

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09765

研究課題名（和文）PP細胞からみた膵島分化・機能維持のメカニズム

研究課題名（英文）Lineage relationship between PP cells and beta cells

研究代表者

藤谷 与士夫 (Fujitani, Yoshio)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30433783

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：PP細胞は、膵ランゲルハンス氏島中に4種類存在する内分泌細胞の1つである。これまでのところ、PP細胞と他の内分泌細胞との関係はよくわかっていなかった。今回、PP細胞の系譜追跡実験を施行することにより、この細胞は、細胞を含むどのタイプの内分泌細胞にも分化できる、いわゆる内分泌前駆細胞としての特徴を有することが明らかになった。さらに、細胞へ至る分化経路には、PP細胞を経る経路と、PP細胞とは関係のない経路の少なくとも2つが存在することが示唆された。さらに、転写因子の機能喪失実験と過剰発現の実験からPP細胞から細胞への分化過程には、Pdx1とMafAが協調的に働くことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究を通じて、細胞の分化過程においては、PP細胞を経由して細胞に分化する新奇分化経路が存在することが明らかとなった。細胞が喪失した糖尿病患者においてもPP細胞は残存することから、PP細胞を起源として細胞へとリプログラミングさせることによる新たな再生治療法に期待が持てると考えられる。

研究成果の概要（英文）：PP cells are one type of endocrine cells that exist in pancreatic islets. So far, the relationship between PP cells and other endocrine cells has not been well understood. By conducting lineage tracing experiments of PP cells, it was revealed that these cells have the characteristic of endocrine precursor cells that they can differentiate into any type of endocrine cells including cells. Furthermore, it was suggested that there are at least two differentiating pathways leading to cells, that is, a pathway through PP cells and a pathway unrelated to PP cells. Furthermore, from loss-of-function and overexpression experiments of transcription factors, it was shown that Pdx1 and MafA cooperate in the process of differentiation of PP-expressing cells into cells.

研究分野：代謝学

キーワード：PP細胞 細胞 糖尿病 リプログラミング 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体の血糖制御の中枢を担う膵ラ氏島は主に4種類の内分泌細胞、すなわち、 α 、 β 、 δ 、PP細胞から構成される。これらの細胞は全てNgn3陽性の内分泌前駆細胞を経由して分化することが知られている。本研究では、これまでほとんどその生理的意義が解明されていないPP細胞に焦点をあて、その機能の全容解明にむけて、今後必須となる研究ツールと作業仮説の作出を行なう。とくにPP細胞は発生過程で細胞の前駆細胞として機能する可能性が従来から示唆されている。我々のこれまでの研究で、糖尿病状態では細胞がPP細胞に変容する現象を見出していることから、PP細胞は細胞に想像以上に近縁の細胞であり、機能的にも相互に関連のある細胞と考えられる。本研究により、これまでベールに包まれていたPP細胞の生理的機能を今後明らかにするためのプラットフォームが構築されることが期待される

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、PPY遺伝子Creノックインマウスを用いたPP細胞の細胞系譜の追跡により、PP細胞間の分化転換機構を解明し、PP細胞が新たな細胞の起源となる可能性を実証すること、およびPPY遺伝子欠損マウスを作製することにより、PPの生理的機能を明らかにすることである。

3. 研究の方法

PP特異的モノクローナル抗体の開発

PPはNPY、PYYとファミリーを形成し、これらの間の相同性は高い。このため、これまでPPのみを認識する特異的抗体は存在しなかった。本研究では、PP特異的なモノクローナル抗体を作製した。

PPY遺伝子ノックインマウスを用いたPP細胞の細胞系譜の追跡

PPY遺伝子発現細胞(PP細胞)の細胞系譜を追跡するため、PPY promoter-driven NLS-Creノックインマウス(PPY-Cre)とRosa26 promoter-driven YFP reporter マウス(Rosa26-YFP)の2種類のマウスを交配し、PPY-Cre; Rosa26-YFPマウスを作製した。本研究課題では、PPY-Cre; Rosa26-YFPマウスを用いて、胎生初期から成体に至るまでの各ステージで、PPY遺伝子発現細胞の運命を免疫組織化学的に追跡し、長期的なPP細胞の細胞系譜を明らかにした

③PP細胞の機能の解析

PPY遺伝子欠損マウス(PPY^{Cre/Cre})とコントロールC57BL/6マウスに高脂肪食を一定期間負荷し、体重を測定し、耐糖能を解析した。

細胞 PP細胞の分化転換制御機構の解明

i) PP細胞特異的Pdx1欠損マウスの作製

PPY-CreとPdx1^{flox}マウスを交配して、PPY-Cre:Pdx1^{f/f}:Rosa26-YFPを作製してPP細胞でPdx1が不活性化した際のPP細胞の運命を追跡した。

ii) PP細胞特異的Pdx1 and/or 過剰発現マウスの作製

PPY-CreマウスとCAG-flox-CAT-flox-Pdx1もしくはCAG-flox-CAT-flox-MafAマウスを交配して、PP細胞特異的にPdx1単独、MafA単独あるいはPdx1/MafA共過剰発現マウスを作製したさいの、PP細胞の運命を追跡した。

