

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15495

研究課題名(和文)可視化によるランゲルハンス島細胞の新規調節因子の探索

研究課題名(英文)Explore of a novel molecule regulating Langerhans cells by visualizing method

研究代表者

中尾 一和 (NAKAO, KAZUWA)

京都大学・医学研究科・特任教授

研究者番号：00172263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膵ラ氏島細胞、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞に特異的な蛍光蛋白を発現する3重トランスジェニックゼブラフィッシュを作成し膵ラ氏島細胞の量・比率の制御のための分子メカニズムに迫ろうとする試みである。蛍光顕微鏡下の画像解析で、細胞数に対する細胞数の割合が5dpfと比較して7dpf以降に急速に増加した。ゼブラフィッシュ膵ラ氏島細胞のフローサイトメトリーでの解析、セルソーターでの膵ラ氏島細胞の採取に係る技術開発に成功した。これらは、膵ラ氏島細胞の正確な採取を可能とし膵ラ氏島内の細胞間相互作用・制御の分子メカニズムの解明につながる重要な技術であり、今後様々な膵ラ氏島関連の研究に寄与してゆくものである。

研究成果の概要(英文)：We developed a triple transgenic zebrafish expressing three types of fluorescent reporter protein for alpha cell, beta cell and delta cell of Langerhans islets of pancreas. Our research purpose was elucidation of molecular mechanism regulating volume and ratio of alpha, beta and delta cell in a Langerhans islet. Imaging analysis of 5dpf, 7dpf and 9dpf triple transgenic zebrafish was performed, and we found that the number of alpha cell was significantly increased than beta cells from 5dpf to 7dpf. To analyze molecular mechanism to regulate alpha cell and beta cell ratio, we developed sorting methods to analyze isolated cells of Langerhans of islet by Flow cytometry. Our result and developed methods have a potential to contribute future researches of Langerhans islet cells.

研究分野：内分泌学

キーワード：膵ランゲルハンス島、ゼブラフィッシュ、アルファ細胞、ベータ細胞、デルタ細胞、共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメトリー、セルソーター

1. 研究開始当初の背景

膵ランゲルハンス島(膵ラ氏島)の、
細胞(ラ氏島細胞)は、各々グルカゴン、
インスリン、ソマトスタチンを分泌すること
で糖代謝を制御する。分子生物学の進歩
によりラ氏島細胞の機能調節機構が解明さ
れることで、生理的な糖代謝を行うため
には、
細胞のいずれもが重要な役割
を持つことが分かってきた(Kulkarni
RN,2009)(BraunM,2014)(Unger
RH,2011)。このため、
細胞のみならず、
各ラ氏島細胞の量や割合の変化は、生体の
糖代謝を考えるうえでその重要性を増し
つある。

2. 研究の目的

本研究では、膵ラ氏島細胞(細胞、
細胞、細胞)の量や割合の変化を起す過
程を光学的に透明なゼブラフィッシュを用
いてつぶさに観察・解析を行った。特に、
各細胞腫において互いの割合の変化が顕著
であった細胞と細胞につき、細胞間の
相互作用の成魚の分子メカニズムの解明の
ためセルソーティングにより細胞細胞
をフローサイトメトリー法にて解析をおこ
ない、さらにセルソーターで分取する方
法を確立した。ゼブラフィッシュの膵ラ氏
島細胞を解析するうえでセルソーターによる
解析の報告はなく、膵ラ氏島細胞の.1細胞
単位の解析を可能とする点が画期的である。

3. 研究の方法

(1)膵ラ氏島の、
細胞に対する
蛍光レポーター蛋白(Gcga:mTurquoise、
Ins:mCherry, sst2:mVenus Tg fish)を蛍
光顕微鏡にて観察し、各細胞数をカウント
することで膵ラ氏島細胞の量を測定する
とともに、互いの細胞数を比較すること
で割合を計測した。

