

学内グラント 報告書

平成23年度 学内グラント終了時報告書

神経ペプチドを利用した多能性幹細胞から
膵β細胞の分化・再生誘導と糖尿病の再生医療

研究代表者 松本 征仁 (医学部 分子生物学)

研究分担者 犬飼 浩一¹⁾, 平崎 正孝²⁾, Mark Huising³⁾, Wylie Vale³⁾

緒言

現代はストレス社会といわれ、日常生活における慢性的なストレスの亢進が虚血性心疾患・肥満・糖尿病などさまざまな生活習慣病を悪化させるリスクファクターであることがよく知られている。例えば、急性ストレスは血中の血糖値を上昇させることがよく知られているが、これは視床下部から分泌される神経ペプチドCorticotropin releasing factor (CRF/CRH)が、視床下部-下垂体-副腎 (HPA axis) を介してグルココルチコイド (GCs) を分泌させてストレス応答を制御している。しかしながら、従来ストレス応答と糖尿病との相関は指摘されていたが、血糖調節を行うインスリンを分泌する膵臓β細胞とストレス応答との詳細な分子機序については明らかでない。近年、CRFファミリーおよびGPCRクラスBに属するCRF受容体が選択的に膵島に発現することが著者らのグループにより報告され、CRFファミリーに属する神経ペプチドによる膵β細胞の機能を調節することが明らかとなった。実際、著者らはCRFファミリーが膵臓β細胞を標的として高血糖時のインスリン分泌を上昇させること、β細胞の増殖を促進させることなどCRFファミリーの新たな機能を見出してきた。

一方、今日のインスリン依存性糖尿病の治療法は、インスリン療法や経皮経肝門脈穿刺による膵島移植が有効であるが、度重なる注射による患者負担が大きいことやドナーの確保が難しいため、全ての糖尿病患者に満足のいく治療を提供できないのが現状である。このため、次世代の糖尿病治療として脚光を浴びている胚性幹 (ES) 細胞やiPS細胞を用いた膵β細胞の再生医療による先端的アプローチ法が期

待されている。しかしながら、ES細胞・iPS細胞共に多能性幹細胞から膵β細胞までの分化の道のりが長く多段階かつ複雑であるため、内・外胚葉前駆細胞が混在する培養系から糖尿病の治療に有効となる品質の高いβ細胞数の確保が困難であることを理由にインスリン依存性糖尿病の再生医療の実用化への発展の機会を失っており途上の段階といえる。従って、膵内分泌前駆細胞・β細胞の終末分化と膵島形成を適切にコントロールして臨床現場に安定的な膵β細胞の供給を可能にする手法の開発が必須である。内分泌前駆細胞において一過性に発現するマスター転写因子Neurogenin (Ngn) 3は膵β細胞の分化のみならず糖尿病モデルのβ細胞の再生過程に必須であることが知られている (図1)。これまでにβ細胞分化に重要な転写因子Pdx1, NeuroD, Nkx2.2, Nkx6.1, Rfx6.2, Sox9とNgn3などのβ細胞系統マーカーが同定されているが、各々の機能とβ細胞の終末分化については不明な点が多く残されている。近年、これらの遺伝子を生体内にウイルスベクターを用いて膵外分泌細胞や肝臓などの膵臓以外の組織において膵β細胞の分化転換・複製・再生を誘導することが報告されており、重要な点はいずれのβ細胞が生じる過程においてNgn3が不可欠という事実である。本研究では、膵β細胞の機能促進・細胞死・分化誘導に対する神経ペプチドの有効性について検討したので報告する。

材料と方法

培養細胞：MIN6細胞株は10% FBS (Sigma 社) と1% Penicillin-Streptomycin (ナカライテスク (株)) を添加したDMEM (Sigma 社) 培地中にて、37℃, 5%, CO₂ 条件の下、培養した。

マウス膵島：12～16週齢のC57BL6/Nマウス門脈よりcollagenase type P (Roche 社) 溶液を注入した膵臓を摘出し、37℃にて10分間振湯後、Ficoll溶液にて密

1) 大学病院 内分泌内科・糖尿病内科

2) 医学部 分子生物学

3) ソーク研究所

度勾配遠心により膵島を単離した。膵島細胞の培養は、10%FBS, 1%Penicillin-Streptomycinを添加したRPMI (Invitrogen 社) 培地中にて培養した。

実験動物マウス：埼玉医科大学中央実験施設実験動物部門BS室にて実験動物管理運営規定に基づき飼育され、苦痛軽減・安楽死に配慮した指針に従い実験を実施した。共同研究で使用した遺伝子改変マウスについては米国ソーグ研究所実験動物施設 (SARF) の実験動物管理運営規定に基づき飼育管理され、苦痛軽減と安楽死に配慮した指針に基づき採材等の実験を行った。

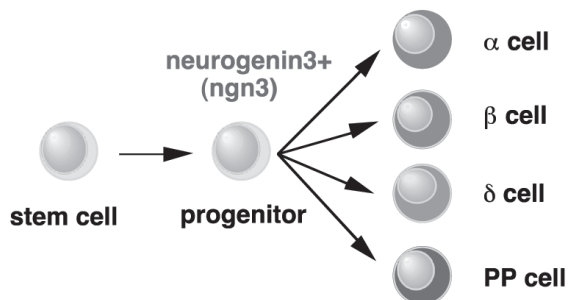


図 1.