4. 研究成果

PP特異的モノクローナル抗体の開発

PPY遺伝子座にCreをノックインしたPPY-Creマウスをzinc finger nuclease法を用いて作製した。PPY-Cre/Creマウス(PPY欠損マウス)にマウスPPを免疫したのち、ハイブリドーマを作製した。多数のハイブリドーマのうち、その培養上清がPYYと交叉しないものを選別した。さらに、二次スクリーニングとして、培養上清が免疫組織学的にPP細胞と思われる膵島の周辺細胞をラベルする一方でPPY欠損マウスにおいてはシグナルが消失するという基準でクローンを絞り込み、最終的に3つのクローンを得た。このうち、23-2D3抗体は免疫組織学的にマウス、ヒト、ラットのPPを特異的に認識することが判明した。その有用性が認められ、免疫生物研究所(IBM)から販売されることとなった。

PPY遺伝子ノックインマウスを用いたPP細胞の細胞系譜の追跡

PP細胞の細胞系譜追跡を行なう目的で、PPY-CreノックインマウスとROSA26 promoter-EYFP(Rosa26-EYFP)を交配し、PPY-Cre/+;ROSA26-EYFPマウスを作出した。上述のPP特異的抗体

(Hara et al. Endocr J 2019)を用いて12週齢のPPY-Cre/+;ROSA26-EYFPマウスの膵島を解析したところ、PP陽性細胞の90%がGFPでラベルされた。このことより、PPY-Creを用いた細胞系譜追跡の系は正しく機能していることが示唆された。興味深いことに、GFPでラベルされた細胞の中にはPP陽性細胞以外にも、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン陽性細胞が認められた。PPYでlineage labelされたGFP陽性細胞のうち、インスリン陽性細胞に分化した割合が最も多かった。PP細胞が多く存在する膵島部の膵島において観察するとGFP陽性細胞のうち、最終的にPP細胞に分化したのは3割程度に過ぎなかった。以上のことから、PPY発現細胞は、内分泌前駆細胞として機能している可能性がある。細胞側から見ると、PPY lineageとしてラベルされた細胞は全体の15%程度に過ぎないが、ほぼ全ての膵島にはPPY lineageの細胞が存在し、その特徴としては膵島の辺縁を取り囲むように存在していた。このことから細胞へ至る分化経路には、一度PPYを発現して細胞へと分化する経路と、一度もPPYを発現せずに細胞へ分化する経路の少なくとも2つが存在することが示唆された。

③PP細胞の機能の解析

PPY遺伝子欠損マウス(PPY^{Cre/Cre})とコントロールC57BL/6マウスに高脂肪食を一定期間負荷し、体重を測定したところ、両群間で体重差は認められなかった。糖負荷試験も施行したが、両群間で耐糖能の差は認められなかった。

