

令和元年6月17日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19654

研究課題名(和文) シングルセルエピゲノム解析を用いた膵細胞増殖制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms regulating pancreatic b-cell proliferation using single-cell epigenomic analysis

研究代表者

稲垣 暢也 (Inagaki, Nobuya)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30241954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞量減少は糖尿病予防・治療の重要な課題であるが膵細胞量の制御機構の全容は不明である。本研究では若齢及び高齢マウスに対して膵細胞の強力な増殖刺激となる膵部分切除術を行い、シングルセルレベルの遺伝子発現解析をはじめとしたマルチオミクス解析を行い、膵細胞が4つの亜集団に分類されること、亜集団の1つとして細胞増殖関連遺伝子を発現する増殖細胞が若齢にのみ存在することを見出した。さらに、膵細胞増殖を制御する新規転写因子候補を同定し、今後、機能解析を予定している。さらに本研究では膵細胞増殖可視化マウスを樹立し、透明化技術と組み合わせることで膵細胞増殖を簡便に定量化することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵細胞量減少は糖尿病予防・治療の重要な課題であるが膵細胞量の制御機構の全容は不明であり、膵細胞量を標的とした糖尿病治療法は存在しない。特に加齢とともに膵細胞が増殖能を失う分子機序については、十分な検討がなされていない。膵細胞の増殖制御機構を解明しようとする本研究は、糖尿病の発症や重症化を阻止するための全く新しい治療戦略創出の糸口となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms regulating pancreatic cell mass remain largely unknown; and need to be investigated critically to invent potential therapeutics for diabetes. The current study aims to understand such mechanisms through multi-omics approaches including single-cell RNA-sequence of cells before and after partial pancreatectomy, which induces robust cell proliferation in young but not old mice. Our study revealed that cells falls into 4 distinct subpopulations, one for which is characterized by expression of genes involved in cell proliferation and found only in young mice. We also found novel transcriptional factors possibly involved in cell proliferation. In addition, we succeeded in the establishment of mice expressing the cell cycle reporter in cells. Combined with the tissue clearing technique, we succeeded in measuring cell proliferation in situ.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵細胞 増殖 インスリン 老化

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は膵細胞の機能不全および膵細胞量の低下を病因とし、その克服は世界的に最も重要な課題である。膵細胞機能不全については分子レベルでの研究が飛躍的に進み、多くの治療薬が開発されている。一方、膵細胞量については糖尿病患者で減少していることが報告され重要性は明確であるが、その分子基盤の全容は依然として不明であり、膵細胞量を標的にした糖尿病の発症予防および治療法は確立されていない。

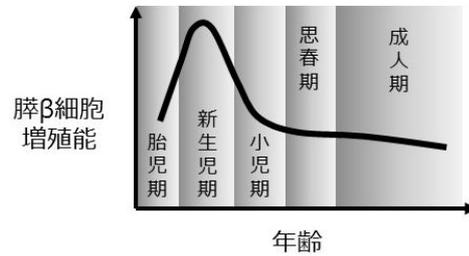


図1. 膵細胞増殖の経年的変化

膵細胞の増殖は、ヒトおよびげっ歯類において生後間もなく急激なピークを迎え、加齢とともに低下する(図1)。このため、若年では肥満、妊娠などのインスリン需要が増大する状況において代償的に膵細胞が増殖し糖代謝恒常性が維持されるが、高齢では代償できず容易に糖尿病に陥る。従ってこの加齢による膵細胞増殖低下のエピゲノム制御の分子基盤を解明できれば、糖尿病の発症および進展を抑制する手法が確立できる可能性がある。

しかしながら成体の膵島内において増殖膵細胞の割合が極めて低いこと、また増殖能に関する膵細胞の不均一性(増殖能を有する膵細胞と増殖能を失った膵細胞が混在した状態)から、従来の解析方法論では膵細胞増殖の機序解明は困難であった。

加えて、膵細胞増殖の研究において致命的な問題として、既存の核酸アナログおよびM期関連遺伝子の発現を二次元的免疫組織科学的手法により評価することには、特異度および定量性の問題で限界がある。このため、膵細胞特異的で、三次元的に増殖を評価できる系の樹立が必要不可欠である。

