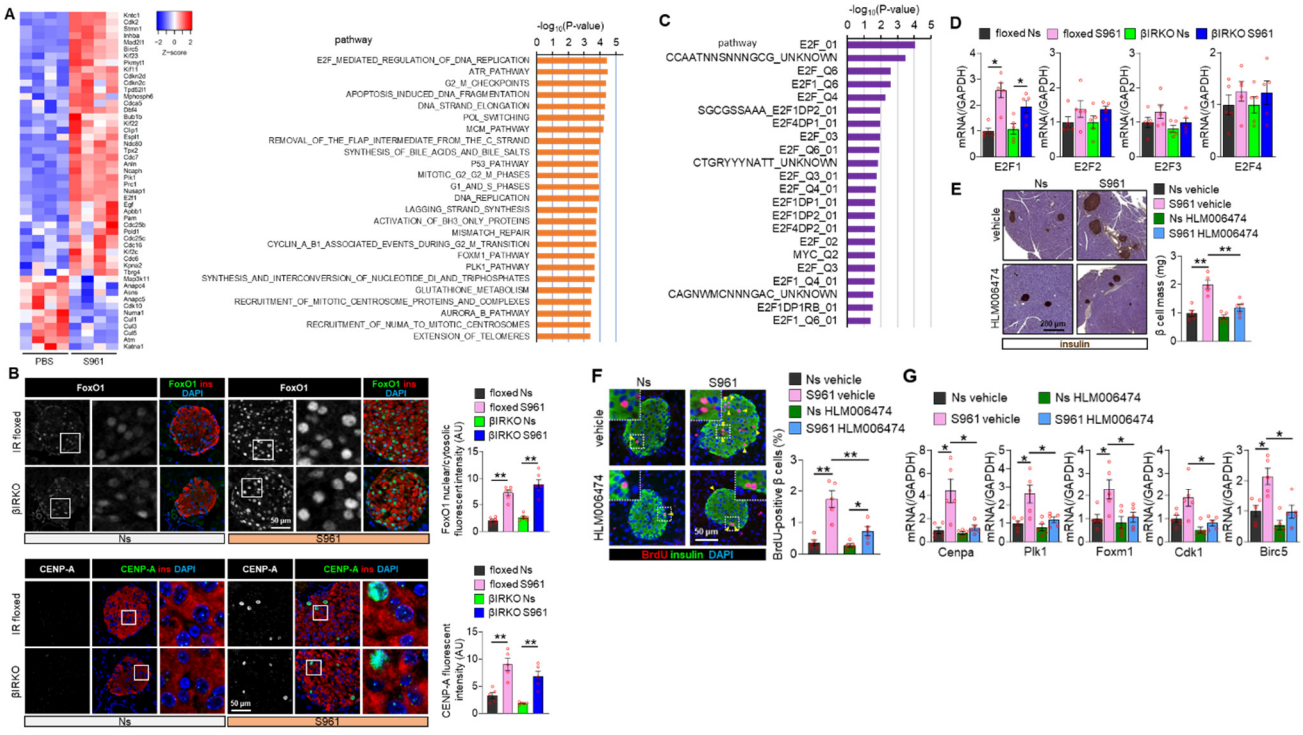


図 3. S961 による FoxM1/PLK1/CENP-A pathway および E2F1 を介した膵β細胞増殖

A) S961 および PBS を皮下に移植したオスモティックポンプで、7 日間持続投与した後のマウス膵島における網羅的遺伝子発現および pathway 解析の結果。

B) IR-floxed およびβIRKO マウスにおける S961 投与後の FoxO1（上）および CENP-A（下）の発現および局在。

C) S961 投与マウス膵島の遺伝子発現における上流転写因子解析

D) S961 投与マウス膵島における E2F ファミリーの発現

E～G) S961 投与マウスにおける E2F1 阻害薬（HLM006474）投与による、膵β細胞量（E）、膵β細胞増殖（F）、遺伝子発現（G）の変化。*p＜0.05、**p＜0.01（one-way ANOVA）。

