

Ⅱ. 分担研究報告書

インスリン分泌細胞の機能・分化増殖に関する研究、糖尿病網膜症に関わる新規分子の探索、および統合的解析のための臨床パネルの構築

主任研究者 安田 和基 国立国際医療センター研究所・部長

研究要旨：糖尿病の発症・進展において重要な、「インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償とその破綻」のメカニズムを解析するための基盤的な系を構築する。まず「量的代償」の基盤として、新生仔ブタ膵から SP (side population) 細胞を単離することにより、未分化な内分泌前駆細胞の候補を高効率で得ることを示し、長期培養が可能なこと、glucagon, somatostatin, PP (pancreatic polypeptide) の発現まで分化を誘導できることを示した。一方「質的代償」については、膵β細胞株を用いて、グルコース反応性インスリン分泌が低下するがアポトーシスは増加しない脂肪毒性の系を構築し、「善玉アディポサイトカイン」とされるアディポネクチンがそのβ細胞機能を改善させることを示した。さらに膵β細胞特異的な遺伝子発現調節の分子機序解明のために、世界で初めて膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーを作成し、クローンの解析を行った。

一方糖尿病合併症については、網膜色素上皮に注目して高グルコース濃度で発現が誘導される遺伝子を網羅的に解析し、糖尿病網膜症に関わる可能性のある新規候補分子を同定した。

主任研究者として、本研究全体の成果を吟味して臨床へ還元するために、個体レベルの統合的な解析を可能にする臨床パネルの構築を行った。

A. 研究目的

過食・高脂肪食・運動不足などの環境因子によってインスリン抵抗性を生じても、相対的インスリン分泌不全を来さなければ糖尿病を発症しない。糖尿病の慢性に進行する経過において、その発症・進展に最も重要なのは、「インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償の破綻」である。膵β細胞

の代償機序には、質的代償（インスリン分泌亢進）と量的代償（膵β細胞量の増加）があるが、代償機構とその不全の分子メカニズムは未だ不明な点が多い。ここでは、膵β細胞の代償あるいは破綻のモデルを構築してその分子メカニズムを探るとともに、きわめて高度に分化した膵β細胞機能の分子基盤を解析する。

β 細胞の「量的代償」については、既存の β 細胞の増殖と、膵に内在する未分化な前駆細胞からの増殖分化が重要と考えられている。後者の膵幹細胞・内分泌前駆細胞については、インスリン抵抗性への代償に限らず、生理的なインスリン分泌パターンを有する β 細胞を体内で半永久的に供給するリソースとしても注目されるが、その存在は推定されているものの本体はほとんど明らかでない。そこで、ブタ膵を用いて、その同定と解析、および分化誘導を試みる。

実験室レベルで遊離脂肪酸 (FFA) は、膵 β 細胞に対して、急性刺激ではインスリン分泌を増強することが知られているが、長期あるいは高濃度刺激は、インスリン分泌低下、細胞死を含む膵 β 細胞障害を生じ、「脂肪毒性 (lipotoxicity)」と呼ばれている。臨床的にも前糖尿病段階から高 FFA 血症を多く認めることから、FFA が相対的インスリン分泌不全発症に関与している可能性が指摘されている。そこで、特に「質的代償」の部分に注目した脂肪毒性の系を *in vitro* で再現し、そのメカニズムや防止策を検討する。

インスリン分泌臓器である膵 β 細胞は、高度に機能分化した組織であるが、こうした代償機構を解析するためには、 β 細胞におけるきわめて特徴的な遺伝子発現調節機構の解明が同時に必要になる。たとえば膵 β 細胞特異的に発現する遺伝子が存在するほか、機能的に非常に重要な遺伝子のなかには、グルコキナーゼや HNF4 α など β 細

胞特異的なプロモータを利用する遺伝子もある。糖を中心とした代謝制御システムや、糖尿病の病態の解析においても、その遺伝子発現調節機構、および発現タンパクの機能解析は、きわめて重要である。そこで、膵 β 細胞の完全長 cDNA ライブラリーを作成して、特異的な遺伝子転写調節の分子基盤を解明する。

また、糖尿病患者において、問題となるのは合併症であり、生命予後だけでなく、QOL や健康寿命などにも深く関係する。ここでは、いくつかの分子や細胞の関与が報告されているがまだ全貌が明らかでない糖尿病網膜症に注目し、高血糖からの新規の分子メカニズムを探るために、網膜色素上皮細胞に注目した *in vitro* の系を用いて検討する。

糖尿病・代謝疾患の病態は非常に複雑であり、こうした基盤的な研究成果を、個体レベルで検証し臨床へ還元するには、これまでのようにゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームなど各レベルでの成果を個別に検討するのでは不十分である。そこで、こうしたさまざまな知見を統合して、動的な病態を真に理解するための臨床パネルを作成する。

B. 研究方法

1) 膵組織幹細胞・内分泌前駆細胞の単離同定と、その分子的解析 (協力研究者: 谷口繁生)

日本では、研究を目的としたヒト膵組織

の大量入手は不可能であるが、我々は、入手において、量の点でもまた倫理的問題がほとんどなく、かつインスリン分泌反応がマウスなどに比べてよりヒトに近いとされる、ブタの膵内分泌細胞を研究材料とした。近年、Hoechst33342 色素の高排出能を指標として分離される SP (side population) 細胞群に、多分化能を有する組織幹細胞が多く含まれると報告され、抗体を用いない簡便で高効率な幹細胞回収法として注目されている。また、新生仔ブタ(生後3日以内)の膵は、腹側膵と背側膵がまだ融合していない組織発生の途中段階にあることから、細胞の増殖、分化の盛んな未熟な内分泌細胞や膵内分泌前駆細胞が、成体ブタに比べて豊富に存在している可能性がある。そこで、新生仔ブタ膵臓から SP 細胞を回収してその性質を調べ、膵組織幹細胞または内分泌前駆細胞を簡便にかつ高い効率で分離できないかどうか検討した。

(1) 生後3日以内の新生仔ブタ膵を細切後、リベラーゼを用いて消化し、消化後の組織を Histopaque 1077 を用いた密度勾配遠心にかけ、必要な細胞の層を回収した。回収した細胞を Hoechst33342 存在下に 37 °C でインキュベートし、その後フローサイトメーター(Beckman Coulter 社の EPICS ALTRA)を用いて SP 細胞を単離し、培養した。回収した SP 細胞は、1 コもしくは数十コずつ、何種類かのコーティングされた培養プレ

