

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19526

研究課題名(和文)PPY細胞の細胞系譜制御機構の解明 - 新規 細胞起源の探索

研究課題名(英文)Elucidation of PPY cell lineage for development of new beta cell origin

研究代表者

原 朱美 (Hara, Akemi)

順天堂大学・医学部・研究員

研究者番号：60570009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：目的：ノックインマウスを用いたPPY細胞の細胞系譜の追跡により、PPY-細胞間の分化転換制御機構を解明し、PPY細胞が新たな細胞の起源となる可能性を証明する。方法：PPY遺伝子に Cre リコンビナーゼ配列を挿入したノックインマウスを用い、生理的条件下でのPPY遺伝子発現細胞がどのような細胞系譜にあるのかを明らかにする。結果：4～16週齢までのPpy-Cre:Rosa-YFPマウスにおける、GFP、PPY陽性細胞の分布の免疫組織化学的解析を行った。加齢に伴い膵島内にGFP陽性PPY陰性細胞が増加した。成体の膵島内に多くのPPY細胞由来細胞が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we demonstrated the possibility that high fat diet and streptozotocin can induce beta to PPY cell fate conversion in adult pancreas. The aim of this study was to elucidate the mechanism of the fate conversion between PPY and beta cells for development of new beta cell origin. In this study, we used our original mouse monoclonal antibody with a stringent binding specificity for PP. We employed lineage traceable mice, which our original PPY- NLS- Cre knock- in mice were bred with Rosa26-YFP mice. By immunohistochemical study, at 4 weeks of age, majority of GFP positive cells expressed PPY in the periphery of islets. In 8 weeks of age, some GFP positive cells were not positive for PPY. In 16 weeks of age, more than half of GFP positive cells were not positive for PPY in core region of islets, which was mainly occupied by beta cells. Hence, we found that substantial number of beta cells in adult islets were originated from PPY cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：PP細胞 細胞 糖尿病 細胞系譜 分化転換

## 1. 研究開始当初の背景

膵ランゲルハンス島 (膵島)は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、pancreatic polypeptide (PPY)細胞の5種類から構成される。膵島は、インスリン産生 $\beta$ 細胞が球形の細胞集塊としてその大部分を占める。その他の4種類の細胞は、細胞集塊の辺縁に少数分布する。そして、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 細胞の分化過程などについては多くの研究がなされている。一方、PPY細胞の細胞系譜については、Herrera PLらが、PPYプロモーター制御下に、ジフテリアA毒素を発現させ、強制的にPPY遺伝子発現細胞を破壊し、PPY遺伝子発現細胞の細胞系譜を追跡した。結果、 $\beta$ 細胞とPPY細胞が消失し(1)、PPY遺伝子を発現する細胞が $\beta$ 細胞と $\delta$ 細胞の分化に必須であると結論したが、いくつかの問題点が残る。最大の問題は、マウス作製に用いたPPY遺伝子プロモーター配列が十分に解析されていないものであり、**内因性PPY遺伝子の発現をどれだけ反映しているのか保証の限りではない**という点である。したがって、**PPY細胞の細胞系譜は現在明らかではない**。しかし、本研究課題で用いたPPY-Creノックインマウスは、Cre配列挿入部位がPPY遺伝子開始コドン直後と明確であり、PPY細胞の細胞系譜追跡のための方法としては最も生理的である。本研究課題により得られる結果は、最も正確なPPY細胞の細胞系譜、さらに将来的にはPPY遺伝子の機能を証明することができ、糖尿病治療法の開発という臨床応用へと結びつけることが可能であると考え、研究を遂行した。

**「高血糖で増加したPPY細胞は細胞を由来とする。」(平成25、26年度若手研究Bの結果)**

2型糖尿病モデルである高脂肪食及びストレプトゾトシンを投与した(HF+STZ)マウスでは、血糖値が400mg/dL以上という高血糖をきたし、 $\beta$ 細胞が減少する一方、PPY細胞が増