(2)ゼブラフィッシュをコラゲナーゼ
処理することで単離細胞を作成し、フロー
サイトメトリーにて膵細胞、および細胞
の細胞集団を同定した。さらに、この情
報を基に各細胞をソーティングにより分
取した。

4. 研究成果

(1)蛍光観察により5dpfのゼブラフィ
ッシュ幼生の膵ラ氏島において細胞
(mCherryのシグナル陽性)と細胞
(mVenusのシグナル陽性)が数の上で優
位であった。細胞(mTurquoiseのシ
グナル陽性)は相対的に少なかった。7dpf
の幼生

においては細胞の数と細胞の数の割合
に顕著な変化はなかったが、細胞の数が
大きく増加した。つまり、細胞の細胞、
細胞に対する割合が増加することが明
らかとなった。

(2)膵ラ氏島細胞の中で特に糖代謝に
強い影響を及ぼすグルカゴンとインス
リンを分泌する細胞と細胞の割合が5dpf
から7dpfの期間で変化することに着目
し、フローサイトメトリーで解析を行
った。膵ラ氏島細胞のフローサイトメ
トリーを5dpfおよび7dpfの野生型
ゼブラフィッシュでおこなった。遊離
細胞をFSC及びSSCで展開した時の
(P1(WT))領域をゲートし、
mCherry(FL1)及びmTurquoise(FL2)
で表示した。これにより、mCherry(FL1)
、mTurquoise(FL2)のいずれもが陰
性である細胞集団の領域を決定した。
続いて、Tri-Tgゼブラフィッシュの
遊離細胞から(P1(Tg))領域をゲ
ートした。mCherry(FL1)及び
mTurquoise(FL2)で展開した。WT
と比してTgにみられる細胞集団として
Gate1(細胞)およびGate2(細胞)
を同定した。FSC,SSC,FL1,FL2
の4パラメーターを同時に表示した
3D解析(SSCの高いシグナルは赤、
低いシグナルは緑で表示)において
Gate1の細胞集団はSSCが高い(赤
色)、同様にGate2の細胞におい
てもSSCが高かった。SSCの高さは
細胞の内部構造の複雑さを反映する
ことから細胞内に分泌顆粒をもつ
細胞や細胞に矛盾しなかった。さら
にGate1およびGate2をセルソー
ターにて分取すると、それぞれ
mturquoise陽性とmCherry陽性の
シグナルをもつことが蛍光顕微鏡
で観察でき、細胞と細胞が選択
的に分取可能であることが確認され
た。

(3)以上より、膵ラ氏島細胞のうち
細胞と細胞の割合が大きく変化する
5dpf及び7dpfの間の細胞間相互
作用の存在に興味をもたれ、本研
究において膵ラ氏島細胞の分取を
可能とした技術により今後膵ラ
氏島内細胞相互作用に関する分子
制御メカニズムの研究展開が期待
できる。

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)

[雑誌論文](計11件)

1. Ablation of the N-type calcium
channel ameliorates diabetic
nephropathy with improved
glycemic control and reduced
blood pressure.
Ohno S, Yokoi H, Mori K, Kasahara
M, Kuwahara K, Fujikura J, Naito
M, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A,