結果

CRF 受容体 CRFR1 が膵臓 β 細胞に発現し、グルコース濃度依存的に MAP キナーゼ経路の活性化を介してマウス膵島からインスリン分泌を上昇させる働きがあること (図 2 A), β 細胞の増殖を誘導することを見出した (図 2 G, H). CRF ファミリーには、視床下部から分泌され HPAaxis の制御に重要な因子が含まれる。膵島および膵 β 細胞株 MIN6 細胞を用いて CRF, 膵 β 細胞に高発現する CRF ファミリーの刺激によって、受容体 CRFR1 と CRFR2 を介して cAMP 濃度の上昇と転写因子 CREB の活性化が誘導された。さらに、CRF ファミリー受容体 CRFR2alpha は β 細胞株 MIN6 に発現すること、ストレスホルモンであるグルココルチコイド (GCs) で β 細胞株の MIN6 細胞株を処理すると、CRFR2alpha の発現が上昇するのに対し CRFR1 の発現が顕著に低下することを見出した。さらに CRFR1 と CRFR2 の活性化は炎症性サイトカイン TNF- α による β 細胞のアポトーシス、Caspase-3 の断片化、Bax の発現を抑制することが明らかとなった。

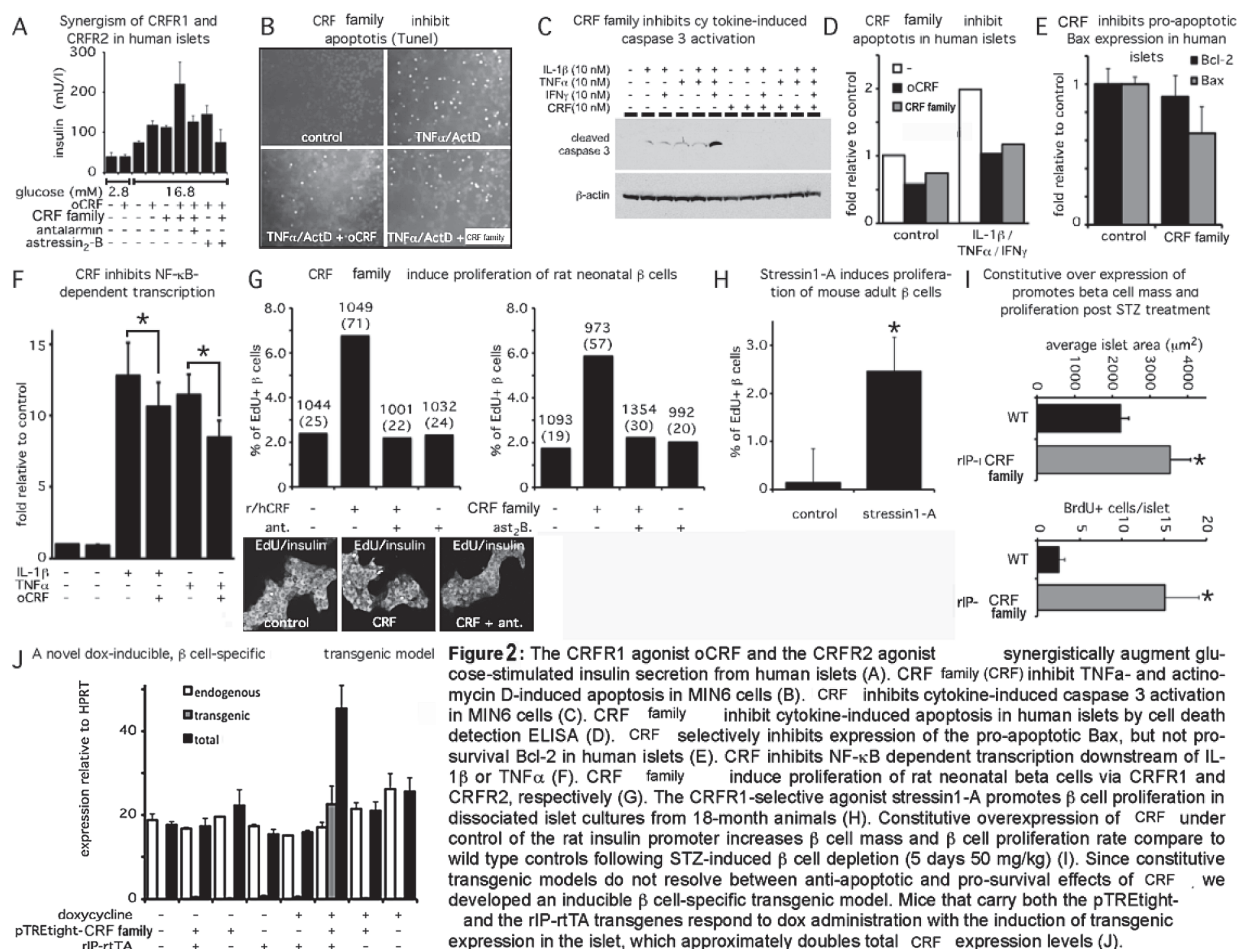


図 2.