加することを認めた。インスリン遺伝子を発現する細胞を追跡するため、Rat InsulinII promoter-driven Cre (RIP-Cre)とRosa26 promoter-driven GFP (Rosa26R-GFP)両トランスジーンを有する個体にHF+STZ負荷し、血糖値上昇、 $\beta$ 細胞減少、PPY細胞増加が認められる2型糖尿病マウスを作製した。 $\beta$ 細胞系譜追跡により、細胞由来のPPY細胞が複数存在し、それらの細胞では特にPdx1の発現が低下しているという結果を得た。

### **「発生過程からPPY細胞の分布に領域差が生じる可能性」**

膵臓は、発生過程で前腸内胚葉の膵臓予定領域から背側膵芽、腹側膵芽の順に発生し、両者が癒合して形成される。膵臓は、十二指腸葉、脾葉、胆管葉に区分される。膵島細胞の分布は十二指腸葉ではPPY細胞が多く、脾葉では少数である。発生過程からPPY遺伝子発現細胞の分布に領域差があり、PPY細胞から $\beta$ 細胞への分化転換を左右する可能性を踏まえ本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

### **実験計画 1. PPY細胞はどのような細胞系譜をとるのか?**

膵島は、複数の由来をもつ細胞の集まりである(2)(3)。申請者は、膵島内にはPPY細胞由来と非PPY細胞由来両方の $\beta$ 細胞が混在しており、**発生過程でPPY細胞から細胞へと分化した細胞が、ある条件下で再びPPY細胞へと脱分化する能力を保持しているのではないかと考えた**。予備実験で、膵島内の一部の $\beta$ 細胞がPPY細胞由来であることを確認した。本研究課題では、特にPPY細胞と $\beta$ 細胞の分化転換の可能性に焦点を絞り、発生期から成体までPPY遺伝子発現細胞の細胞系譜を膵臓の領域別に解析した。さらに $\beta$ 細胞は、自己複製により数が維持されると考えられている(4)。そこで、長期的な解析により、PPY細胞由来の $\beta$ 細胞数の減少が認められない場

合、加齢に関わらず Ppy 遺伝子発現細胞のβ細胞への分化能が保持され、β細胞の起源 (source)となる Ppy 細胞が、成体でも持続的に供給されることを証明することを目的とした。

## 実験計画2. 2型糖尿病状態における 細胞から Ppy 細胞への分化転換過程の解析

Ppy 遺伝子欠損マウス (Ppy<sup>cre/cre</sup> マウス)の膵組織切片を用いて、市販の抗 Ppy 抗体の特異性を検証した結果、Ppy<sup>cre/cre</sup> マウスにおいてもその陽性細胞が認められ、市販の抗 Ppy 抗体の特異性に乏しいことが判明した。そのため、本研究課題の背景である、細胞から Ppy 細胞への分化転換過程に関する論文作成において、抗 Ppy 抗体の特異性が問題となり投稿が困難となった。そこで、独自にモノクローナル抗 Ppy 抗体 (mPP32-1A8) を作製し、その抗体を用いて全実験を再検討した。

### 3. 研究の方法

#### 実験計画 1. 生理的条件下における Ppy 細胞の細胞系譜の解明

##### (1) モノクローナル抗 Ppy 抗体 (mPP32-1A8) の作成

我々は、Ppy 遺伝子発現細胞 (Ppy 細胞)の細胞系譜を追跡するため、Ppy 遺伝子を一度でも活性化すれば、細胞で YFP が発現するマウス (Ppy-Cre; Rosa26R-YFP)を用いることを目的として、独自に Ppy promoter-driven NLS-Cre ノックインマウス (Ppy-Cre)を作製した (平成 25、26 年度若手研究 B)。この Ppy-Cre マウスのホモ個体 (Ppy<sup>cre/cre</sup>)に Ppy 抗原を免疫し、最終的に免疫組織化学法に適したモノクローナル抗 Ppy 抗体 (mPP32-1A8) を作製した。作製した抗体の特異性を確認するため、野生型マウスおよび Ppy<sup>cre/cre</sup> の膵組織切片を用いた免疫組織化学および Ppy mRNA プロブを用いた in situ ハイブリダイゼーションを行った。

