

膵β細胞における mTORC1 活性亢進が膵島可塑性に及ぼす影響の解明

神戸大学医学部附属病院 浅原 俊一郎

1. 研究の背景と目的

我が国の糖尿病患者数は増加傾向にあり、人口構成の高齢化や肥満者の増加に伴って今後も増えることが予測される。2型糖尿病は、インスリン抵抗性とともに関与する膵β細胞不全を特徴とする代謝障害であり、特に日本人の発症には膵β細胞不全が重要な因子とされている。膵β細胞不全の成因としては、インスリン分泌不全、いわゆる膵β細胞の質的異常に加えて、膵β細胞量の減少、つまり量的異常が報告されており、これらは膵β細胞におけるインスリンシグナルとの関与が確認されている。

我々の研究室ではこれまでに、インスリンシグナル中の PDK1 を膵β細胞特異的にノックアウトしたマウスでは、転写因子 Foxo1 を介して膵β細胞数が減少するとともに、インスリンシグナル下流に存在し細胞成長を促す mTORC1 の活性が低下することによって、個々の膵β細胞サイズも小さくなるということを明らかにした。したがって、mTORC1 活性を亢進させることによってβ細胞の増大が促進され、糖尿病の発症を抑制できる可能性があると考え、mTORC1 抑制タンパクである TSC2 を膵β細胞特異的に欠損させたマウス(β TSC2KO)を作製し解析を行った。

以前の研究において、β TSC2KO では mTORC1 の活性化により若齢でβ細胞量が増加し、高インスリン血症および低血糖を呈す一方、高齢では主にβ細胞量の減少により、血中インスリンレベルが低下して進行性の高血糖を呈すことを明らかにしており、β TSC2KO が二相性の表現型をとることが分かった。2型糖尿病を発症する際のヒトにおいても同様の血糖値変化が認められていることから、β TSC2KO は日本人の2型糖尿病モデルマウスとして適していると考えている。現在までに、β TSC2KO では恒常的に mTORC1 が活性化することによって、インスリンシグナルの低下や小胞体ストレスによるオートファジー機構障害が引き起こされ、2型糖尿病の発症につながることを報告している。

近年、糖尿病病態における膵島内の細胞可塑性について注目が集まっている。高血糖などの代謝ストレスを受けたマウスのβ細胞は、インスリン産生能を失うとともに膵内分泌前駆様細胞へと脱分化しており、さらにその一部はα細胞に分化転換することが確認されている。そこで本研究では、β細胞脱分化現象と糖尿病との関わりについて検討し、新たな膵β細胞量減少メカニズムについて検討を行った。

2. 研究方法・研究内容

・マウス

2型糖尿病モデルマウスとして、膵β細胞に特異的に Cre が発現する Ins-Cre マウスと TSC2 floxed マウスを交配して、膵β細胞特異的 TSC2 ノックアウトマウス(β TSC2KO)を作製した。対照(Control)として TSC2 flox/flox マウスを使用した。β TSC2KO と Control の血糖値と体重を10週齢から測定し、β細胞量やα細胞量の変化を観察した。また、インスリンが発現した細胞でのみ YFP が継続的に発現するように、R26R YFP マウスとβ TSC2KO を交配し、β TSC2KO・YFP マウスとして、TSC2(flox/flox)YFP(YFP+)Cre+を作製した。対照(Control)として、TSC2(flox/+)YFP(YFP+)Cre+を使用した。マウスのジェノタイピングは尻尾から抽出した DNA を用いて PCR により確認した。

・膵島単離

既報の方法に従って行った。要すると、コラゲナーゼをマウス胆管に注入し、37°Cで膵臓を分解した。その後、ヒストパークを用いて密度勾配で膵外分泌腺と膵島を分離したのち、顕微鏡下で膵島のみピックアップを行った。

・電子顕微鏡像

β TSC2KO の膵実質を 1-2 mm に細断し、2.5%グルタルアルデヒド/0.05M カンジル酸 Buffer で固定した。解析は弘前大学水上研究室に依頼した。