ートにまき、DMEM/F-12 (1:1) 混液をベースとした培養液中で培養を行った。

(2) SP 細胞および培養細胞の性質を、我々が作製したブタ cDNA 配列特異的なプライマーを用いた RT-PCR を用いて調べた。データベースに登録されている遺伝子、あるいは協力研究機関である東京女子医大においてすでにブタ cDNA 部分配列などが全長がクローニングされていた遺伝子に加え、解析に必要となるいくつかの遺伝子については、ヒト、マウス、ラットの遺伝子配列をもとに、保存された部分を手がかりとしてプライマーを設計してブタ RNA をもとに RT-PCR を行い、ブタの遺伝子を部分クローニングし、改めて配列特異的なプライマーを作製した。

(3) 上記 SP 細胞、およびソーティングにかけなかった non-SP 細胞からそれぞれ RNA を抽出したのち、T7 による増幅反応を利用した two-cycle labeling kit を用いて cRNA プローブを作製し、Affymetrix 社の GeneChip システム、Porcine Genome Array (約 23,250 コのブタ転写産物を含む)を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(4) SP 細胞について、20個ずつ、あるいは単一細胞の状態での長期培養を試みた。また、さまざまな増殖因

子や化合物 (EGF、bFGF、activin A、betacellulin、GLP-1、HGF、IGF-I、retinoic acid、nicotinamide、forskolin など) を添加した条件や、コーティング素材の異なるプレートを用いて、ホルモン産生内分泌細胞への分化条件を検討した。

2) 膵β細胞における脂肪毒性系の確立 (協力研究者：泉和生)

膵β細胞における脂肪毒性は広義の概念だが、明らかなアポトーシスが生じる前に、まずグルコース反応性インスリン分泌 (glucose-stimulated insulin secretion: 以下 GSIS) が低下するのが最初の徴候とされる。この現象は、質的代償が障害される最も初期の段階であり、かつ可逆的な時期と考えられていることから、治療介入の最も良い標的と考えられるので、この段階の「脂肪毒性」系の構築を試みた。研究用の膵β細胞由来の培養細胞株はいくつか存在するが、グルコース反応性インスリン分泌など膵β細胞の重要な性質を保ち、現時点で最も生理的な膵β細胞に近いとされるラット INS-1D 細胞 (Dr Wollheim、及び東京大学関根信夫博士より供与) を用いた。脂肪酸としては、パルミチン酸を使った。

- (1) INS-1D 細胞に様々な濃度のパルミチン酸を加えて培養したのち、グルコース反応性インスリン分泌、インスリン含量、アポトーシス (dsDNA による) を測定し、上記のよ

うな定義に合致する脂肪毒性の系として最も有用な条件を設定した。

- (2) 上記で設定した脂肪毒性の系について、インスリン分泌の低下のメカニズムを検討するために、ATP 量などを測定した。
- (3) この脂肪毒性系について、大腸菌を用いて発現・精製したアディオネクチン蛋白 (東京大学糖尿病・代謝内科門脇孝教授グループより供与) を作用させることにより、β細胞機能に与える影響を検討した。

3) 膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの作成とその解析

膵β細胞の機能調節の分子基盤を解明するために、完全長 cDNA ライブラリーを作成し、そのクローンの解析を行った。なお、この項目は、日立計測器サービス (現：日立ハイテクノロジーズ) のグループの協力を得て行った。

- (1) ラット INS-1D 細胞について、通常の medium で培養した後 total RNA を抽出し、V-キャッピング法 (DNA Res 12:53-62, 2005) により、完全長 cDNA ライブラリーを作成した。このライブラリーを、electroporation 法にて大腸菌に導入したのち、トランスフォーメーションを行い、クローンをランダムピックする。精製したプラス

ミドについてベクター (pGCAP-1) 特異的なプライマーを用い、5'-側 one pass シークエンス解析を行う。

- (2) 一方、primary 組織由来として、成体ブタ臍から、Histopaque を用いて分離した初代臍内分泌細胞を、さらに 10mM Nicotinamide 存在下で 7~10 日ほど培養して fibroblast を完全に取り除いた後、total RNA を抽出した。この細胞は、fibroblast を除去してあるが、 β 細胞のほか、 α 細胞も含む。同じく V-キャッピング法を用いて完全長 cDNA ライブラリーを作成した。

4) 糖尿病網膜症における網膜色素上皮細胞の役割の検討 (協力研究者: 横内裕敬)

網膜色素上皮細胞 (Retinal pigment epithelial cell: 以下 RPE 細胞) は、網膜の最外層に存在し、基本的には上皮細胞の特性を保持しているが、神経組織である感覚網膜と、脈絡膜との間にあって、両者の代謝物質の輸送や、blood-retinal barrier などの役割のほか、さまざまな機能を有している。糖尿病網膜症における役割は、ほとんど解析されていないが、血管新生抑制因子である PEDF (pigmented epithelial cell derived factor) を分泌すること、増殖性網膜症などで病態に寄与する VEGF (vascular endothelial growth

factor) などの発現が亢進していること、が知られている。また増殖性硝子体網膜症においては、RPE 細胞が硝子体内に遊走し、PDGF-like protein で増殖刺激をうけ fibroblast 様細胞に transform し、コラーゲンとともに増殖膜を形成することが要因とされている。そこで、RPE 細胞の糖尿病網膜症における役割をより詳しく解析する目的で、高グルコース濃度により発現が調節される遺伝子を網羅的に解析した。

- (1) RPE 細胞のモデルとして汎用されているヒト ARPE-19 細胞 (ATCC, No. CRL-2302) を用いた。グルコース濃度で発現が変化する遺伝子を得ることとした。ARPE-19 細胞を 140mg/dl (LG)、315mg/dl (HG) と異なる濃度のグルコースを含む DMEM/F12 培地で 48 時間培養した後、Trizol 試薬 (Invitrogen) で total RNA を抽出し、Affymetrix 社 GeneChip システムのプロトコールに従い cRNA プローブを調製し、Human Genome U133A, B アレイを用いて解析した。
- (2) HG で発現が亢進した遺伝子のうち、分泌タンパクに注目して、発現解析用 TaqMan プローブ (AB 社) を用意し、AB 社 7900HT を用いたりアルタイム RT-PCR により、発現変化を確認した。
- (3) 特に興味深い遺伝子 J (分泌タンパク) について、グルコース濃度を

さらに細かく変化させ、発現変化を検討した。この遺伝子 J は、他の臓器で PPAR γ による発現調節が知られていたため、PPAR γ アゴニスト (Ciglitazone)、アンタゴニスト (GW9662, BADGE, ; いずれも Tocris) による発現変化を、それぞれ LG、HG 培地で TaqMan 法により確認した。