##### (2) Ppy 細胞の細胞系譜の追跡

独自に作製した Ppy promoter- driven NLS-

Cre ノックインマウス (Ppy<sup>cre/+</sup>)と Rosa26 promoter- driven eYFP マウス (Rosa26- YFP) から両遺伝子をもつ Ppy-Cre:Rosa-YFP を作出した。4 から 16 週齢までの Ppy-Cre:Rosa-YFP マウスにおける、抗 GFP、Ppy 抗体陽性細胞の分布の免疫組織化学的解析を行った。

#### 実験計画2. 細胞から Ppy 細胞への分化転換の可能性の解明 (論文投稿のための再検討)

(1) インスリン遺伝子を発現する細胞を追跡するため、Rat InsulinII promoter-driven Cre マウス (RIP-Cre) と Rosa26 promoter-driven eGFP マウス (Rosa26R-GFP) を交配し、両者のトランスジーンを有する個体 (RIP-Cre: Rosa26R-GFP)を作出した。(2) RIP-Cre: Rosa26R-GFP を用いて、以下のからのプロトコールで2型糖尿病マウスを作製した。4 週齢より高脂肪食 (HF)の持続的負荷を開始し、7 週齢時に STZ133mg/kg を腹腔内投与した。高血糖に至るまでの血糖値を測定し、21 週齢にて膵臓を摘出、主に免疫組織化学的解析を行った。(3)免疫組織化学的解析により、GFP 陽性細胞における Ppy 細胞およびインスリン陽性細胞の割合を評価した。(4) β細胞から Ppy 細胞への分化転換が確認できたことから、β細胞から Ppy 細胞までの分化転換の過程を明らかにするため、転写因子などの発現を主に免疫組織化学的手法、分子細胞生物学的手法を用いて解析した。(5)高血糖と、細胞から Ppy 細胞への分化転換の関連性を解析するため、STZ による高血糖誘導 1 週間後、C57BL/6J マウスの膵島 300 個を腎被膜下に移植、血糖を改善し、細胞から Ppy 細胞への分化転換率を免疫組織化学的に解析した。

### 4. 研究成果

#### 実験計画 1. 生理的条件下における Ppy 細胞の細胞系譜の解明

##### (1) モノクローナル抗 Ppy 抗体 (mPP32-1A8)

## の作成

Ppy<sup>cre/cre</sup> に PPY 抗原を免疫し、96 種類のハイブリドーマを作製、その中から二度の免疫組織化学法を用いたスクリーニングを経て、Ppy<sup>cre/cre</sup> の膵島では陽性細胞が認められず、野生型マウスの膵島では明瞭な陽性細胞が認められ、さらに他の膵細胞、結合組織などへの非特異的な反応が最も認められないハイブリドーマ 1 種類 (mPP32-1A8) を得た。さらに、特異性を確認するため、mPP32-1A8 の免疫組織化学法と Ppy mRNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法の二重染色の結果、mPP32-1A8 陽性細胞と Ppy mRNA の発現が一致した。したがって、我々が作製した mPP32-1A8 のマウス PP ペプチドに対する特異性は極めて高いことが確認できた。mPP32-1A8 の作製に関して、現在論文作成中である。

## (2) PPY 細胞の細胞系譜の追跡

4 から 16 週齢までの Ppy-Cre:Rosa-YFP マウスにおける、抗 GFP、PPY 抗体陽性細胞の分布の免疫組織化学的解析を行った。加齢に伴い膵島辺縁領域に GFP 陽性かつ PPY 陰性細胞が増加した。これらの GFP 陽性細胞はインスリン陽性であった。したがって、成体の膵島内には多くの PPY 細胞由来の細胞が存在することが明らかとなった。

