

## ヒト膵β細胞株を用いた2型糖尿病発症機序の解明

### 【助成対象者】

神戸大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌内科学・特命助教  
浅原 俊一郎

### 【共同研究者】

神戸大学大学院保健学研究科 病態解析学領域病態代謝学分野・教授  
木戸 良明  
神戸大学大学院イノベーション研究科 iPS細胞応用医学講座・教授  
青井 貴之

### 【研究の目的】

これまでに我々の研究室では、2型糖尿病発症における膵β細胞不全の重要性について多くの報告をしてきている。そのほとんどが、膵β細胞における遺伝子の役割についてマウスを用いて解析したものであり、多くの知見を得ることができた。しかしながら、多因子疾患の代表である2型糖尿病の発症・進展を予防するためには、生活習慣の改善、特に食生活の見直しが重要であることは言うまでもない。近年、健康面に良い効果をもたらすと言われる様々な栄養素がメディアでも取り上げられつつあるが、科学的に検証されたものは少なく、また膵β細胞における効果を検討したものはほとんど見当たらない。そこで今回我々は、各種栄養素が膵β細胞に及ぼす効果についての検討を行った。また、これまでの膵β細胞研究はマウスもしくはラットの膵β細胞株を用いることによって行われてきたものであり、少しでも臨床応用に繋がられるべく、ヒト膵β細胞株を用いた実験に取り組んだ。

### 【研究の成果】

当初本研究申請時には、フランスの Endocells 社よりライセンス契約で購入できるヒト膵β細胞株 EndoC-BH1 細胞を購入して、各種栄養素の負荷実験を行う予定であった。しかしながら、その後 Endocells 社の買収なども関連して契約条件が大きく変わり、購入が困難となったため、実験計画を変更することとなった。ヒト膵β細胞を *in vitro* で解析するために、ヒト iPS 細胞を用いて膵β細胞までの分化を試みることにした。

#### 1) ヒト iPS 細胞を用いた膵β細胞への分化誘導実験

神戸大学大学院イノベーション研究科 iPS細胞応用医学講座の青井教授より、ヒト iPS 細胞 (FF207B) を供与していただき、当研究室で維持・培養を行った。免疫染色・RT-PCR によって未分化マーカー (Oct3/4, NANOG) の発現確認を行った。この iPS 細胞株を用いて分化誘導実験を行ったところ、Stage I である胚体内胚葉の分化マーカーとして FOXA2 の発現が RT-PCR によって確認されたが、SOX17 は確認されなかった。Stage II では HNF4α、Stage III では PDX1 の発現を免疫染色、RT-PCR によってそれぞれ確認したところ、いずれにおいても発現が確認された。Stage IV (膵芽) への分化誘導も行ったが、現

時点では PTF1A、NKX6.1 の発現は認められておらず、今後の検討課題である。これまでの報告で、ヒト iPS 細胞から膵β細胞までの分化誘導プロトコールはある程度確立されており、インスリンの発現及び分泌する細胞を得ることは、それほど困難ではない。移植治療を目指すほどの量には至らずとも、病態解明のための実験は十分可能と考えている。

以下の各種栄養素の負荷実験に関しては、今回はマウス膵β細胞株 MIN6 細胞を用いて実験を行った。

## 2) 膵β細胞におけるカルノシンの保護効果に関する検討

以前の我々の研究成果において、ジペプチドであるカルノシンを糖尿病モデルマウスに投与すると、膵β細胞量の減少が抑制されることが明らかとなった。この効果における機序を検討すべく血漿中のアミノ酸プロファイルを行ったところ、カルノシン投与によってバリン濃度が著明に増加していることが明らかとなった。膵β細胞におけるバリンの効果を検討するために、MIN6 細胞にバリンの負荷実験を行った。その結果、10mM バリンの負荷によってインスリンシグナルの下流である S6K や S6、4EBP-1 のリン酸化が認められた。これは細胞の増殖・増大を示すシグナルであり、カルノシンは血漿中バリン濃度の増加を介して、膵β細胞量の増加に寄与していると考えられた。