2. 研究の目的

(A) 膵細胞増殖制御遺伝子ネットワーク及び最上流に位置する鍵分子の同定

増殖刺激後の膵島内細胞の個別の遺伝子発現プロファイルを探索することにより、増殖膵細胞に特異的な遺伝子発現変化を網羅的に解析する。その結果から膵細胞増殖を制御する遺伝子ネットワークを見出し、その最上流で遺伝子発現を制御する鍵分子を同定する。

(B) 膵細胞増殖能制御における鍵分子の生理機能の明確化

膵細胞特異的に同定した鍵分子の発現量を調整可能なマウスを作製・解析し、加齢に伴う膵細胞増殖能低下における役割を生体内で明確化する。

加えて、膵細胞特異的に細胞周期プローブを発現する遺伝子改変マウスを作成し、膵細胞に特異的な増殖評価系の樹立と我々の見出した膵細胞増殖刺激因子の生体内での作用の可視化、および *in vivo* イメージングも行う。

3. 研究の方法

若齢(8週齢)及び高齢(1年齢)のC57BL/6Jマウスを用いて、膵細胞増殖を促進する膵部分切除(PPTx)を行い、術後2日において以下の解析を行った。まず、術後2日にマウスを解剖、膵摘出およびパラホルムアルデヒド固定を行ったのち切片を作成し、膵細胞増殖を免疫組織学的に検討した。続いて、術後2日のマウスから膵島を単離し、その単離膵島に対して従来型のRNAシーケンシング(RNA-seq)およびシングルセルRNAシーケンシング(scRNA-seq)を行い解析した。特にscRNA-seqは近年、臓器を構成する細胞の不均一性の解明や、その中の稀少集団の解析において画期的な進歩が期待されている手法である(Science 2014; 344(6190):1396-1401)。また、発現変動遺伝子のネットワーク解明と下流ターゲットのエピジェネティックな制御機序解明のため、Assay for Transposase Accessible Chromatin Sequencing(ATAC-seq)によるオープンクロマチン領域の解析を行った。

同時に、臓器特異的に細胞周期プローブを発現する遺伝子改変マウスを膵細胞特異的にCreを発現するマウスと交配することによりFucci2aRマウスを作成、その膵組織を摘出、透明化することにより三次元的に膵細胞増殖の評価を行なった。

4. 研究成果

膵細胞増殖率を若齢マウスと高齢マウスで比較したところ、若齢マウスではPPTx応答性にBrdUで標識される増殖膵細胞が増加する一方、高齢マウスでは増殖膵細胞が一部確認されるものの、若齢マウスと比して圧倒的に少なかった(図2)。

高齢マウスにおいて膵細胞が増殖しない分子メカニズムを明らかにすべく、PPTx群、対照群のマウスから単離した膵島に対してRNA-seq解析を行なった。結果のVolcano plotを図3に示す。若齢では、PPTxにより693の発現上昇遺伝子および573の発現低下遺伝子を認めた。一方高齢では、52の発現上昇遺伝子と31の発現低下遺伝子を認めた。Gene Ontology解析にて発現変動遺伝子の傾向を確認したところ、若齢では細胞周期、有糸分裂等に関連した遺伝子群が上昇していたのに対し、高齢では炎症反応や免疫反応に関連した遺伝子群が上昇していた。このことから、若齢では強力な膵細胞増殖の誘導を反映した遺伝子発現プロファイルの変化が起こっているのに対し、高齢ではPPTxの侵襲に対する反応を反映しているのみで、膵細胞増殖を誘導する遺伝子、およびそれらの下流で誘導される遺伝子については誘導されない可能性が考えられた。しかしながら、前述のように膵島内の細胞の中にも異なった遺伝子発現を持つ亜集団が存在し、増殖能の点で異なっていること、膵島内には細胞、細胞、PP細胞、血球系細胞などの他の細胞集団も存在していることから、これらの発現変動遺伝子の中で、どの遺伝子が膵細胞増殖を制御しているのかを明らかにするためには、膵島全体での遺伝子発現のみで議論を行うには限界があると考えた。そこで、scRNA-seqを用いてこれら単離膵島内の1細胞レベルでの遺伝子発現プロファイルを調べた。

