

第7回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –
研究成果報告書（追加助成） <概要>

所 属	山口大学医学部分子代謝制御学講座
氏 名	椎木 幾久子
研究テーマ	新規糖尿病治療標的の創出を目指した膵β細胞脱分化機構解明に関する研究

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。（図表、写真などの貼付を含む）

【研究目的】

Wolfram 症候群（WS）の疾患モデル *Wfs1* 欠損マウスは小胞体ストレス亢進を来し、膵β細胞が脱分化し糖尿病を発症する。*Wfs1* 欠損β細胞ではストレス応答分子 Thioredoxin-interacting protein (Txnip) の発現亢進を来し、*Txnip* 欠損により脱分化が抑制され糖尿病発症を予防できる。本研究では、1) 脱分化誘導メカニズムとして *Txnip* を介した細胞内エネルギー代謝制御および 2) 糖尿病治療薬による *Txnip* 発現抑制と脱分化阻止効果を解明することを目的とした。さらに、ヒトの糖尿病における脱分化の意義を明らかにするため 3) WS 患者および 2 型糖尿病（T2D）患者におけるβ細胞不全とβ細胞脱分化の関連の解明に取り組んだ。

【研究手法】

- 10 週齢の *Wfs1* 欠損、*Wfs1;Txnip* 二重欠損、野生型マウスの単離膵島について細胞外フラックスアナライザーを用いた細胞内代謝動態の解析およびメタボローム解析を行なった。
- Wfs1* 欠損マウスに GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 (Ex4) を 6 週齢より 4 週間投与し、投与終了時点（10 週齢）での膵組織切片を用いて免疫組織染色を行ない、β細胞脱分化を評価した。
- WS 患者の剖検膵および、臨床情報に基づき早期群、進展群、中間群に分類した T2D 患者の外科的切除膵について、免疫組織染色を行ない、脱分化細胞数を定量した。

【研究成果】

- Wfs1* 欠損マウスの膵島では、脱分化に先行してグルコース異化障害および ATP 産生の低下を認める。その要因として *Txnip* 発現亢進による Pyruvate dehydrogenase (PDH) の活性抑制が示唆された。*Wfs1* 欠損マウス膵島で認められる PDH の活性を抑制するリン酸化の亢進が *Txnip* 欠損により野生型と同レベルまで低下した。加えて、*Wfs1* 欠損マウス膵島で認められるグルコース応答性 ATP 産生および解糖速度、酸素消費速度の著明な低下が、*Txnip* 欠損により回復し、脱分化の抑制とともにβ細胞量が維持された。ストレス病態での細胞内エネルギー代謝障害と脱分化誘導との関連における *Txnip* の役割とその制御による脱分化抑制の可能性が示唆された。
- Wfs1* 欠損マウスβ細胞では、*Txnip* 発現が増強しており、脱分化を示唆する MafA 発現の減弱および Neurogenin3 の出現が認められたが、Ex4 を投与した *Wfs1* 欠損マウスではこれらが抑制された。*Wfs1* 欠損マウスにおいて GLP-1 シグナル活性化による脱分化軽減と *Txnip* 発現抑制との関連性が示された。
- WS 患者の膵島では対照に比しインスリン陽性細胞は著減し、脱分化細胞が増加していた。T2D では膵島あたりの内分泌細胞数に変化はなかった一方で、インスリン陽性細胞数の低下、グルカゴン陽性細胞の増加とともに脱分化細胞数の顕著な増加を示した。脱分化細胞数は病態進展にともなって増加し、β細胞機能の指標である C-peptide index と有意な逆相関を示した。WS のβ細胞量減少と脱分化との関連が、T2D では病態進展と脱分化の臨床関連が示された。

第7回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –
研究成果報告書（追加助成） <詳細>

所 属	山口大学医学部分子代謝制御学講座
氏 名	椎木 幾久子
研究テーマ	新規糖尿病治療標的の創出を目指した膵β細胞脱分化機構解明に関する研究

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【研究目的】

機能的膵β細胞の減少は糖尿病の成因であるが、そのメカニズムには依然として不明な点が多く、これを阻止する有効な方法も確立されていない。近年、膵島内の分化・細胞可塑性が明らかにされ、糖尿病病態における細胞可塑性の制御機構に注目が集まっている。先行研究において、インスリン依存性糖尿病を主徴とする Wolfram 症候群 (WS) の疾患モデル *Wfs1* 欠損マウスでは膵β細胞において小胞体ストレス亢進を来とし、成体膵β細胞が高血糖非依存的に膵内分泌前駆様細胞に脱分化しインスリン産生能を失うことがインスリン分泌不全病態の本質であることを明らかにした (図 1)。一方、このようなβ細胞の病態はストレス応答分子 Thioredoxin-interacting protein (Txnip) の発現増加と関連し、Txnip 欠損によりインスリン分泌不全の進展が完全に予防された。そこで、本研究では細胞内ストレス亢進と脱分化の関連を Txnip に焦点を当て解明し、膵β細胞不全進展阻止につながる脱分化を標的とする新規治療戦略の創出を目指した。特に以下の 2 点について検討した。