- (4) 遺伝子 J についてはリコンビナントヒトタンパクが発売されていたので、ヒト網膜血管内皮細胞 (Cell System RE cells, 大日本製薬 : Lot RI-181) に対する血管新生作用を検討した (本年度は予備的な検討にとどめた)。具体的には、管腔形成 (BD バイオコートアンジオジェネシス血管内皮細胞 tube 形成アッセイシステム (354149))、増殖 (ナカライテスクー Cell Count Reagent SF (07553-15))、遊走 (BD バイオコートアンジオジェネシス血管内皮細胞遊走アッセイシステム (354143))、浸潤 (BD バイオコートアンジオジェネシス血管内皮細胞浸潤アッセイシステム (354141))、透過性 (Chemicon - In vitro vascular permeability Assay Kit (71000-00 ECM640)) の 5 項目について検討した。ポジティブコントロールとして、ヒト VEGF タンパク (293-VE: R&D

Systems) を用いた。

(倫理面への配慮)

研究に用いたヒト試料は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」に準拠し、倫理委員会の承認および本人の同意を得て使用した。

C. 研究結果

1) 臍組織幹細胞、内分泌前駆細胞の単離同定と、その分子的解析

(1) 新生仔ブタ臍からの SP 細胞の回収

SP 細胞を回収する際の最適条件は、動物種および組織によって違いがあると言われていることから、細胞のインキュベート時間、使用する色素濃度について検討を行い、最適の条件を決定した。新生仔ブタ臍由来細胞をその条件下にインキュベートした後、フローサイトメーターを用いて SP 細胞の回収を試みたところ、再現性よく SP 細胞を得ることができた。収量は約 0.1% であった (図 1)。

(2) 臍由来 SP 細胞の増殖

得られた SP 細胞を単離し、培養により増殖させることも可能であった。コーティング素材の異なる数種類の培養プレートを用いて検討を行い、type I collagen をコートしたプレートで、細胞の高い増殖能を確認した。また、

fibronectin および type IV collagen をコートしたプレートにおいても、無処理のプレート、および、poly-L-lysine、laminin コートしたプレートに比べて高い増殖能が確認できた。さらに、細胞の培養液についても、ベースとなる培養液の種類およびそこに添加する成長因子などについて検討を行い、10 % ウシ胎仔血清を含む DMEM/F-12 (1 : 1) 混液を用いることにより、細胞がよく増殖することがわかった。10 % に満たない確率ではあるが、SP 細胞 1 コから増殖するものも見られた。また、増殖する細胞においては、2 ヶ月以上継代培養可能であり、増殖能の高いものでは、1 年以上の継代が可能であった。

(3) 膝由来 SP 細胞における遺伝子発現の解析 (RT-PCR) (図 2)

現在までに 30 コのブタ遺伝子 (表 1) について、独自にクローニングした部分 cDNA 配列などをもとにプライマーを作製した。RT-PCR により、単離したばかりの SP 細胞群について発現遺伝子を調べたところ、まず、SP 細胞としての性質を示す要因と考えられている *abcg2/bcrp1* (ABC トランスポーター) の高い発現が確認できた。また、分化した細胞の存在を示唆する内分泌ホルモンの発現も見られた。さらに、何度かの発現遺伝子解析の結果、大部分のものに *pdx-1* の発現が見られ

なかったものの、およそ半分の割合で、内分泌前駆細胞のマーカールと考えられている *neurogenin3* の発現が見られた。

(4) 膝由来 SP 細胞の増殖・分化にともなう遺伝子発現の解析 (図 3)

培養により増殖する細胞は、*insulin* や *glucagon* のようなホルモンの発現は見られなくなったが、多くの細胞において *pdx-1* の発現が見られるようになり、*neurogenin3* の発現も見られた。ただ、ほぼ全ての細胞群において、*somatostatin* (δ 細胞のマーカール)、*pancreatic polypeptide* (PP 細胞のマーカール)、*amylase* などの発現も見られたことから、一部に継代培養の過程において分化してしまう細胞が存在すると予想された。さらに、培養期間が 6 ヶ月を超える細胞においては、大部分で内分泌ホルモンの発現は見られなくなった。また、*pdx-1* の発現が見られる細胞、見られない細胞、*neurogenin3* の発現が見られる細胞、見られない細胞が存在することから、どの分化段階の細胞が高い増殖能を維持しているのかが特定できない状態にある。ただ、分化を誘導することにより、*glucagon*、*somatostatin*、*pancreatic polypeptide* の発現が見られるようになる。このとき、外分泌細胞のマーカールとなる *amylase* の発現は維持されていた。現在、増殖する細

胞を insulin 発現細胞へと分化誘導するために、培養液へのいくつかの成長因子の添加を試みたり、培養プレートを変えてみるなどその方法を検討中である。

(5) Gene Chip システムを用いた 膵由来 SP 細胞のトランスクリプトーム解析

SP 細胞は少ないので、回収される RNA は微量であるが、two-cycle target labeling 法による増幅の結果、GeneChip 解析が可能となった。ブタアレイを用いた SP 細胞と non-SP 細胞の比較解析により、SP 細胞において発現が増加・減少している遺伝子が、それぞれおよそ 130 コと 70 コ見出された。

2) 膵 β 細胞における脂肪毒性系の確立

(1) β 細胞株 INS-1D 細胞のインスリン分泌能について、0.35mM PA (+0.5% BSA) の 120 時間刺激により、グルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) は、40-50% 抑制されるが、細胞死は生じない脂肪毒性モデルを作成した (図 4)。この系では、グルコースからの ATP 産生は低下していた。このモデルは、臨床的に治療介入可能なステージのモデルと考えることができる。

(2) PA 刺激終了前の 24 時間を生理的濃度の AN で共刺激を加えておくと、インスリン含量の回復とインスリン分泌率の有意な増加が認められ、GSIS が増強し、脂肪毒性を解除した (図 5)。AN の GSIS 増強効果は脂肪毒性下でより強く認められ、最大で 3.7 倍に増加した。グルコースに対する ATP 産生は PA 刺激によって抑制されたが、AN 刺激を加えることで部分的な回復を認めた。PA 刺激(-)条件では、AN 刺激によって ATP 産生に有意な変化を認めなかった。

3) 膵内分泌細胞由来 cDNA ライブラリーの作成とその解析

(1) INS-1D 細胞由来 cDNA ライブラリーについて、シークエンスが得られた約 9000 クローンのうち、インサートが確認されたものは 89%、本法の原理を応用して (転写開始点の G が付加などから) 完全長 cDNA と判定されるクローンは約 70% にのぼった。もっとも頻度が高かったクローンはインスリン 1 であり、アミリン、タンパク変換酵素 (PC1/3、PC2) など多かった。全体は 3329

クラスターに分類され、うち singleton は約 2200 であった。これらについて既存のデータベースに対する BLAST サーチなどの検討を行うと、既知遺伝子だが、既報より上流に転写開始点が存在するクローン、いずれの遺伝子とも明らかな相同性を有さない新規遺伝子と思われるクローンなども存在した。さらに、明らかな ORF をもたないと見られる non-coding RNA の候補も存在した。