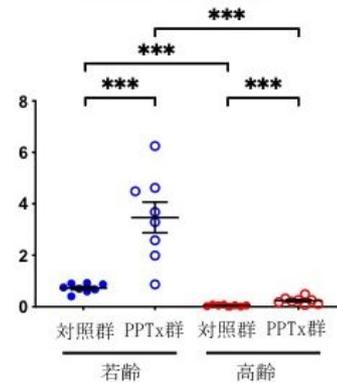


図2. PPTxによる膵細胞増殖率の変化

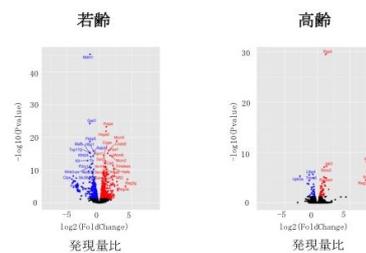


図3. 従来型RNA-seqにより同定された発現変動遺伝子

若齢および高齢マウスの術後2日目の膵島を単離し、トリプシン処理で単細胞化したのちscRNA-seqを施行した。最終的に1623細胞の遺伝子プロファイルが確認された。シーケンス結果を次元削減処理したtSNE plotの結果を図4に示す。クラスタリングにより、0から6までの7つの細胞集団が観察された。このうち、クラスター0、2、3、5はインスリン陽性の細胞、クラスター1はグルカゴン、ソマトスタチンまたはPancreatic Polypeptide陽性の非内分泌細胞、クラスター4は膵管細胞、クラスター6は血球系細胞であった。これらのクラスターの中で、クラスター5はM期関連遺伝子や細胞周期関連遺伝子を含む、増殖膵細胞と考えられた。続いてクラスター5と、クラスター0、2、3を比較することにより、増殖膵細胞集団に特異的な遺伝子を検出した。結果、若齢でPPTxにより発現亢進がみられた693の遺伝子のうち、104の遺伝子が増殖膵細胞集団で発現亢進していることが確認された。

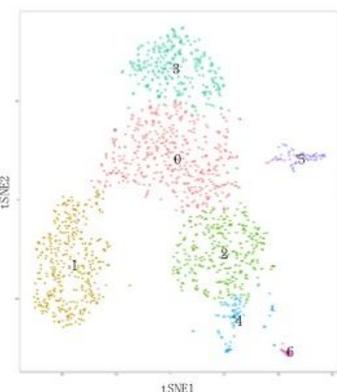


図4. tSNE plotで示すscRNA-seqによる膵島内細胞の遺伝子発現

また、術後2日目の単離膵島に対してATAC-seqによるオープンクロマチン領域の検索を行い、若齢、高齢マウスそれぞれでPPTx群に特異的なオープンクロマチン領域の同定を行なった。若年PPTx群では9225の、高齢PPTx群では4142の領域を特異的なオープンクロマチン領域として同定した。これらの特異的なオープン領域の塩基配列からコンセンサス配列の抽出を行なった。

現在これらのscRNA-seqで得られた104の候補遺伝子について、詳細なネットワーク解析により、最上流に位置するもの、およびネットワーク全体を制御する新規上流因子について解析を行い、いくつかの候補となる転写因子を得た。また、それらの転写因子の結合モチーフと、ATAC-seq解析から得られたコンセンサス配列との統合解析により、候補転写因子の下流のゲノム領域がエピジェネティックに制御されている知見を得た。

加えて、生体内における膵細胞増殖を可視化すべく膵特異的に細胞周期プローブを発現する遺伝子改変マウス(Fucci2aRマウス)を樹立し、膵細胞増殖を刺激するインスリン受容体拮抗薬S961を投与下にBrdUラベルしたFucci2aRマウスの膵島を免疫組織染色により解析したところ、BrdUによる従来の評価系と矛盾することなく膵細胞増殖を評価できることを確認した。また透明化技術を組み合わせることで、個体における膵細胞増殖をより簡便に定量化することに成功した(論文発表2, 図5)。

