

膵 α 細胞株および β 細胞株からなる
偽膵島の形態とインスリン分泌応答（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系糖尿病内科学専攻

盛川 愛

修了年 2022 年

指導教員 石原 寿光

【背景・緒言】

国際糖尿病連合の発表によると、世界の糖尿病人口は爆発的に増え続けており、2019年時点で糖尿病有病者数は4億6,300万人に上り、2045年までに7億人に増えると予想されている。世界における糖尿病患者の増加は、2型糖尿病患者の増加が主要な要因である。2型糖尿病は、インスリン分泌低下やインスリン抵抗性をきたす素因を含む複数の遺伝因子に、過食、運動不足、肥満、ストレスなどの環境因子および加齢が加わり発症する。インスリン分泌低下は膵β細胞の量が破壊などによって減少した場合や、膵β細胞自体に内在する機能不全によっておこる場合がある。いずれの場合でも、機能的膵β細胞量は減少しており、臓器において必要なインスリン効果が十分に発現しないことが発症の主要な要因である [1]。以上のことから、糖尿病発症に関与しているホルモンはインスリンと考えられているが、近年インクレチン製剤（DPP-4 阻害薬、GLP-1 受容体作動薬）の発売に伴い、糖尿病におけるグルカゴン分泌の調節異常が注目されるようになった。膵β細胞からのインスリン分泌機構と膵α細胞からのグルカゴン分泌機構を詳細に理解することは、糖尿病のさらなる病態解明や創薬標的の同定のために重要である。インスリン分泌に関する研究の多くは、インスリン分泌細胞を用いた接着培養での実験が多く行われてきたが、膵島移植の発展により近年は細胞を再凝集させて3次元構造を構築したスフェロイドを用いた研究も行われるようになった。スフェロイド形成によりインスリン分泌が促進され、機能的な反応性を向上させることが示されており、スフェロイド研究はβ細胞機能の研究において有用であると考えられている [2,3,4,5]。更にインスリン分泌細胞にグルカゴン分泌細胞を合わせて立体構造を構築した、より膵島に近い偽膵島（pseudoislet）研究も始まっている。

以上の背景から、本研究では、インスリン分泌細胞株である MIN6 細胞とグルカゴン分泌細胞株である αTC1 細胞を用いて偽膵島を作製し、偽膵島の形態とインスリン分泌応答を観察し、インスリン分泌機構を研究する上で有用なモデルの確立を目指した。偽膵島の形態観察においては、マウス胎児の皮膚から分離した線維芽細胞である NIH-3T3 細胞も使

用した。

【目的】

インスリン分泌細胞株である MIN6 細胞とグルカゴン分泌細胞株である α TC1 細胞を用いて偽膵島を作製し、偽膵島の形態とインスリン分泌応答を観察し、インスリン分泌機構を研究する上で有用なモデルの確立を目指す。

【方法】

本来の膵島と同様な立体構造を保った状態でのインスリン分泌を解析するために、MIN6 細胞株および α TC1 細胞株を用いて、球状の細胞塊（スフェロイド）を作製して検討した。スフェロイドの作製には Sphericalplate 5DTM を用いた。各 well に 750 個の逆四角錐の microwell が存在し、細胞を播種すると自然に細胞が四角錐の底に集まり、スフェロイドが形成される構造となっている。 α TC1 細胞と MIN6 細胞を 1 スフェロイドあたりの細胞数が 200 個になるように、 1.5×10^5 個/well で Sphericalplate 5DTM に播種すると、24 時間後には microwell に均一な大きさのスフェロイドが形成され、これを偽膵島とした。この偽膵島を Bz-700 蛍光顕微鏡を用いて観察した。インスリンは、解糖系の律速酵素であるグルコキナーゼ (Gck) の発現により分泌が増強されることが報告されている [6]。インスリン分泌実験には、通常 MIN6 細胞でのインスリン分泌を検討するとともに Gck 過剰発現の効果を検討するために、ドキシサイクリン (Dox) 添加にて Gck が過剰発現する MIN6oeGck 細胞を用いた [7]。作製したスフェロイドは 96 時間以上培養した後、最終濃度 0.3 μ g/ml になるように半数の well に Dox を加え、Gck 発現誘導後 2 日目にインスリン分泌実験を行った。インスリン分泌実験後にスフェロイドを回収し、Western blot を行った。