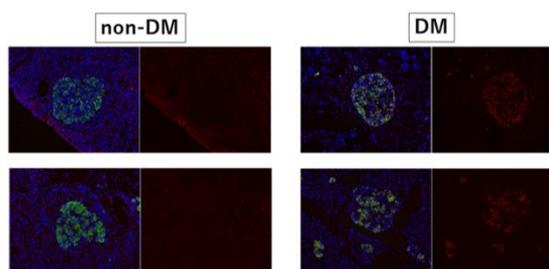
・統計解析

データ分析にはスチューデントの t 検定を使用した。統計的に有意差を示すために、 $p < 0.05$ の閾値を使用した。 $p < 0.05$ なら*、 $p < 0.01$ なら**と示した。

3. 研究成果

日本人の膵島における mTORC1 活性を調べるために免疫染色を行ったところ、2 型糖尿病患者では活性の亢進を認めた (図 1)。

Control と β TSC2KO の血糖値を比較すると、Control は 140 mg/dL 程度を保っていたが、 β TSC2KO は 45 週齢頃までは 100 mg/dL 程度と Control よりも低く、45 週齢以降から Control を上回り 60 週齢では 570 mg/dL にまで上昇した。10 週齢、40 週齢、60 週齢についての β 細胞量、 α 細胞量を比較したところ、 β TSC2KO では、血糖上昇を認めていない 10 週齢から 40 週齢にかけてすでに β 細胞量が減少していた。そして高血糖となる 40 週齢から 60 週齢にかけてさらに β 細胞量は減少し、 α 細胞も 60 週齢で減少を認めた。



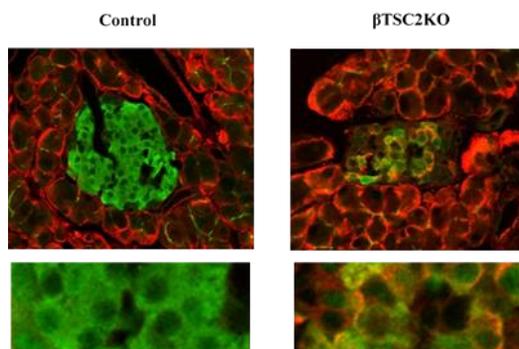
【図 1. 日本人の 2 型糖尿病患者膵島における mTORC1 活性】
Insulin/pS6/DAPI 染色 pS6(+): mTORC1 活性化

β 細胞量減少のメカニズムを解明するために、分化に関する検討を行った。膵臓内分泌 4 ホルモン(インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、PP)と内分泌細胞マーカーであるクロモグラニン A の免疫染色を行った。Control では 4 ホルモンとクロモグラニン A が共染するのに対し、 β TSC2KO ではクロモグラニン A 陽性かつ 4 ホルモン陰性細胞を多く認めた。

膵内分泌細胞の可塑性の評価の一環として、膵島でのアミラーゼ発現の経過を観察した。10 週齢ではアミラーゼ染色で Control と β TSC2KO の間に差は認められない。しかし β TSC2KO では、40 週齢においてアミラーゼが弱く発現し、60 週齢では周囲の外分泌腺と同程度に発現している膵島も見られた。

膵内分泌細胞の可塑性の評価の一環として、膵島でのアミラーゼ発現の経過を観察した。10 週齢ではアミラーゼ染色で Control と β TSC2KO の間に差は認められない。しかし β TSC2KO では、40 週齢においてアミラーゼが弱く発現し、60 週齢では周囲の外分泌腺と同程度に発現している膵島も見られた。

膵内分泌細胞の可塑性の評価の一環として、膵島でのアミラーゼ発現の経過を観察した。10 週齢ではアミラーゼ染色で Control と β TSC2KO の間に差は認められない。しかし β TSC2KO では、40 週齢においてアミラーゼが弱く発現し、60 週齢では周囲の外分泌腺と同程度に発現している膵島も見られた。