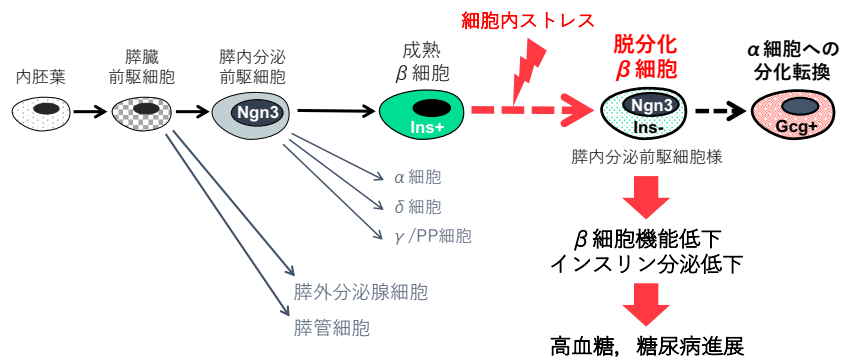


図1. 膵β細胞分化系譜と脱分化

1. Txnip による細胞内エネルギー代謝制御と脱分化の関連

2. 糖尿病治療薬による Txnip 制御を介した脱分化抑制効果

一方で、ヒトにおける膵β細胞不全と脱分化との関わりについては不明である。そこで、**3. WS 患者および 2 型糖尿病 (T2D) 患者におけるβ細胞不全とβ細胞脱分化の関連の解明**にも取り組んだ。

【方法】

1. Txnip による細胞内エネルギー代謝制御の解明

若齢 *Wfs1* 欠損マウス膵島は前駆様細胞への脱分化に先行してグルコース異化障害に基づく ATP 産生障害とともにグルコース応答性インスリン分泌障害を示す。これらが *Wfs1* ; *Txnip* 二重欠損マウスでは回復したことから、過剰に活性化した Txnip と細胞内代謝障害との関連が推察された。そこで、10 週齢の *Wfs1* 欠損、*Wfs1* ; *Txnip* 二重欠損、野生型マウスの単離膵島を用いて解糖速度、酸素消費速度およびミトコンドリア機能を細胞外フラックスアナライザーにより測定し、解析結果を *Wfs1* 欠損膵島で行なったメタボローム解析と統合し Txnip の作用点を同定した。

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

2. 糖尿病治療薬による Txnip 制御を介した脱分化抑制効果の解明

これまでに *Wfs1* 欠損マウスに GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 (Ex4) を慢性投与したところインスリン分泌が改善され、Txnip 発現亢進が抑制されることを見出してきた (Kondo et al. Diabetologia 2018)。そこで、薬理的な Txnip 制御による脱分化抑制効果について検討した。*Wfs1* 欠損マウスに Ex4 を 6 週齢より 4 週間投与し、投与終了時点 (10 週齢) での膵組織切片を用いてβ細胞脱分化を評価した。抗 Insulin 抗体、抗 Txnip 抗体、抗 MafA 抗体 (成熟β細胞マーカー)、抗 Neurogenin3 抗体 (膵内分泌前駆細胞マーカー) による免疫組織染色を行なった。Insulin 陽性/MafA 陰性または Neurogenin3 陽性細胞を脱分化β細胞として定量解析した。

3. WS 患者のβ細胞不全および T2D 患者の病態進展と脱分化との関連の解明

解析対象：1) WS：患者 2 例および対照として年齢を対応させた剖検膵を用いた。2) T2D：膵胆道疾患により外科切除された膵組織標本を用いた。糖尿病の家族歴がなく全経過で過体重 (BMI 25 以上) を認め年齢、手術対象疾患をマッチさせた正常耐糖能患者 (対照群 11 例) と T2D 患者を対象とし、T2D 群を罹病期間 (5 年以下 vs. 10 年以上)、糖尿病細小血管合併症 (無 vs. 一つ以上有する)、インスリンおよび SU 薬 (無 vs. 1 年以上の薬剤使用) の条件に基づき早期群 12 例と進展群 11 例に分類した。早期群、進展群いずれにも該当しない症例 3 例を中間群とした。