- (2) 成体ブタ膵内分泌細胞由来の完全長 cDNA ライブラリーについて、予備的な 96 クローンの one pass シークエンス解析を行った。約 5 割がインスリンかグルカゴンであった。その理由としては、本ライブラリー作成時に、敢えて mRNA のサイズで分画 (size fractionation) をしていない影響もあると思われるが、詳細は不明であるが、現段階でシークエンスのショットガン解析は中断した。一方で、これまで膵 β 細胞における発現が全く知られていなかったクローンや、全く新規と思われる遺伝子も含まれていた。ブタはゲノムがまだ完成してい

ないため、novel clone の判定や、転写開始点の決定にはやや慎重である必要があるが、現時点で大動物膵内分泌細胞由来の唯一の完全長 cDNA ライブラリーとして有用性が高い。

4) 糖尿病網膜症における網膜色素上皮細胞の役割の検討

2 度の実験で遺伝子発現量が有意に変化したものは 61 個であり、このうち高グルコースで亢進が 19 個、低下が 42 個であった。亢進した遺伝子群の中には分泌タンパクが 3 個あり、糖尿病網膜症と関連する報告のある分子はなかったものの血管新生に関係があると報告されている分子も含まれていた。

この中のある分泌タンパク遺伝子 J についてさらなる解析を加えた。まず、グルコース濃度依存性に発現が増加することが認められた (図 6)。この遺伝子は、ほかの臓器にて PPAR γ の標的遺伝子であることが知られていたもので、高グルコース濃度による発現誘導が、PPAR γ に依存しているかどうかを検討した。低グルコース濃度 (lowG) では確かにアゴニスト刺激により発現が上昇したが、高グルコース濃度 (high G) ではアゴニスト刺激による発現のさらなる増加は見られず (図 7)、またアンタゴニストは高グルコース濃度 (high G) による発現誘導をシャットオフできない。以

上から、RPE 細胞においては高グルコース刺激により既知の遺伝子発現誘導メカニズムとは別の制御をうけている可能性が示唆された。また、網膜血管内皮に対して、単独で管腔形成作用がみられ、血管新生作用をもつことが示唆された（他の作用については検討中）。

5) 臨床パネルの作成

これまでも、ミレニアムプロジェクト(糖尿病患者約800名、対照約500名)やプロテオームファクトリー事業等で、臨床情報を整備したパネルを構築してきたが、上記の目的のために、さらに多角的な解析が可能な臨床のリソースづくりを進めており(厚生労働省バイオリソースバンク構想)、ゲノムと血清のペア、同一患者での治療入院前後での血清、などを進めている。

D. 考察

1) 膵組織幹細胞・内分泌前駆細胞の単離同定と、その分子的解析

現在、我が国では、2型糖尿病に対して、外因性にインスリンを投与したり、残存する膵内分泌細胞を刺激して内因性のインスリンを分泌させたりする治療法が広く行われているが、合併症の発症および進行を完全には防ぐことができず、必ずしも十分な治療効果をあげているとは言えない。理想的には、内在する膵内分泌前駆細胞を増殖、分化、維持させ、機能的な膵内分泌細胞を十分保つことにより、生理的なインスリン

分泌パターンを再現することが最も効果的な治療法であると考えられる。しかしながら、ヒト膵内分泌細胞の機能、増殖、および膵内分泌前駆細胞に関する研究は遅れているが、ブタ膵は、インスリン分泌反応がマウスなどに比べてよりヒトに近いとされており、ヒト膵研究の代替モデルとして最適である。

今回我々は、ブタ膵における SP 細胞の存在を初めて明らかにした。回収した SP 細胞群は、RT-PCR による発現遺伝子を見る限り、膵内分泌ホルモン、外分泌細胞、繊維芽細胞、膵管細胞などのマーカー、および、様々な分化段階の転写因子の発現が見られるなど、いくつかの種類のもしくは異なる分化段階にある細胞が混在した不均一な集団であると予想された。しかしながら、回収した SP 細胞の中には、増殖能の高い細胞が存在し、それらの細胞は、未分化な膵組織幹細胞/内分泌前駆細胞としての性質を持った細胞であると考えられたので、こうした細胞を高比率で分離する方法として、非常に有用であると思われる。今後、さらなる詳しい分子的解析、および長期継代培養により分化能など細胞の性質が変化していないのかなどの検討が必要であり、平成 17 年度から可能になった網羅的遺伝子発現解析は、きわめて有力な解析手段といえる。

一方、現在までに、さまざまな分化誘導法の検討を行ってきたが、未だインスリンを発現する最終的な分化を誘導するには

至っていない。この段階から成熟した内分泌細胞へと分化誘導できれば、インスリン発現細胞へと分化誘導する際のカギとなる遺伝子/蛋白の同定、も可能になると考えられる。

また、ごく最近、約1週間培養した後の新生仔ブタ膵細胞からのSP細胞回収・培養にも成功しており、平成18年度以降、この方法を応用して、より高純度かつより高効率にSP細胞を回収することを検討していく。

2) 膵β細胞における脂肪毒性系の確立

昨今の糖尿病患者の急増の原因として、環境因子の関与が重要である。その中での代表とされる食事について、日本人の摂取カロリーは過去30年ほとんど変化していないが、西洋式ライフスタイルにより、摂取カロリーに占める脂質の割合が急増しており、いわゆる「高脂肪食」が糖尿病の発症・進展に密接に関連している。

遊離脂肪酸(FFA)は、糖尿病患者、あるいは前糖尿病でも肥満やインスリン抵抗性の患者の血中で濃度が上昇しており、またこうした高脂肪食によっても増加すると考えられる。

膵β細胞に対する広義の「脂肪毒性」は、分泌反応の低下と細胞死までを含み前者はさらに初期の、グルコース反応性インスリン分泌(GSIS)の低下から、インスリン含量・合成の低下まで広く含んでいる。これらは「糖毒性(glucotoxicity)」とのア

ナロジーから考えると、GSISの低下の段階がreversibleであり膵β細胞を保つべく介入するのに最適な段階といえる。今回構築した、パルミチン酸長期刺激により、GSIS低下は生じているが細胞死はほとんど生じていない系は、脂肪毒性の研究において、また診断治療上きわめて有用性が高い。

また、アディポネクチンの外因性補充がこの系に対してGSISなどの改善作用を示したことは病態の上からも治療面からも大変興味深い。アディポネクチンは肥満やインスリン抵抗性糖尿病等の状態ではむしろ発現や分泌が低下しているとされており、インスリン抵抗性下での膵β細胞の障害に一役買っている可能性がある。