(図2 B, C, E). CRFR2を生体マウスで活性化した遺伝子改変マウスにおいて膵島の肥大およびBrdU取込み率の上昇が認められた(図2 I). 興味深いことにCRFファミリーは膵内分泌前駆細胞内に発現する転写因子Ngn3遺伝子の発現を調節することを見出した.

考 察

現在の食餌療法・抗糖尿病薬やインスリン投与等では合併症の併発の遅延効果を主体とした治療法であるため根本治療を目指した治療としては不十分である. また膵臓・膵島を用いたβ細胞の移植治療では必要な細胞数の確保が困難であることに加え組織適合性による拒絶反応など深刻な問題があり, iPS細胞やES細胞を用いた再生医療実用化には至っておらず, 糖尿病の発症機序はもとより膵臓β細胞の発生・分化の詳細な分子機構については多くの不明な点が残されている. 近年 GPCRクラスB受容体GLP-1受容体のアゴニストであるExendin-4やGLP-1を分解するプロテアーゼを標的とするDPP-4阻害剤がインスリン分泌を促進し, グルカゴン分泌を抑制することから臨床的な実用化が行われている. しかし, 服用患者の約40%に嘔吐などの副作用が認められるなど, これら対症療法に置き換わるような画期的な再生医学プロトコルの開発が必要とされている. コルチコトロピン放出因子(CRF)は, 視床下部より分泌されHPA(視床下部-下垂体-副腎)経路を介して, ストレス応答を制御しているため, 受容体欠損マウスでは鬱病耐性になることから神経科学的に重要なホルモンである. これまでの著者らのグループおよび本研究の成果により, CRFファミリーが膵臓β細胞の機能を促進すること, 増殖を誘導すること, アポトーシスを抑制することより, 体系的にβ細胞の品質と機能を管理し恒常性を維持する重要な役割を担う可能性が示唆された. また, ストレス状況下におけるCRFファミリーが選択的に受容体を介したシグナル伝達機構により, 一方のホルモンが不足または過剰になった場合に備え, 互いに協調し合いインスリン分泌を調節し血糖値を厳密にコントロールしている可能性が考えられる. 今後, 糖尿病モデルマウスの解析による実用性の証明により, 神経ペプチドCRFファミリーによる糖尿病の再生医療への応用が期待される.

研究成果リスト

論文

- 1) Huising MO, Pilbrow AP, Matsumoto M, van der Meulen T, Park H, Vaughan JM, Lee S and Vale W. Glucocorticoids differentially regulate the expression of CRFR1 and CRFR2 α in MIN6 insulinoma cells and rodent islets. *Endocrinology* 2011;152:138-50.
- 2) Neda T, Inukai K, Kurihara S, Ono H, Hosaka T, Nakamoto H, Katayama S, Awata T. Hypoglycemic effects of colestimide on type 2 diabetic patients with obesity. *Endocr J* 2012;59(3):239-46.
- 3) Inoue T, Kozawa E, Okada H, Inukai K, Watanabe S, Kikuta T, Watanabe Y, Takenaka T, Katayama S, Tanaka J, Suzuki H. Noninvasive evaluation of kidney hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1429-34.
- 4) Ito D, Inukai K, Sumita T, Ono H, Katayama S, Awata T. Regulation of pigment epithelium-derived factor (PEDF), an insulin resistance-inducing adipocytokine in 3T3-L1 adipocytes. *J Diabetes Metab* 2011;2:1000151.

学会発表

- 1) Hirasaki M, Huising MO, van der Meulen T, Shimizu M, Nogi Y, Vale W and Matsumoto M. Divergent regulation of pancreatic endocrine cell differentiation from endocrine progenitor cell line Tec-3p cells, 71th 米国糖尿病学会(ADA), 2011 June, San Diego
- 2) 加藤直樹, 松本征仁, 緒方正人, 禾泰壽, 酒井宏哉, 織田弘美. 生体内のp38MAPKの酵素を介したシグナル伝達経路に神経再生制御因子が存在する, 第22回日本抹消神経学会学術集会, 平成23年9月, 沖縄
- 3) Matsumoto M, Huising MO, van der Meulen T, Hirasaki M, Vale W. Notch-mediated epigenetic regulation is critical for maintenance of pancreatic endocrine progenitors via possible integration with HB-EGF and CRF-family. 第34回日本分子生物学会年会, 平成23年12月, 横浜