組織解析：主要膵ホルモン (インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチド)、クロモグラニン A (ChgA) に対する抗体を用い免疫組織染色を行った。膵面積に対するインスリン陽性面積比 (β) およびグルカゴン陽性面積比 (α) を計測し、膵島量として ChgA 陽性面積比を計測した。膵島内 ChgA 陽性細胞に対するインスリン陽性細胞比 (β_i)、グルカゴン陽性細胞数比 (α_i) を計測した。主要膵ホルモン陰性 ChgA 陽性細胞を脱分化細胞とし、ChgA 陽性細胞に対する細胞数比を計測した。

【結果・考察】

1. Txnip を介した酸化的解糖制御

メタボローム解析の結果、*Wfs1* 欠損マウスの膵島では、解糖系中間代謝物及びピルビン酸が増加する一方、アセチル CoA 及びクエン酸の低下、すなわち TCA 回路が減弱しており、その結果 ATP 含量の低下を認めた。このエネルギー代謝経路の乖離について、Pyruvate dehydrogenase (PDH) の活性を抑制するリン酸化 (p-PDH) が増加し、このことよりピルビン酸からアセチル CoA 生成の抑制がその要因として推察された。*Wfs1* 欠損マウス膵島では、ストレス応答分子 Txnip の顕著な発現亢進を示すが、培養細胞における結合実験において Txnip が PDH および PDH kinase1 に結合することが認められた。Txnip がこの結合を介して PDH のリン酸化を促進することが示唆された。実際に *Wfs1;Txnip* 二重欠損マウスでは、*Wfs1* 欠損マウスに比して膵島での p-PDH が野生型と同レベルまで低下した。加えて、*Wfs1* 欠損マウス膵島で認められるグルコース応答性 ATP 産生および解糖速度、酸素消費速度の著明な低下が、*Txnip* 欠損により回復した。この時、*Wfs1* 欠損マウス膵島ではミトコンドリア機能は維持されており *Txnip* 欠損による影響も受けなかった。すなわち、*Wfs1* 欠損マウス膵島において PDH 活性抑制に基づくピルビン酸の酸化障害が要因であることが推察された。以上より、ストレス病態での細胞内エネルギー代謝障害と脱分化誘導との関連における Txnip の役割とその制御による脱分化抑制の可能性が示唆された。

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

2. GLP-1 受容体作動薬による脱分化抑制効果

Wfs1 欠損マウス膵β細胞では、野生型に比して *Txnip* の発現が増強しており、*MafA* 発現の著減および *Neurogenin3* の出現を認めた。一方、Ex4 を投与した *Wfs1* 欠損マウスβ細胞では、*Txnip* 発現増強が抑制されており、*MafA* 発現の部分的回復と、*Neurogenin3* 陽性細胞数が減少した。すなわち、*Wfs1* 欠損マウスにおいて GLP-1 シグナル活性化による脱分化軽減と *Txnip* 発現抑制との関連性が示された。

3. ヒトの糖尿病においてβ細胞脱分化はβ細胞不全に関連する

WS では対照に比し膵島サイズや分布に異常を認めなかったが、インスリン陽性細胞は著減し脱分化細胞が増加していた。T2D では膵島量、βおよびαは対照群に比し増加しているものから低下しているものまで様々であり代謝病態の多様性が推察された。膵島あたりの ChgA 陽性細胞数に変化はなかった一方で、T2D 膵島では対照群に比しβi 低下、αi 増加とともに脱分化細胞数の顕著な増加を示した。脱分化細胞数は病態進展にともなって増加し、β細胞機能の指標である C-peptide index と有意な逆相関を示した (図 2)。以上の結果より、WS の膵β細胞量減少と脱分化との関連が示唆された。T2D では病態進展と脱分化の臨床関連が示され、膵島不全の病態の本質が脱分化・細胞可塑性であることを強く示唆している。

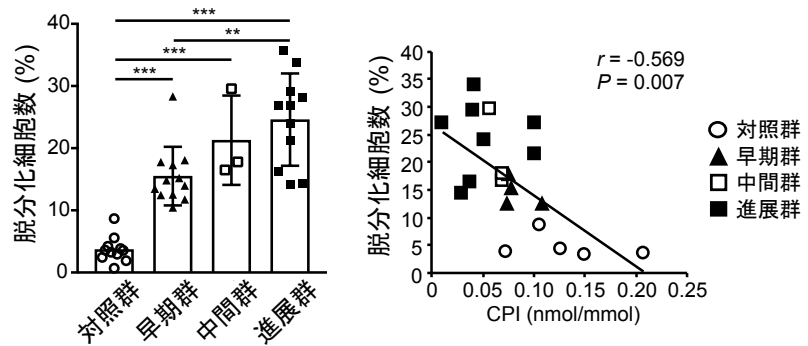


図2.膵β細胞脱分化は2型糖尿病の病態進展に関連する (Amo-Shiinoki et al. JCI insight 2021)