4. S961 による膵β細胞増殖は血液中に分泌される液性因子を介している

S961 による膵β細胞増殖機構を解析するために、単離膵島および膵β細胞に直接 S961 を添加したところ、膵β細胞の増殖促進は認められなかった。そこで、S961 を投与したマウスの血清を添加したところ、インスリン受容体や IRS2 に非依存的に膵β細胞増殖が促進された。この効果は、マウス単離膵島やヒト膵島においても認められた（図 4）。

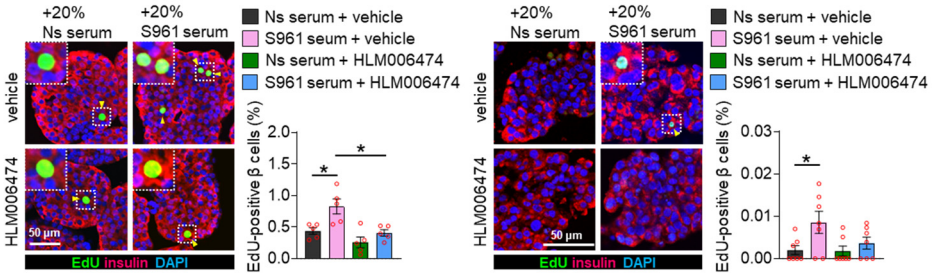


図 4. S961 による液性を介した膵β細胞増殖

S961 および生理食塩水（Ns）を投与したマウスの血清を添加したマウス膵島（左）および健常者ドナー由来ヒト膵島（右）における、E2F1 阻害薬（HLM006474）存在下、非存在下における膵β細胞増殖。*p＜0.05（one-way ANOVA）。

5. S961 による膵β細胞増殖は脂肪組織から分泌される液性因子を介している

慢性的なインスリン抵抗性下では、肝臓由来の液性因子が膵β細胞増殖に関与していることが報告されている。S961 による膵β細胞増殖に関わる液性因子を分泌する臓器を解析するために膵島と肝細胞および白色脂肪細胞を共培養する系を立ち上げた（図 5A）。肝細胞との共培養により膵β細胞増殖は促進されるものの、S961 投与マウスと生理食塩水投与マウスの肝細胞で膵β細胞増殖促進効果に差は認めなかった（図 5B）。一方で、白色脂肪細胞と共培養したところ、生理食塩水投与マウスの脂肪細胞と比較して S961 投与マウスの脂肪細胞により、有意に膵β細胞増殖が促進された（図 5C）。さらにこれらの増殖効果は、E2F1 の阻害により抑制された。