細胞 PP細胞の分化転換制御機構の解明

PPY発現細胞でPdx1を欠損させた場合、あるいはPPY発現細胞にPdx1およびMafAそれぞれ単独、あるいは共発現させたさいの、PPY発現細胞のその後の運命を追跡する実験を行なった。PPY発現細胞においてPdx1を欠損させると、細胞への分化は著しく障害され、その分、non-beta細胞へ分化する細胞が増加した。逆にPdx1をPPY発現細胞において強制発現させると、その後細胞へと分化する細胞数が増加し、さらにMafAを共発現することにより、細胞へ分化する細胞数は更に増加した。MafA単独の発現では細胞への分化には影響を与えなかった。以上から、PPY発現細胞から細胞への分化過程には、Pdx1とMafAが協調的に働くことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Hara A, Nakagawa Y, Nakao K, Tamaki M, Ikemoto T, Shimada M, Matsuhisa M, Mizukami H, Maruyama N, Watada H, Fujitani Y.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Development of monoclonal mouse antibodies that specifically recognize pancreatic polypeptide.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ENDOCRINE JOURNAL	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ18-0441.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miura M, Miyatsuka T, Katahira T, Sasaki S, Suzuki L, Himuro M, Nishida Y, Fujitani Y, Matsuoka TA, Watada H.	4. 巻 36
2. 論文標題 Suppression of STAT3 signaling promotes cellular reprogramming into insulin-producing cells induced by defined transcription factors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 358-366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2018.09.035.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujitani Y	4. 巻 9
2. 論文標題 How does glucagon-like peptide 1 stimulate human α -cell proliferation? A lesson from islet graft experiments.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ENDOCRINE JOURNAL	6. 最初と最後の頁 1255-1257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.12861.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Honda A, Komiya K, Hara A, Fukunaka A, Suzuki L, Miyatsuka T, Ogihara T, Fujitani Y, Watada H	4. 巻 65
2. 論文標題 Normal pancreatic α -cell function in mice with Rip-Cre-mediated inactivation of p62/SQSTM1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrine J	6. 最初と最後の頁 83-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ17-0333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamitani M, Miyatsuka T, Miura M, Azuma K, Suzuki L, Himuro M, Katahira T, Nishida Y, Fujitani Y, Watada H.	4. 巻 496
2. 論文標題 Heterogeneity of autophagic status in pancreatic cells under metabolic stress.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 328-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.01.070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaka A, Fukada T, Bhin J, Suzuki L, Tsuzuki T, Takamine Y, Bin BH, Yoshihara T, Ichinoseki-Skine N, Naito H, Miyatsuka T, Takamiya, S, Sasaki T, Inagaki T, Kitamura T, Kajimura S, Watada H, Fujitani Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Zinc transporter ZIP13 Suppresses Beige Adipocyte Biogenesis and energy expenditure by regulating C/EBP- expression.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS Genet	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1006950.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Uesato T, Oghihara T, Hara A, Iida H, Miyatsuka T, Fujitani Y, Takeda S, Watada H.	4. 巻 2
2. 論文標題 Enhanced Expression of the Key Mitosis Regulator Cyclin B1 Is Mediated by PDZ-Binding Kinase in Islets of Pregnant Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Endocr Soc.	6. 最初と最後の頁 207-219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/js.2017-00338.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujitani Y	4. 巻 64
2. 論文標題 Transcriptional regulation of pancreas development and -cell function [Review].	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocr J	6. 最初と最後の頁 477-486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ17-0098.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計32件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 13件）

1. 発表者名 中川祐子、原朱美、中尾啓子、田蒔基行、松久宗英、水上浩哉、綿田裕孝、藤谷与士夫
2. 発表標題 PP特異的抗PPモノクローナル抗体の作製
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 細胞機能研究の進歩
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福中彩子、藤谷与士夫
2. 発表標題 亜鉛トランスポーターZIP13の制御に基づくペーリュ化決定機構の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深石貴大、佐藤隆史、中川祐子、福中彩子、野口東美、原朱美、綿田裕孝、藤谷与士夫
2. 発表標題 新規Ppyノックインレポーターマウスを用いた内分泌前駆細胞としてのPP細胞の解析
3. 学会等名 第33回日本糖尿病・肥満動物学会 年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Fukaishi, Takashi Sato, Yuko Nakagawa, Ayako Fukunaka, Azumi Noguchi, Akemi Hara, Hirotaka Watada, Yoshio Fujitani
2. 発表標題 PP cells as stage-specific precursors of endocrine pancreas development
3. 学会等名 4th IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Nakagawa, Yoshitaka Hayashi, Tadahiro Kitamura, Yoshio Fujitani
2. 発表標題 Proliferative regulation of pancreatic polypeptide producing cells by the proglucagon gene.
3. 学会等名 4th IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 膵内分泌細胞の恒常性維持とその破綻 non-細胞からみるラ氏島生物学
3. 学会等名 第6回北関東グルカゴン研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川 祐子, 林 良敬, 北村 忠弘, 藤谷 与士夫
2. 発表標題 プログルカゴン遺伝子産物による膵PP細胞の増殖制御機構の解明
3. 学会等名 第17回生体機能研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 細胞の運命維持機構と糖尿病
3. 学会等名 第76回糖尿病臨床・研究開発センター講演会, 徳島大学 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 細胞分化の調節による糖代謝制御
3. 学会等名 Islet Biology Meeting 17 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 膵 細胞の恒常性と糖尿病
3. 学会等名 第8回関西血糖変動研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 糖尿病における膵 細胞の可塑性とその制御
3. 学会等名 第18回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 細胞の恒常性から糖尿病の病態と治療を考える
3. 学会等名 第35回大阪糖尿病研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 代謝内分泌臓器の恒常性維持機構
3. 学会等名 Advance研究会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshio Fujitani
2. 発表標題 Novel mechanisms involved in the homeostasis of pancreatic b cells
3. 学会等名 17th International Congress of Endocrinology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yoshio Fujitani
2. 発表標題 Beta-to-PP cell fate conversion in diabetic mice induced by a high fat diet and streptozotocin
3. 学会等名 The 2nd IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計9件

1. 著者名 藤谷与士夫	4. 発行年 2018年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 5 (全体78)
3. 書名 膵 細胞の老化 in 内分泌・糖尿病・代謝内科	

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所 分子糖代謝制御分野 http://tou-taisha.imcr.gunma-u.ac.jp/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	原 朱美 (Hara Akemi) (60570009)	順天堂大学・医学部・その他 (32620)	