一方で、このアディポネクチンによる脂肪毒性解除作用では細胞内中性脂肪含量が増加すること、AMPキナーゼ(AMPK)を活性化する薬剤では同様の効果がみられないことなど、従来のアディポネクチンの作用機序では必ずしも一方的に説明しにくいデータもpreliminaryに得ており、今後この分子メカニズムの説明が新しい治療への応用も含めて重要と思われる。

3) 膵内分泌細胞由来cDNAライブラリーの作成とその解析

近年世界各国でようやく完全長cDNAの収集が、多くの組織で行われつつあるが、膵β細胞については、その量の少なさのためにこうした対象から漏れており、解析が

なされていない。

一方膵ラ氏島の発現遺伝子解析では、「PancChip」(米国)の作成などの試みがみられるが、これまで膵β細胞の完全長cDNAライブラリーの報告はない。今回用いたV-キャッピング法は、日本で開発された方法であり、微量のRNAからでもPCRによる増幅を用いずにライブラリー作製が可能で、転写開始点を高率にとらえられることが、大きな特徴であり、膵β細胞には非常に適しているといえる。

完全長cDNAライブラリーを用いる利点としては、下記のようなことがあげられる。

- (1) ゲノム転写開始点を決定し、特に、膵β細胞特異的なプロモータ領域を同定し、遺伝子転写調節機構を明らかにする。
- (2) 膵β細胞の機能に重要なタンパクの機能解析や相互作用解析を行う。
- (3) 膵β細胞に発現するnon-coding RNAを同定し、その発現調節や機能を解析する。
- (4) 候補遺伝子の発現調節領域を同定し、そのSNP(rSNP: regulatory SNP)解析による、ヒト2型糖尿病の遺伝素因、特に環境因子との関連の解析を行う。

さらに、我々は、世界で最も汎用されている培養細胞株(INS-1細胞)と、primaryの組織(ブタ膵内分泌細胞)の、両者を用いてライブラリーを作成しており、現

時点で世界で最もすぐれた研究システムと考えられる。

平成18年度以降は、特に転写調節エレメントに注目し、「膵β細胞特異的」な転写調節領域の解析、分化増殖に関わる調節領域、栄養素やシグナルなどの反応性領域の探索を、in silico解析をも駆使して予定している。膵β細胞に発現するnovelなクローンについては、まずタンパクをコードするcDNAの場合、完全長cDNAの利点を活かして強制発現も可能であり、一方、タンパクをコードしない「non-coding RNA」も、近年哺乳類でも発生・分化・細胞機能において何らかの重要な役割を持つことが推定されているので、RNAiを用いたノックダウンを中心に、細胞phenotype(特にグルコース反応性インスリン分泌)への影響を検討する。

これにより、膵β細胞における全く新規の遺伝子発現調節機構や新しい機能をもつ遺伝子・タンパクが明らかになり、糖尿病代謝疾患の本質の理解にも資すると期待される。

4) 糖尿病網膜症における網膜色素上皮細胞の役割の検討

糖尿病合併症は血管病と考えられるが、糖尿病性腎症におけるメサンギウム細胞など、臓器合併症は血管をとりまく周辺細胞も大きく関与すると考えられる。網膜症に

おける RPE 細胞は、これまで注目されていなかったが、PEDF などの血管新生抑制因子がこの細胞の名前がされていることなどからも明らかなように、生理活性物質を分泌して局所に作用している可能性がある。今回得られた、高グルコース濃度で発現が亢進する遺伝子のなかに分泌タンパクがいくつか含まれたことは、こうした仮説を支持する。特に、血管新生活性の可能性が見られたある分泌タンパク遺伝子 J は、200mg/dl 以下でもグルコース濃度依存性に発現が増加することから、臨床的に十分な血糖コントロールを得られていない状態では発現が増加している可能性が考えられた。この分子の受容体はまだ同定されていないが、病態に関与している可能性が期待されるので、今後、タンパクが実際に細胞外に分泌されているかどうか、糖尿病網膜症の硝子体液中で濃度が上昇しているかどうかを検討してゆきたい。

5) 臨床パネルの作成

最終的に、糖尿病を個体レベルで「成因＋病期」としてとらえるためには、遺伝因子解析のためのゲノム解析、病期をとらえるためのトランスクリプトーム、プロテオーム解析、詳しい経時的な臨床情報をあわせた解析などが必要になる。このうち、病期の解析について、糖尿病では、罹患した臓器そのものは得られず、血清・尿程度しか実用的にえられないが、ゲノムや臨床情報とあわせて統合的に解析する必要がある。

今回、構築しているパネルは、こうした目的に大変有用なものと期待される。

E. 結論

「インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償とその破綻」のメカニズムを解析するための基盤的な系を構築した。まず「量的代償」の基盤として、新生仔ブタ膵から SP (side population) 細胞を単離することにより、未分化な内分泌前駆細胞の候補を高効率で得た。一方「質的代償」については、膵β細胞株を用いて、グルコース反応性インスリン分泌が低下するがアポトーシスは増加しない脂肪毒性の系を構築し、アディポネクチンがそのβ細胞機能を改善させることを示した。さらに膵β細胞特異的な遺伝子発現調節の分子機序解明のために、世界で初めて膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーを作成し、クローンの解析を行った。

一方糖尿病合併症については、網膜色素上皮に注目して糖尿病網膜症に関わる可能性のある新規候補分子を同定した。

さらに本研究全体の成果を吟味して臨床へ還元するために、個体レベルの統合的な解析を可能にする臨床パネルの構築を行った。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K, Yuo A. PPAR γ ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells. **Dev Growth & Differentiation**, in press.
- 2) Ihara K, Miyako K, Ishimura M, Kuromaru R, Wang HY, Yasuda K, Hara T. A case of hyperinsulinism/hyperammonaemia syndrome with reduced carbamoyl-phosphate synthetase-1 activity in liver: A pitfall in enzymatic diagnosis for hyperammonaemia. **J Inherit Metab Dis** 28(5):681-7, 2005.
- 3) Fukusima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Ozawa S, Hasegawa R, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, Kawamoto M, Kamatani N, Suzuki K, Yanagawa T, Tohkin M, Sawada J. Genetic variations and haplotypes of *CYP2C19* in a Japanese population. **Drug Metab Pharmacokinet**, 20(4):300-7, 2005.
- 4) Yamashita R, Yasuda K, Kaburagi Y. Proteomic analysis of proteins secreted from hepatocytes. **J Mass Spectrom Soc Jpn** 3: 164-168, 2005.
- 5) Yamashita R, Fujiwara Y, Yuan X, Yasuda K, Kaburagi Y, 2-DLC-MS/MS analysis of secreted proteins from Hep

G2 cells: combination with various sample preparation methods before in-solution trypsin digestion. **J Electrophoresis** 49:1-4, 2005.