【結果】

α TC1 細胞と MIN6 細胞を比率が 0.125:1、0.33:1、0.5:1、1:1 になるように混合して播種

したところ、各細胞単独の場合と同様に、24 時間後には各 microwell に均一な大きさのスフェロイドが形成された。各細胞は同時に播種したが、いずれの比率においても MIN6 細胞は球体の中心部に位置し、 α TC1 細胞が MIN6 細胞を囲むように辺縁部に位置していた。これは、他のインスリン細胞株 (INS-1 細胞 [8]、 β TC3 細胞 [9]) とグルカゴン細胞株 (α TC1) を用いてスフェロイドを形成した報告と同様の結果であった。次に MIN6 細胞と α TC1 細胞の偽膵島構造における特徴的な細胞分布の由来を解明するために、膵島細胞とは関連のない NIH-3T3 細胞を用いて検討を行った。MIN6 細胞と NIH-3T3 細胞を 1:1 の比率で Sphericalplate 5D™ に播種したところ、NIH-3T3 細胞が球体の中心部に位置し、MIN6 細胞は NIH-3T3 細胞の辺縁に位置していた。また、 α TC1 細胞と NIH-3T3 細胞を 1:1 の比率で播種したところ、ほとんどの microwell で細胞が凝集せず散在していた。スフェロイドを形成したものはごくわずかであり、辺縁は不整で、それぞれの細胞において規則的な分布は認められなかった。

スフェロイドの三次元構造をとった MIN6 細胞のインスリン分泌を検討するため、1 個のスフェロイドあたり、MIN6 細胞が 200 個となるようにスフェロイドを形成し、インスリン分泌実験を行った。Gck の過剰発現を誘導しない状態では (Dox(-))、5 mM グルコース刺激によるインスリン分泌は 1 mM グルコース刺激によるインスリン分泌と同程度であり、12.5 mM グルコースで約 10 倍に分泌量が増えていた。これは、接着培養でのインスリン分泌と同様であった。一方、Dox 0.3 μ g/ml で Gck を過剰発現させたスフェロイドにおいては、5 mM グルコースで、1 mM グルコースの 4.7 倍 (0.80 ± 0.33 vs. 3.81 ± 1.90 , $p = 0.057$, $n = 4$)、12.5 mM グルコースで、1 mM グルコースの 18.9 倍に増加した (0.80 ± 0.33 vs. 15.20 ± 3.47 , $p = 0.003$, $n = 4$)。次に、1 個の偽膵島あたりの総細胞数は 200 個とし、構成する α TC1 細胞と MIN6oeGck 細胞の比が、0.33:1、0.5:1、1:1 の比率になるように偽膵島を作製した。作製した偽膵島の半分を Dox で処理し、インスリン分泌実験を行った。いずれの比率においても、MIN6oeGck 細胞単独スフェロイドの場合と同様にグルコース濃度依存性にインスリン分泌が増加した。しかし、 α TC1 細胞を混ぜて作製した偽膵島では、1 mM グルコース