## 3) 膵β細胞におけるカフェイン・クロロゲン酸の効果に関する検討

次に我々は、コーヒー成分に注目した。これまでに多くの疫学的調査において、コーヒーが糖尿病予防に有効であることが示されている。その多くが、機序として体重減少すなわちインスリン抵抗性の改善に関与していると結論づけている。しかしながら日本人をはじめとした東アジア人においては膵β細胞不全が重要な病態であることから、膵β細胞におけるコーヒー成分の役割について検討を開始した。2014年の *Diabetes Care* 誌において、「カフェインの有無によらずコーヒーを1日5杯以上飲む人では糖尿病発症が有意に抑制される」ことが報告された。カフェイン以外で糖尿病を抑制する効果が期待される物質として、クロロゲン酸が挙げられる。クロロゲン酸はポリフェノールの一種であり、これまでに脂肪燃焼促進効果や血糖吸収抑制効果が報告されている。MIN6 細胞にクロロゲン酸を負荷すると膵β細胞保護効果として重要なインスリンシグナルの活性化が認められた。また病的状態を模倣すべくツニカマイシン（小胞体ストレス惹起剤）負荷状態でクロロゲン酸を投与してみても、ツニカマイシンによるインスリンシグナル減弱をキャンセルさせる効果が認められた。このインスリンシグナル活性効果の機序を探るために上流分子の発現量を比較検討したところ、リアルタイム PCR において IRS2 mRNA 発現量のみ有意に増加していることがわかった。また IRS2 の転写活性に寄与する転写因子 CREB の活性化も認められたことから、クロロゲン酸は CREB の活性化を介して IRS2 発現を促進し、インスリンシグナル亢進によって膵β細胞保護効果を担っていると考えられた。

またカフェインにおいては、MIN6 細胞に単独で負荷しても分子の活性化や発現量に大きな変化は認められなかったが、ツニカマイシン負荷時においてはクロロゲン酸同様、インスリンシグナル減弱のキャンセル効果が認められた。これは小胞体ストレス負荷がかかるような病的状態において、カフェインが保護的に働くことが示唆されるデータである。今後は、インスリンシグナル以外の分子メカニズムについても検討する予定である。

## 【今後の課題】

本研究計画においては、まず「ヒト膵β細胞」を用いることが大きな目標であったことから、それが叶わなかったことは大変残念である。国内代理店である(株)KACと数回の面談を行ったが、費用面からもヒト膵β細胞株 EndoC-BH1 細胞を購入することは不可能という判断に至った。そこで今後の研究課題としては、現時点において以下のようなものが挙げられる。

### 1) ヒト iPS 細胞からの膵β細胞への分化誘導実験

研究成果の欄でも記載したとおり、現時点において膵β細胞分化に重要な転写因子である PDX1 の発現までは確認できている。今後インスリンの発現・分泌を認める細胞が得られるまでにそれほど多くの時間は要さないと考えているが、問題は実験に必要な細胞量が得られるかどうかであろう。これまでにマウス膵β細胞株を用いてやってきた多くの実験を、できるだけ再現したいと考えており、効率的な分化誘導方法を模索していきたい。

### 2) コーヒー成分による膵β細胞保護効果のメカニズムに関する検討

カフェイン、クロロゲン酸がいずれも膵β細胞保護効果を有していることが今回の検討で実証されたが、本研究ではインスリンシグナルに焦点を当てており、他の増殖シグナルやアポトーシスに関する評価も行う必要があると考えている。さらに、今回は小胞体ストレス負荷状態におけるクロロゲン酸の効果を検討したが、他の病的状態においても確認する必要があるだろう。我々の研究室ではこれまでに、飽和脂肪酸の一種であるパルミチン酸が、膵β細胞内の p38MAPK を介して膵β細胞に炎症性シグナルを誘導し、膵β細胞量を減少させることを明らかにしている。すなわち、飽和脂肪酸は膵β細胞量を減少させる栄養素と考えられる。こうした負の効果を、コーヒー摂取によって緩和することが可能かどうかについて検討することも、今後の課題にしたいと考えている。これによって、糖尿病予防における適切な食事メニューの組み合わせなども提案できるのではないかと期待している。

### 3) エピガロカテキンによる膵β細胞保護効果の検討

我々の研究室では以前、膵β細胞におけるオートファジー不全が異常ミトコンドリアの蓄積を誘導し、最終的に膵β細胞不全を呈することを報告している (Diabetes, 2014)。近年、エピガロカテキンガレートがオートファジーを誘導することがいくつか報告されており、神経疾患などへの応用が期待されている。糖尿病、とりわけ膵β細胞不全においてもオートファジー不全は重要な病態であることから、エピガロカテキンガレートは膵β細胞保護効果のある栄養素として大変興味深いものと考えている。現在、MIN6細胞を用いて負荷濃度と時間を検討中である。

## 【本研究に関する主な発表論文、投稿等】

1. Kawada Y, Asahara S, Sugiura Y, Sato A, Furubayashi A, Bartolome A, Terashi-Suzuki E, Takai T, Kanno A, Koyanagi-Kimura M, Matsuda T, Hashimoto N, Kido Y. Histone Deacetylase Regulates Insulin Signaling via Two Pathways in Pancreatic β Cells. PLoS ONE Submitted.