2. 学会発表

(国内)

- 1) 長崎啓祐、菊地透、樋浦誠、王賀瑤、浅輪孝幸、鴨井久司、安田和基：「4世代にわたり糖尿病と遺伝子異常を確認し得た日本人 MODY2 家系」、第48回日本糖尿病学会年次学術集会、2005年5月、神戸。
- 2) 山下亮、泉和生、野田光彦、安田和基、鏑木康志：「遊離脂肪酸を長時間刺激した INS-1 細胞のプロテオーム解析」、同上。
- 3) 平山愛子、土谷まり子、谷口繁生、安田和基、川上麻理子、梅澤一夫、大河原久子：「新生仔ブタ膵 (Stem/Precursor) 細胞の分化におよぼすコノフィリンの作用」、同上。
- 4) 谷口繁生、大河原久子、土谷健、土谷まり子、大河内仁志、鏑木康志、安田和基：「新生仔ブタ膵臓から単離した SP (side population) 細胞の性質の検討」、同上。
- 5) 泉和生、野田光彦、岡本昌之、山内敏正、鏑木康志、門脇孝、安田和基：「膵 β 細胞株 INS-1D の脂肪毒性に対するアディポネクチンの効果」、同上。
- 6) 横内裕敬、山本修一、武田憲夫、鏑木康志、安田和基：「高グルコース環境によるヒト網膜色素上皮細胞の遺伝子発現変動の解析」、同上。
- 7) 谷口繁生、大河原久子、土谷健、土谷

まり子、大河内仁志、笹月健彦、鏑木康志、
安田和基：「新生仔ブタ膵臓からの SP 細胞
の単離とその性質の検討」第 42 回日本臨床
分子医学会学術集会、2005 年 7 月、京都。

- 8) 山下亮、泉和生、野田光彦、安田和基、
鏑木康志：「遊離脂肪酸を長時間刺激した
INS-1 細胞のプロテオーム解析」、第 28 回
日本分子生物学会年会、2005 年 12 月、福岡
- 9) 安田和基：「慢性疾患としての糖尿病の
病期に注目した病態の解析と、新たな診断・
治療法の探索」、ヒューマンサイエンス振興

財団、ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業
研究成果発表会『先端医学研究の進歩と今後
ーゲノム解析、遺伝子治療、再生医療研究は
どこまで進歩したか？問題はどこにあるの
か？』2006 年 2 月、東京

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を
含む）

なし

図1. 新生仔ブタ胛からのSP細胞単離

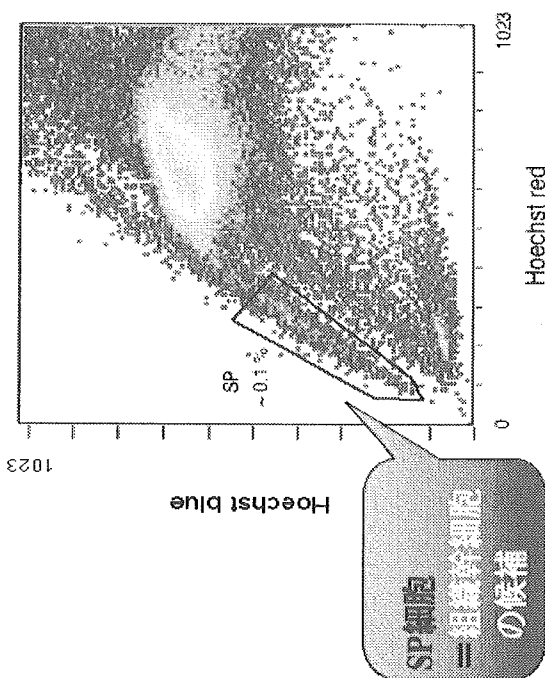
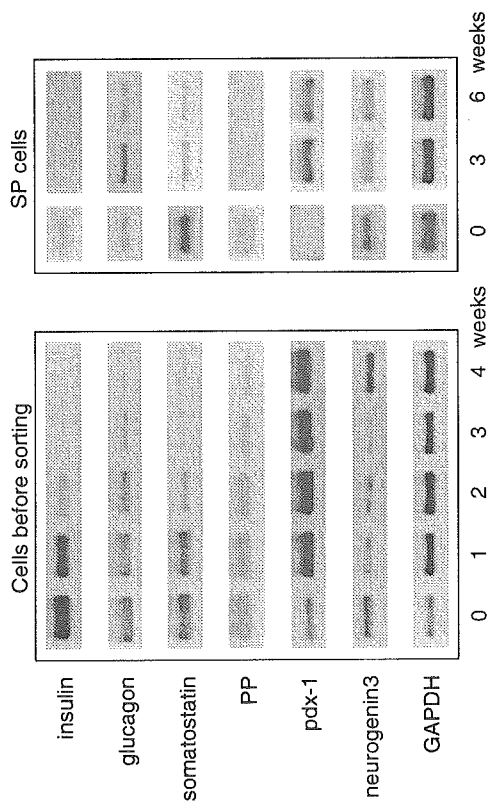


図3. 仔ブタ胛由来細胞の、内分泌マーカーの遺伝子発現の経時変化



内分泌系にコミットしているが、ホルモン発現はむしろ低下
 → 未分化内分泌細胞?

図2. ブタ胛由来SP細胞の遺伝子発現—Non-SP細胞との比較

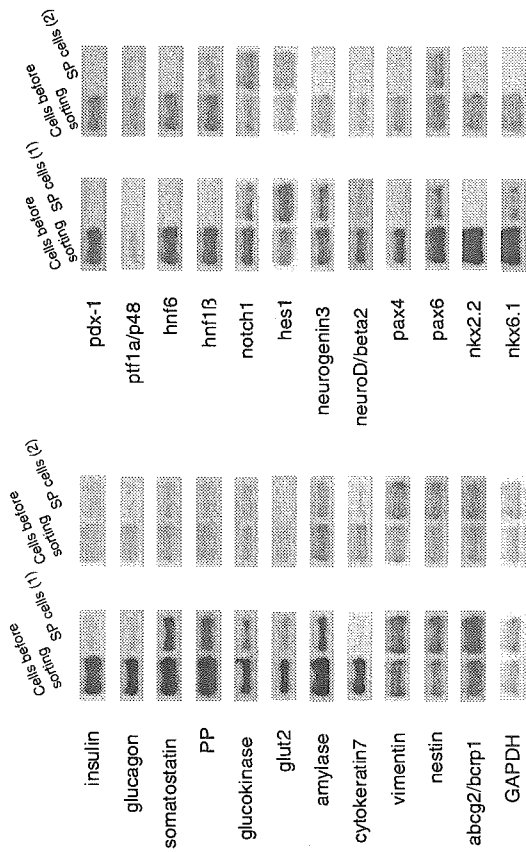
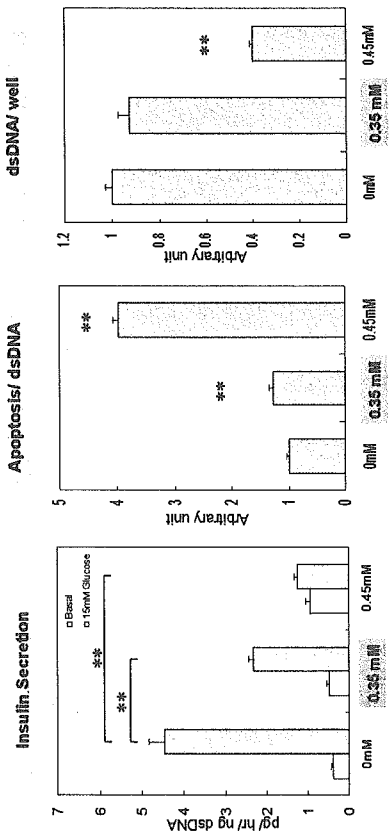