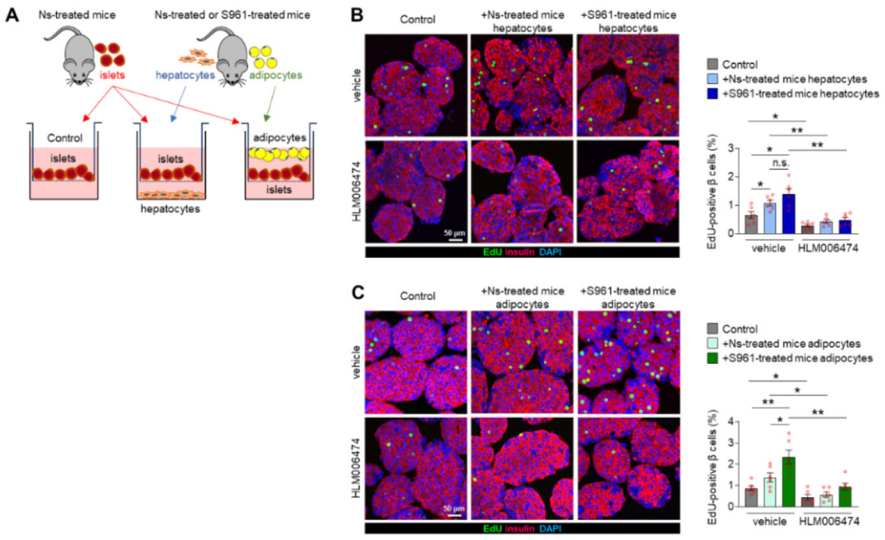


図 5. S961 による脂肪組織由来因子を介した膵β細胞増殖

A） 生理食塩水（Ns）を投与したマウスの膵島と、S961 および生理食塩水（Ns）を投与したマウスの肝細胞および脂肪細胞を共培養して BrdU 取り込みにより E2F1 阻害薬（HLM006474）存在下、非存在下における膵β細胞増殖を評価した。

B） 肝細胞および、C）脂肪細胞共培養した場合における膵島での膵β細胞増殖。*p＜0.05、**p＜0.01（one-way ANOVA）。

考　察

肥満などの慢性的なインスリン抵抗性下では、膵β細胞のインスリン受容体を介したシグナルが代償性の膵β細胞増殖に重要と考えられてきたが、本研究により、急性のインスリン抵抗性下では、インスリン受容体に非依存的に膵β細胞増殖が促進され、その過程において脂肪組織由来の液性因子が転写因子である E2F1 を活性化し、FoxM1/PLK1/CENP-A pathway を介していることが示唆された（図 6）。2 型糖尿病ドナーの膵島ではインスリン受容体を介したシグナル伝達機構が障害されていることから、この経路は糖尿病状態から膵β細胞量を回復させる経路になり得ることが期待された。

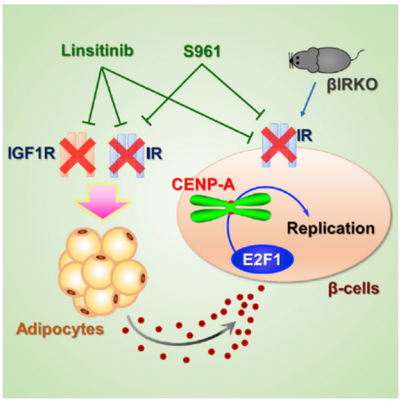


図6.　急性インスリン抵抗性下における代償性膵β細胞増殖機構

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、ハーバード大学医学部ジョスリン糖尿病センターの Rohit N. Kulkarni、横浜市立大学医学部内分泌・糖尿病内科の寺内康夫ある。本研究は、上原記念生命科学財団の助成金およびその他の研究費により実施された。このような機会を与えて頂いた上原記念生命科学財団の関係者の皆様に心より厚く御礼申し上げます。

文　献

1）　Shirakawa J, Togashi Y, Basile G, Okuyama T, Inoue R, Fernandez M, Kyohara M, De Jesus DF, Goto N, Zhang W, Tsuno T, Kin T, Pan H, Dreyfuss JM, Shapiro AMJ, Yi P, Terauchi Y, Kulkarni RN.: E2F1 transcription factor mediates a link between fat and islets to promote β cell proliferation in response to acute insulin resistance. Cell Rep. 2022 Oct 4;41(1):111436. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111436. PMID: 36198264.

2）　Shirakawa J, Fernandez M, Takatani T, El Ouaamari A, Jungtrakoon P, Okawa ER, Zhang W, Yi P, Doria A, Kulkarni RN. Insulin Signaling Regulates the FoxM1/PLK1/CENP-A Pathway to Promote Adaptive Pancreatic β Cell Proliferation. Cell Metab. 2017 Apr 4;25(4):868-882.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2017.02.004. PMID: 31897526

3）　Shirakawa J, Tajima K, Okuyama T, Kyohara M, Togashi Y, De Jesus DF, Basile G, Kin T, Shapiro AMJ, Kulkarni RN, Terauchi Y.: Luseogliflozin increases beta cell proliferation through humoral factors that activate an insulin receptor- and IGF-1 receptor-independent pathway. Diabetologia. 2020 Mar;63(3):577-587. doi: 10.1007/s00125-019-05071-w. PMID: 28286049.