## 実験計画 2. 細胞から PPY 細胞への分化転換の可能性の解明 (論文投稿のための再検討)

抗 GFP 抗体、抗 PPY 抗体 (mPP32-1A8)、抗インスリン抗体、その他膵島ホルモンに対する抗体などを用いて、HF+STZ 負荷を施した RIP-Cre: Rosa26R-GFP マウスの免疫組織化学的解析を再検討した。本報告書では、本研究課題で主として行った解析について述べる。結果、膵島内のインスリン陽性細胞数は有意に低下し、PPY 陽性細胞数が増加した。細胞の細胞系譜を解析した結果、膵島内では 32.6% の GFP 陽性細胞がインスリン陰性であ

り、脱顆粒あるいは他の細胞へ分化転換したと推測された。これらの GFP 陽性細胞の 12% が PPY 陽性であった。またその中にはインスリンとの共陽性細胞も複数認められた。HF 負荷のみでは GFP、PP 共陽性細胞はほとんど認められなかった。一方、グルカゴン、GFP 共陽性細胞は全く認められず、ソマトスタチン、GFP 共陽性細胞にほとんど認められなかった。既報において、高血糖条件下において、細胞が Ngn3 を発現する内分泌前駆細胞へ脱分化することが報告されている (5, 6) が、本研究ではインスリン陰性 PPY 陰性 GFP 陽性細胞において Ngn3 は陰性であった。したがって、本研究における GFP 陽性 PPY 陽性細胞は、

細胞が脱顆粒した可能性が示唆され、HF+STZ が、細胞の脱顆粒、および細胞から PPY 細胞への分化転換を誘導すると結論した。さらに、この結論を証明する結果として、我々は、HF+STZ 負荷した RIP-Cre: Rosa26R-GFP マウスの腎被膜下に STZ 負荷 1 週間、正常膵島 300 個を移植し、血糖を改善し、細胞から PPY 細胞への分化転換率を解析した。その結果、細胞から PPY 細胞への分化転換率の有意な変化は認められなかったが、GFP 陽性細胞におけるインスリン陽性細胞が増加し、血糖改善により細胞の脱顆粒が抑制された。以上の結果から、細胞の脱顆粒は血糖改善により改善されるが、細胞は PPY 細胞へ分化転換するが、一度 PPY 細胞に分化転換した細胞が再び細胞に脱分化するという可塑性には乏しいことが明らかとなった。本研究結果は、現在論文作成し、再投稿する予定である。

## 引用文献

1. PNAS 91 (26), 12999-3003, 1994
2. Development 112 (4), 1115-1121, 1991
3. Dev. Dyn. 236 (12), 3451-3458, 2007
4. J Clin Invest 123 (3), 990-995, 2013
5. Cell 150(6), 1223-1234, 2012

6. Cell metabolism, 19(5), 872-882, 2014

出願年月日：2015年12月18日

国内外の別：国内

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 朱美 (HARA, Akemi)

順天堂大学・医学部・研究員

研究者番号：60570009

〔雑誌論文〕(計 1件)

Iida H, Ogihara T, Min MK, Hara A, Kim YG, Fujimaki K, Tamaki M, Fujitani Y, Kim H, Watada H. Expression mechanism of tryptophan hydroxylase 1 in mouse islets during pregnancy. J Mol Endocrinol. 2015 55 (1): 41-53.

DOI: 10.1530/JME-14-0299

〔学会発表〕(計 3件)

A. Hara, Y. Fujitani, T. Ogihara, T. Miyatsuka, H. Watada, Human IAPP impairs the success of islet transplantation, 51st EASD Annual Meeting, Program Number 512, Philadelphia, 14-18 September, 2015

原 朱美、藤谷 与士夫、荻原 健、宮塚 健、綿田 裕孝、ヒト型 IAPP は膵島移植の成功率を低下させる、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、演題番号 II-17-11、口頭発表、山口、2015 年 5 月

原 朱美、藤谷 与士夫、荻原 健、宮塚 健、綿田 裕孝、ヒト型 IAPP は膵島移植の成功率を低下させる、第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会、演題番号 29、口頭発表、京都、2015 年 2 月

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：抗膵ポリペプチドモノクローナル抗体  
発明者：藤谷与士夫、綿田裕孝、原朱美、中尾啓子

権利者：同上

種類：特許

番号：2015-246912