表1. RT-PCR用プライマーをデザインしたブタ遺伝子

ホルモン	insulin, glucagon, somatostatin, PP
β細胞に特徴的な分子	glucokinase, glut2, pc1/3, pc2, kir6.2, sur1
転写因子	pdx-1, neurogenin3, neuroD/beta2, pax4, pax6, nkx6.1, nkx2.2, mafA, isl1, hnf6, hnf1 β, notch1, hes1, ptf1a/p48
その他マーカー	amylose, cytokeatin7, vimentin, abcg2/bcrp1, nestin, gapdh

図4. INS-1D細胞を用いた脂肪毒性系

インスリン分泌、アポトーシス、dsDNA含有量 (palmitate, 120h 刺激)



(**p<0.01)

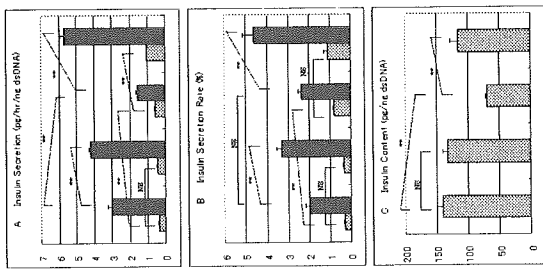
図5.

インスリン分泌に対する アディポネクチンの効果

(FAN: 全長アディポネクチン)

(Mean±S.E.,
A: n=4, B: n=3, C: n=7
*: p<0.05, **: p<0.01)

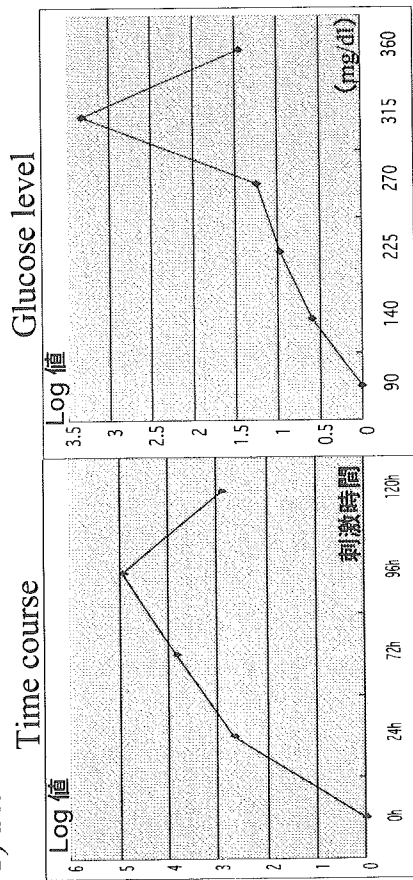
FANによってGSIS↑
脂肪毒性下でより強くGSIS↑
分泌率↑
インスリン含量回復



Concentration	0	0.15	0.35	0.45
Insulin Secretion (pg/hr/10 ⁶ dsDNA)	0	~10	~25	~45
Insulin Secretion Rate (%)	0	~10	~25	~45
Insulin Content (pg/10 ⁶ dsDNA)	0	~10	~25	~45

図6. 高グルコースによる、分泌タンパクJ
遺伝子の発現調節

1) Real-time PCR

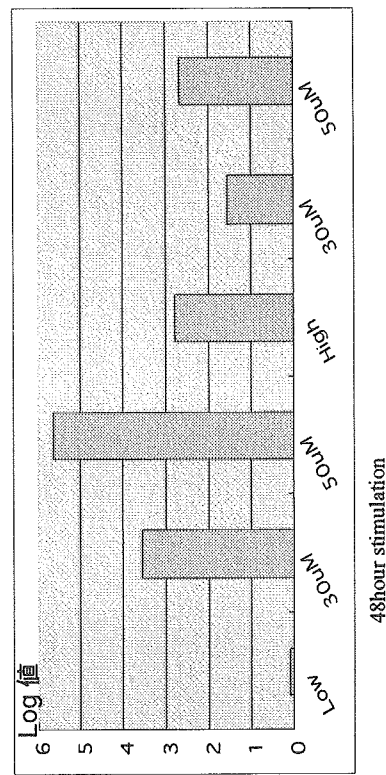


グルコース刺激時間、濃度依存性に発現が上昇している

図7.

高グルコースによる、分泌タンパクJ 遺伝子の発現調節

2) 発現誘導既知の転写因子A刺激物質の効果



High glucoseでの発現調節は、既知の発
現誘導メカニズムとは異なる

インスリン・シグナル伝達のプロテオーム解析
分担研究者 鏑木 康志 国立国際医療センター研究所・室長

研究要旨：インスリンと同様の効果を持つ内服可能な薬剤の分子標的になりうるシグナル蛋白を同定するために、プロテオーム解析の手法を用いてインスリン受容体チロシン・キナーゼの基質であるIRSと相互作用する蛋白、IRS高発現が核内での発現に影響を与える蛋白、IRSのインスリン刺激前後での翻訳後修飾を網羅的に解析する。今年度はIRS高発現細胞での核抽出液蛋白プロファイルの二次元電気泳動を用いたディファレンシャル解析を行い、有意に変化する蛋白を51個同定した。この中にはmRNA代謝に関与し、インスリン刺激により酸性側にシフトするリン酸化蛋白と考えられる蛋白1個が含まれ、この蛋白のシフトはIRS-3高発現細胞のみで低下していることから、インスリン依存性のリン酸化により増殖促進に関与し、IRS-3により抑制される可能性が考えられた。また、既に作製済みのIRS高発現肝細胞を用いたIRSと相互作用する蛋白のpull-down法による網羅的な解析を開始する。平成18年度は多次元LC-MS/MSを用いたリン酸化、グリケーション等の翻訳後修飾を受けたペプチドの解析する系を確立し、IRSのインスリン刺激前後での翻訳後修飾を網羅的に解析する。これらの解析にて同定された蛋白について発現増加あるいは抑制によるインスリンに特異的な生物学的作用への影響を培養細胞、実験動物にて検証していく。