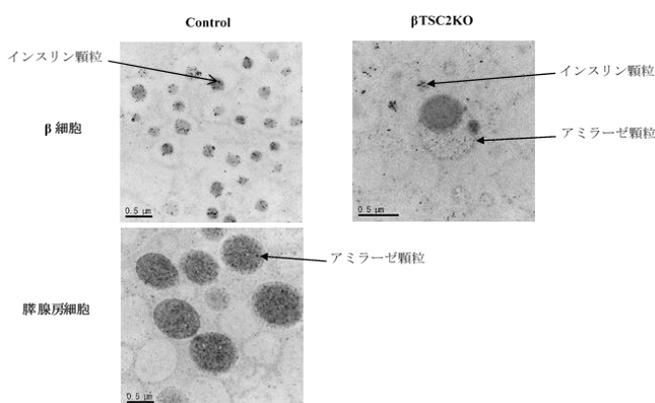


そこで、膵島に発現したアミラーゼ陽性細胞の由来を検討した。インスリンプロモーター領域を利用し、インスリンが発現したことのある細胞、つまりβ細胞由来の細胞でYFPが継続的に発現するマウスを用いてLineage-tracingを行った。60週齢のマウスでYFP・アミラーゼ染色を行ったところ、Controlでは染め分けられたのに対して、βTSC2KOの膵島では共染していた(図2)。また、60週齢のマウスでYFP・リパーゼ染色も行ったところ、Controlでは染め分けられたのに対して、βTSC2KOの膵島では共染していた。したがって、βTSC2KO膵島におけるアミラーゼ陽性、リパーゼ陽性細胞は膵β細胞由来であることがわかった。

【図2. Lineage-tracing(YFP/Amylase 染色)】
60週齢でのYFP、アミラーゼ発現の検討
(上段;弱拡大、下段;強拡大)

60週齢のマウス膵島を免疫電子顕微鏡法により解析したところ、Controlでは、膵腺房細胞で5nmのアミラーゼ顆粒を、β細胞では15nmのインスリン顆粒を認めた。βTSC2KOでは、β細胞でインスリンとアミラーゼが共陽性の細胞を認めた(図3)。

β細胞量減少の機序として脱分化の可能性を検討するため、60週齢と100週齢の高齢マウス膵島について、β細胞の脱分化マーカーとして報告のあるAldh1a3とインスリンの免疫染色を行った。その結果、どちらの週齢においてもControl、βTSC2KOともにAldh1a3の発現が認められなかった。加えて、脱分



【図3. 高齢マウス膵島の免疫電子顕微鏡像】
60週齢ControlとβTSC2KOマウスのβ細胞内構造物の比較

化したβ細胞を標識することが報告されているCD81の発現についても検討した。10週齢のマウス膵島でインスリン・CD81染色を行ったところ、ControlとβTSC2KOのいずれにおいても、主にインスリン陰性細胞でのみCD81が陽性となった。また、10週齢のマウス膵島でYFP・CD81染色も行ったところ、ControlとβTSC2KOのいずれにおいても、主にYFP陰性細胞でのみCD81が陽性となった。

脱分化との関連をより詳細に調べるために、Foxo1の免疫染色を行った。10週齢、40週齢、60週齢について、ControlではFoxo1がβ細胞の細胞質に発現していたが、βTSC2KOでは核内に集積していた。さらに、80週齢のマウスでFoxo1・YFP・アミラーゼ染色を行ったところ、βTSC2KO膵島においてYFPとアミラーゼが共陽性となっている細胞で、Foxo1は核内に集積していた。したがって、βTSC2KOの膵島で、β細胞由来のアミラーゼ陽性細胞では脱分化は抑制されている可能性が示唆された。

4. 生活や産業への貢献および波及効果

本研究により、世界で初めて膵β細胞が外分泌細胞に脱分化していることが明らかとなった。さらに、その機序として膵β細胞のmTORC1活性亢進が影響していると考えられる。今回、2型糖尿病患者の膵β細胞ではmTORC1活性が亢進していると考えられることから、全ての2型糖尿病患者において膵β細胞から外分泌細胞への分化転換が起きている可能性がある。さらに興味深いこととして、1型糖尿病患者への応用が挙げられる。これまで1型糖尿病では自己免疫により膵β細胞が破壊されると

考えられてきたが、1型糖尿病においても今回のような機序が起きているとすれば、実は膵臓内に旧膵 β 細胞が残存しているという仮説が考えられる。このことは、1型糖尿病の全く新しい治療法につながる可能性が考えられ、1型糖尿病根治という大きな課題克服の一步になることが期待される。