および 5 mM グルコース刺激によるインスリン分泌量が増加していた。一方、12.5 mM グルコース刺激によるインスリン分泌は、3.5 ng/2000 MIN6oeGck cells であり、大きな変化はなかった。この結果、グルコース 12.5 mM/5 mM グルコースのインスリン分泌比は、MIN6oeGck 細胞のみでは約 10 倍であったのに対し、約 3.5 倍に低下していた。偽膵島における 1 mM グルコースおよび 5 mM グルコース刺激によるインスリン分泌の増加は、MIN6 細胞と α TC1 細胞との共存が重要であると考えられるが、単に他の細胞との接触による可能性を検討するため、MIN6 細胞と NIH-3T3 細胞からなるスフェロイドを作製して、インスリン分泌実験を行った。NIH-3T3 細胞と MIN6 細胞とからなるスフェロイドのインスリン分泌においては、5 mM グルコース刺激によるインスリン分泌は 1 mM グルコース刺激によるインスリン分泌と同程度であり、12.5 mM グルコースと 5 mM グルコースとの間で、約 7 倍の差が認められた。これは MIN6 oeGck 細胞単独スフェロイド、MIN6 細胞単独の接着培養によるインスリン分泌の結果と同様であった。更に、Dox で Gck 過剰発現を誘導した偽膵島のインスリン分泌を検討した。MIN6oeGck 単独スフェロイドでは 12.5 mM グルコースにおいて、Dox (-)の場合と比較して Dox (+)による Gck の過剰発現によりインスリン分泌が 2.04 倍増加した(7.45 ± 3.81 vs. 15.20 ± 3.47 , $p = 0.014$, $n = 4$)。 α TC1 細胞 : MIN6oeGck 細胞の比が 0.33:1、0.5:1、1:1 と増えるにつれて、Dox 有無でのインスリン分泌の差が認められなくなり、 α TC1 細胞 : MIN6oeGck 細胞比が 1:1 の場合には、ほぼ Dox の効果が認められなかった。Dox 添加による Gck の過剰発現を確認するために、Western blot を行った。 α TC1 細胞 : MIN6oeGck 細胞比が 0.33:1 で作製した偽膵島でも、1:1 で作製した偽膵島でも、Dox 添加により Gck 蛋白の増加が認められた。ただし、1:1 の場合では Gck の発現増加は軽度であった。これは、 α TC1 細胞 : MIN6oeGck 細胞比を変化させた spheroid の Western blot を同時に行った場合により明らかであった。そこで、さらに Dox 添加で GFP の発現を誘導できる MIN6GFP 細胞を用いて、spheroid を作製した後に、Dox を添加した。この場合には、 α TC1 細胞は、他の遺伝子を導入していないものを用いた。興味深いことに、 α TC1 細胞 : MIN6GFP 比が、1:1 の場合、GFP の発現強度は MIN6GFP 細胞からなる

spheroid の場合より、発現強度が弱く観察された。

【考察】

インスリン分泌機構を明らかにすることは、すなわちインスリン分泌細胞を構成する分子のインスリン分泌における役割を明らかにすることである。これにより、糖尿病の原因の本態である膵β細胞の障害が明らかになり、治療戦略のターゲットの同定にもつながる。それには、インスリン分泌に重要な役割を果たすと考えられる分子の細胞内量を遺伝子発現修飾により変化させて、インスリン分泌への効果を検討することが有用である。このために、遺伝子発現修飾の容易な培養細胞株を用いることは一つの方法であるが、通常の培養は、本来の膵島におけるインスリン分泌細胞の状況とは異なるため、できるだけ近い状況を再現することも重要である。そこで、グルカゴン分泌細胞株であるαTC1細胞とインスリン分泌細胞株であるMIN6細胞を用いて偽膵島を作製し、検討した。

まず、形態に関して検討した。ヒトおよびげっ歯類の膵島では、内部に毛細血管が豊富に存在し、血液を介して酸素や栄養素の供給が行われている。しかし、本研究で作製した偽膵島には血管に相当する組織は存在せず、中心部分に酸素や栄養が届きにくくなっている可能性がある。αTC1細胞とMIN6細胞を同時に播種したところ、本来の膵島と同様の3次元構造を形成し、MIN6細胞が中心部に、αTC1細胞が辺縁部に位置し、2種の細胞比を変えても同様の結果を示した。それぞれの細胞の特性が偽膵島に特徴的な構造の成因であるのかを調べるために、膵島に無関係なNIH-3T3細胞を用いてスフェロイドを作製した。NIH-3T3細胞との組み合わせでは、MIN6細胞の場合は辺縁に位置し、αTC1細胞では細胞が凝集せず、スフェロイドを形成したものはごくわずかであり、それぞれのαTC1細胞は規則的な分布を示さなかった。従って、αTC1細胞とMIN6細胞を合わせたときに生じる構造はそれぞれの細胞の性質ではなく、グルカゴン細胞株とインスリン細胞株を合わせたときに生ずる特異的な親和性によって形成される構造であると考えられる。本研究の観察結果は、偽膵島が細胞接着分子の適切な発現パターンを保持していることを示唆しており、

α 細胞と β 細胞の間の接触を介した細胞間相互作用を研究するのに適したモデルであると考えられる。現在までに細胞株を凝集させたり、マウスの膵島細胞を再凝集させたりした研究は報告されているが、いずれの場合も、インスリン分泌細胞が中心に位置し、グルカゴン分泌細胞が辺縁に位置する。我々の検討も同様の結果であるが、さらに NIH-3T3 細胞を用いた検討で、両者の組み合わせが重要であることが明らかとなった。