【今後の課題】

Wfs1 欠損マウスは高血糖に先行してβ細胞脱分化を明瞭に示し、細胞内ストレス亢進による脱分化機構の解明に最適である。本研究は、小胞体ストレス亢進に関連し過剰となった *Txnip* がピルビン酸酸化を抑制することを明らかにし、細胞内エネルギー代謝不全と脱分化の関連が想定される。すなわち、膵β細胞はインスリンを合成し分泌するために多量の ATP を消費するが、十分な ATP 合成が行えない状況では脱分化することで ATP 消費を制限し適応生存している可能性が考えられる。一方、脱分化を小胞体ストレスに対する適応生存のためのストレス応答と捉えることもできるかもしれない。しかし、脱分化誘導の直接のメカニズムは依然として不明であり、本質の解明にはエピゲノムによるグローバルなゲノム機能改変を捉えることが必要である。そのため、*Wfs1* 欠損膵島での網羅的遺伝子発現解析およびクロマチン構造解析を行い、これらの統合的解析を進めているところである。今後、*Wfs1* 欠損マウスでの脱分化β細胞をプロトタイプとして、他の糖尿病動物モデルおよびヒト糖尿病におけるβ細胞の病態理解を進めていくことが重要である。

第7回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（追加助成）＜発表実績/予定一覧＞

所 属	山口大学医学部分子代謝制御学講座
氏 名	椎木 幾久子

1. 論文発表実績

- ・ 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。
- ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。
- ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

① <論文 PDF 添付あり>

1	
2	
3	
4	

② <論文 PDF 添付なし>

1	<u>Amo-Shiinoki K</u> , Tanabe K, Hoshii Y, Matsui H, Harano R, Fukuda T, Takeuchi T, Bouchi R, Takagi T, Hatanaka M, Takeda K, Okuya S, Nishimura W, Kudo A, Tanaka S, Tanabe M, Akashi T, Yamada T, Ogawa Y, Ikeda E, Nagano H, Tanizawa Y. Islet cell dedifferentiation is a pathologic mechanism of longstanding progression of type 2 diabetes. JCI insight. 2021;6(1):e143791. 査読有り
2	
3	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 国内外を問わない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2020年10月	第63回日本糖尿病学会学術集会 椎木幾久子、田部勝也、幡中雅行、奥屋茂、福田達也、竹内崇人、坊内良太郎、山田哲也、小川佳宏、谷澤幸生 膵β細胞脱分化は2型糖尿病の病態進展に関連する
2	2020年6月	80 th Scientific Sessions of American Diabetes Association Kikuko Amo-Shiinoki, Katsuya Tanabe, Ryotaro Bouchi, Wataru Nishimura, Tetsuya Yamada, Yoshihiro Ogawa, Yukio Tanizawa. Islet β-cell dedifferentiation is involved in progression of type 2 diabetes.
3	2019年9月	55 th Annual Meeting of EASD Yukio Tanizawa, Katsuya Tanabe, Kikuko Amo-Shiinoki. Metabolic dysregulation by cellular stress is implicated in the dedifferentiation and dysfunction of pancreatic beta-cells.
4	2019年9月	第69回日本体質医学会総会 椎木幾久子、田部勝也、佐藤吉彦、駒津光久、谷澤幸生 膵β細胞脱分化は糖尿病患者の膵β細胞不全に関連する
5	2019年6月	79 th Scientific Sessions of American Diabetes Association Katsuya Tanabe, Kikuko Amo-Shiinoki, Manabu Kondo, Masayuki Hatanaka, Hiroshi Masutani, Yukio Tanizawa. Activation of GLP-1 receptor signalling prevents beta cell dedifferentiation in a mouse model of Wolfram syndrome thorough modulating Txnip expression.
6	2019年5月	第62回日本糖尿病学会学術集会 椎木幾久子、田部勝也、西村渉、幡中雅行、佐藤吉彦、駒津光久、増谷弘、谷澤幸生 Wolfram 症候群をモデルとした細胞内ストレスによる膵β細胞可塑性制御の解明
3. 投稿、発表予定（投稿中の論文も含める）		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2021年	論文投稿準備中
2		