- Saleem MA, Numata T, Mori Y, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M
Sci Rep.2016 Jun ; 7;(6)27192.
2. Overall safety and efficacy of high-dose and low-dose intravenous glucocorticoid therapy in patients with moderate-to-severe active Graves' ophthalmopathy. Ueda-Sakane Y, Kanamoto N, Fushimi Y, Tanaka-Mizuno S, Yasuno S, Miura M, Sone M, Yasoda A, Okada T, Togashi K, Nakao K, Inagaki N: *Endocr J*.2016; Jun (5)
 3. Brain-specific natriuretic peptide receptor-B deletion attenuates high-fat diet-induced visceral and hepatic lipid deposition in mice. Yamashita Y, Yamada-Goto N, Katsuura G, Ochi Y, Kanai Y, Miyazaki Y, Kuwahara K, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Ohinata K, Inagaki N, Nakao K: *Peptides* 2016 ;(81)38-50
 4. High incorporation of long-chain fatty acids contributes to the efficient production of acylated ghrelin in ghrelin-producing cells. Bando M, Iwakura H, Koyama H, Hosoda H, Shigematsu Y, Ariyasu H, Akamizu T, Kangawa K, Nakao K
FEBS Lett 2016;(590)992-1001
 5. Impaired adipogenic capacity in induced pluripotent stem cells from lipodystrophic patients with BSCL2 mutations. Mori E, Fujikura J, Noguchi M, Nakao K, Matsubara M, Sone M, Taura D, Kusakabe T, Ebihara K, Tanaka T, Hosoda K, Takahashi K, Asaka I, Inagaki N, Nakao K: *Metabolism* 2016 (65)543-556
 6. Establishment of Leptin-Responsive Cell Lines from Adult Mouse Hypothalamus. Iwakura H, Dote K, Bando M, Koyama H, Hosoda K, Kangawa K, Nakao K: *PLoS One* 2016. Feb 5;11(2):e0148639
 7. Reevaluation of anti-obesity action of mazindol and elucidation of its effect on the reward system. Aotani D, Son C, Shimizu Y, Nomura H, Hikida T, Kusakabe T, Tanaka T, Miyazawa T, Hosoda K, Nakao K. *Neurosci Lett*. 2016 Oct (28)633:141-145.
 8. MiR30-GALNT1/2 Axis-Mediated Glycosylation Contributes to the Increased Secretion of Inactive Human Prohormone for Brain Natriuretic Peptide (proBNP) From Failing Hearts. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Fujishima A, Oka S, Tsutamoto T, Kinoshita H, Nakao K, Cho K, Inazumi H, Okamoto H, Nishida M, Kato T, Fukushima H, Yamashita JK, Wijnen WJ, Creemers EE, Kangawa K, Minamino N, Nakao K, Kimura T. *J Am Heart Assoc*. 2017 Feb 10;6(2)e003601.
 9. Endothelium-Derived C-Type Natriuretic Peptide Contributes to Blood Pressure Regulation by Maintaining Endothelial Integrity. Nakao K, Kuwahara K, Nishikimi T, Nakagawa Y, Kinoshita H, Minami T, Kuwabara Y, Yamada C, Yamada Y, Tokudome T, Nagai-Okatani C, Minamino N, Nakao YM, Yasuno S, Ueshima K, Sone M, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. *Hypertension*.2017 Feb;69(2):286-296
 10. Role of leptin in conditioned place preference to high-fat diet in leptin-deficient ob/ob mice. Shimizu Y, Son C, Aotani D, Nomura H, Hikida T, Hosoda K, Nakao K. *Neurosci Lett*. 2017 Feb 15;640:60-63.
 11. MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion and tumour formation. Otsubo K, Goto H, Nishio M, Kawamura K, Yanagi S, Nishie W, Sasaki T, Maehama T, Nishina H, Mimori K, Nakano T, Shimizu H, Mak TW, Nakao K, Nakanishi Y, Suzuki A. *Oncogene*. 2017 Mar 27. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 0 件)

京都大学大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号：00724535

〔図書〕(計 2 件)

1. 『Q&A 生活習慣病の科学 Neo
- 京都大学健康市民講座』中尾一和 編集、京都大学学術出版会、2016
2. 『Endocrinology of the Heart in Health and Disease: Integrated, Cellular, and Molecular Endocrinology of the Heart』Jonathan C. Schisler・Charles H Lang・Monte Willis 編集
「2.Adrenomedullin」錦見俊雄、桑原宏一郎、中川靖章、寒川賢治、中尾一和、Academic Press、2016

(4)研究協力者
該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

5. 研究組織

(1)研究代表者

中尾 一和 (NAKAO KAZUWA)
京都大学大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：00172263

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

神田 一 (KANDA HAJIME)