α TC1 細胞と MIN6oeGck 細胞を用いて形成した偽膵島では、2000 個の MIN6oeGck 細胞あたりのインスリン分泌量を比較すると、MIN6oeGck 細胞単独スフェロイドの場合に比べて MIN6oeGck 細胞あたりのインスリン分泌量が、特に 1 mM グルコースや 5 mM グルコースの低から正血糖に相当するグルコース濃度でのインスリン分泌が増加していた。この際、 α TC1 細胞割合が 0.33:1、0.5:1、1:1 のいずれの場合でも、同様の効果であった。本研究においては、偽膵島作製時の細胞数を元にインスリン分泌量の比較を行った。偽膵島作製後、インスリン分泌実験時の MIN6oeGck 細胞の実際の細胞数については評価できておらず、評価方法についても検討を行う必要があると考えている。

また、本研究では Dox 添加による Gck 過剰発現のインスリン分泌に対する効果が、 α TC1 細胞が 30%までであれば、偽膵島でも接着培養時と同様に観察されることが明らかになった。興味深いことに、 α TC1 細胞が 50%まで増えると、インスリン分泌増加効果が抑制されている可能性が示された。Western blot 法において、使用した細胞が偽膵島構造を呈しても Gck が過剰発現していることは確認できており、 α TC1 細胞を一定以上混合した場合においてのみインスリン分泌増加が抑制されていることから、 α TC1 細胞がなんらかの形でインスリン分泌を抑制していると考えられた。注意深く検討すると、Gck の発現誘導は α TC1 細胞を一定以上混合した場合に低下することが観察された。このことは、Dox 誘導的に GFP を発現させる MIN6 細胞を用いた場合にも再現された。このことから、Dox が MIN6 細胞に十分到達していない可能性が示唆される。今後より詳細な検討が必要であるが、MIN6 細胞単独の場合は、spheroid 全体で GFP が発現し、中心にも Dox が到達していると考えられた。Dox は分子量 444.4 の小分子である。 α TC1 細胞では細胞間接着がより緊密でこのよう

な分子も拡散のバリアになってしまう可能性が考えられる。この観点からも、spheroid の作製にあたっては、 α TC1 細胞を 10~30%で混合することが、効果的と考えられた。

【結語】

総細胞数 200 個、そのうち α TC1 細胞が 10~30%、MIN6 細胞が 70~90%からなる偽膵島は、インスリン分泌機構を研究する上で、有用なモデルである。

【引用文献】

1. 糖尿病診断基準に関する調査検討委員会: 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告, 糖尿病, 55: 485-504, 2012.
2. Hauge-Evans AC, Squires PE, Persaud SJ, Jones PM. Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: Enhanced Ca^{2+} and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. *Diabetes*. 48:1402-8, 1999.
3. Hauge-Evans AC, Squires PE, Belin VD, et al. Role of adenine nucleotides in insulin secretion from MIN6 pseudoislets. *Mol Cell Endocrinol*. 191:167-76, 2002.
4. Luther MJ, Hauge-Evans A, Souza KL, et al. MIN6 beta-cell-beta-cell interactions influence insulin secretory responses to nutrients and non-nutrients. *Biochem Biophys Res Commun*. 343:99-104, 2006.
5. Kelly C, Guo H, McCluskey JT, Flatt PR, McClenaghan NH. Comparison of insulin release from MIN6 pseudoislets and pancreatic islets of Langerhans reveals importance of homotypic cell interactions. *Pancreas*. 39:1016-23, 2010.
6. Wang H, Iynedjian PB. Modulation of glucose responsiveness of insulinoma beta-cells by graded overexpression of glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:4372-7, 1997.
7. Furukawa A, Tanaka A, Yamaguchi S, et al. Using recombinase-mediated cassette exchange to engineer MIN6 insulin-secreting cells based on a newly identified safe harbor locus. *J Diabetes Investig*. Epub ahead of print, 2021.
8. Wieland FC, Sthijns MMJPE, Geuens T, et al. The Role of Alpha Cells in the Self-Assembly of Bioengineered Islets. *Tissue Eng Part A*. 2020.

9. Hamaguchi K, Utsunomiya N, Takaki R, Yoshimatsu H, Sakata T. Cellular interaction between mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines: possible contact-dependent inhibition of insulin secretion. *Exp Biol Med (Maywood)*. 228:1227-33, 2003.