本計画では新規インスリン・シグナル伝達に関与する蛋白の探索に加えて、短期あるいは長期の脂肪酸(palmitate)処理による膵β細胞からのインスリン分泌促進あるいは抑制の分子機構についてもプロテオーム解析にて検索した。短期処理にて有意に増加する蛋白としてcofilinを同定したが、RNAiによる発現抑制にてインスリン分泌は変化しなかった。来年度以降、短期処理についてはインスリン分泌顆粒、長期処理についてはミトコンドリアに焦点を当てて網羅的検索を行っていく。

A. 研究目的

I: インスリン・シグナル伝達

多くの成長因子の受容体の細胞内の情報伝達機構では、受容体自身のチロシン・キナーゼ活性によって自己リン酸化した受容体のホスチロシン残基へのシグナル伝達蛋白の結合が重要と考えられているが、インスリンやIGF-1による情報伝達ではシグナル伝達物質がチロシンリン酸化したIRS (insulin receptor substrate)等の細胞内基質に結合するのが特徴であり、これがインスリン作用に特異的な代謝作用の分子生物学的基盤の一因と考えられてきた。IRS knockout mouseの解析結果から各臓器にてシグナル伝達に果たす役割は、各IRSによって大きく異なることが判明したが、

その分子生物学的基盤についてはほとんど明らかにされていない。

本計画では、各IRSのインスリンによる生物学的作用での役割の違いを培養細胞にて詳細に検討し、その原因となるIRSの各ドメインと相互作用する分子、シグナル蛋白を二次元電気泳動、pull-down法を用いたプロテオーム解析を組み合わせた手法で同定する。最近、IRS下流の経路は癌細胞の増殖やアポトーシス抑制といった代謝以外の生命現象をも制御していることが報告されている。このため本研究では、糖尿病に関連した代謝作用と、癌細胞の増殖等の代謝以外のインスリン作用を詳細に比較検討し、内服可能なインスリンと同様の効果を持つ薬剤の分子標的となる蛋白の発見を目指す。

II: インスリン抵抗性

糖尿病患者の90%以上を占める2型糖尿病はインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併することで発症する多因子性疾患であり、その患者数は戦後30年間で2.5倍以上に急増している。この短期間に糖尿病関連遺伝子の頻度が急上昇したとは考えにくく、食生活の欧米化、生活の都市化等のライフスタイルの変化といった環境因子の変化が原因と考えられている。特に近年の食生活上の変化としては、摂取カロリーの増加よりも脂肪摂取の比率の上昇(エネルギー比にて25%以上)が特徴である。このため、高脂肪食によるインスリン抵抗性の原因の解明が、2型糖尿病及びこれに起因した糖尿病性合併症、大血管障害の克服のために必須である。

インスリン抵抗性の病態には、加齢によるエネルギー代謝の変化として筋における糖取り込みの低下、肝での糖新生及び糖放出の亢進、脂肪組織での糖取り込み亢進及び脂肪蓄積が関与している。近年、遊離脂肪酸が全身でのインスリン抵抗性を亢進させるメディエーターとして着目されているが、長鎖脂肪酸は短期的に膵β細胞からのインスリン分泌を促進することでも知られている。本研究では、膵β細胞での長鎖脂肪酸による短時間処理によるインスリン分泌促進、長時間処理によるブドウ糖応答性インスリン分泌(GSIS)について、これらの現象に関与する蛋白をプロテオーム解析による網羅的な検索にて同定し、長鎖脂肪酸による膵β細胞での相反する生理作用の分子機構の解明を目標とする。

B. 研究方法

I: インスリン・シグナル伝達

インスリンと同様の効果を持つ内服可能な薬剤の分子標的になりうるシグナル蛋白を同定するために、プロテオーム解析の手法を用いた新規シグナル蛋白の網羅的探索を、インスリン受容体チロシン・キナーゼの基質であるIRSと相互作用する蛋白(1)、IRS高発現が核内での発現に影響を与える蛋白(2)、IRSのインスリン刺激前後での翻訳後修飾(3)について行う。

(1)については、既に作製済みのIRS高発現肝細胞を用いてIRS-1, IRS-2と

相互作用する蛋白をpull-down法により網羅的に解析する。(2)については、本研究室で既に作製したインスリン受容体とIRS-1, IRS-2, またはIRS-3を高発現したCHO細胞で核抽出液を精製して、蛋白プロファイルの2D-DIGEによる二次元電気泳動ゲル上のディフレンシャル解析を行い、有意な変化を有する蛋白をLC-MSにて同定する。

(3)については、多次元LC-MS/MSを用いたリン酸化、グリケーション等の翻訳後修飾を受けたペプチドの解析系を確立し、IRSのインスリン刺激前後での翻訳後修飾(3)を網羅的に解析する。平成18年度以降(1)~(3)の解析にて同定された蛋白について、発現増加あるいは抑制によるインスリンに特異的な生物学的作用への影響を培養細胞、実験動物にて検証していく。

II: インスリン抵抗性

ラット膵β細胞株 INS-1 を長鎖飽和脂肪酸(palmitate)にて長時間(120時間)処理した系を用いて、処理した細胞のcell lysateを二次元電気泳動により解析し、長鎖飽和脂肪酸により発現量の変動する蛋白を網羅的に検索する。有意に変動するスポットから蛋白をLC-MS/MSにて同定する。

短時間の脂肪酸処理による膵β細胞からのインスリン分泌促進の分子機構については、palmitate, palmitate + acylation inhibitor (cerulenin)処理時に二次元電気泳動ゲル上にて移動するスポットを検索し、LC-MS/MSにて同定する。これらの実験にて同定された蛋白について、高発現、RNAiによる発現抑制によって、インスリン分泌が変化するか検証する。

C. 研究結果

I: インスリン・シグナル伝達

(2) CHO細胞でのIRSによる細胞周期制御の検討の結果、IRS-1高発現では細胞周期に変化は見られなかったが、IRS-3高発現ではインスリン依存性のS期及びG2/M期への移行が有意に抑制されることが観察された。各細胞でのシグナル伝達の解析の結果では、IRS-1, IRS-3の高発現によってインスリン刺激時のAkt, MAP kinaseの活性化には変化が認められず、アポトー