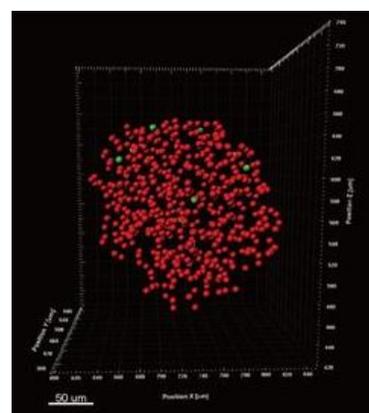


図5. 透明化技術による増殖膵細胞の可視化

一方、生体内における膵 細胞増殖のリアルタイム・モニタリングを試みたが、増殖する細胞が少ないことに加え、マウスを生存状態で G0 から M 期まで全細胞周期を観察することは難しく、現在条件検討を行っている。

今後の研究の方向性として、候補となる上流の転写因子が膵 細胞増殖をどのように制御しているのか、候補転写因子を欠失するマウスモデルを作成し、その機序解明を行う。並行して候補転写因子の、膵 細胞におけるゲノム結合部位の同定、膵 細胞増殖ネットワークの解明も行う。

引き続き高齢マウスにおいてこの膵 細胞増殖機構が機能しない機序の解明も行う。最終的には候補転写因子を活性化できる因子を検索し、膵 細胞増殖促進薬の実用化が期待される。さらに、今回シングルセル解析によって、背景 細胞に3つの亜集団が認められたが、その中から増殖刺激に反応する集団およびその分子マーカーの検索を行なっている。Fucci マウスおよび透明化技術と組み合わせることにより、この亜集団と増殖膵 細胞、脈管系、神経系の位置関係についても解明を計画している。同時にインスリン分泌の点で機能分化した 細胞集団の検索も行なっている。増殖、分泌、それぞれの分子マーカーを解明し、iPS 細胞からの 細胞作成に応用すれば、機能、量、それぞれの点で目的にあった 細胞を効率的に作成することができると考えられ、糖尿病治療に大きく貢献できる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

[論文発表] (計 11 件)

1. Liu Y, Harashima SI, Wang Y, Suzuki K, Tokumoto S, Usui R, Tatsuoka H, Tanaka D, Yabe D, Harada N, Hayashi Y, Inagaki N. Sphingosine kinase 1-interacting protein is a dual regulator of insulin and incretin secretion. *FASEB J*. 2019;33:6239-6253.
2. Shinsuke Tokumoto, Daisuke Yabe, Hisato Tatsuoka, Ryota Usui, Muhammad Fauzi, Ainur Botagarova, Hisanori Goto, Pedro Luis Herrera, Masahito Ogura, Nobuya Inagaki. Three-dimensional analysis of β -cell proliferation by a novel mouse model. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/659904>
3. Sankoda A, Harada N, Kato T, Ikeguchi E, Iwasaki K, Yamane S, Murata Y, Hirasawa A, Inagaki N. Free fatty acid receptors, G protein-coupled receptor 120 and G protein-coupled receptor 40, are essential for oil-induced gastric inhibitory polypeptide secretion. *J Diabetes Investig*. 2019 Apr 19.
4. Murata Y, Harada N, Yamane S, Iwasaki K, Ikeguchi E, Kanemaru Y, Harada T, Sankoda A, Shimazu-Kuwahara S, Joo E, Poudyal H, Inagaki N. Medium-chain triglyceride diet stimulates less GIP secretion and suppresses body weight and fat mass gain compared with long-chain triglyceride diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019 Apr 16.
5. Shimazu-Kuwahara S, Kanemaru Y, Harada N, Ikeguchi E, Ueda Y, Yamane S, Murata Y, Yasoda A, Kieffer TJ, Inagaki N. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide deficiency reduced fat accumulation and insulin resistance, but deteriorated bone loss in ovariectomized mice. *J Diabetes Investig*. 2018 Nov 19.
6. Hirota K, Furuya M, Morozumi N, Yoshikiyo K, Yotsumoto T, Jindo T, Nakamura R, Murakami K, Ueda Y, Hanada T, Sade H, Yoshida S, Enomoto K, Kanai Y, Yamauchi I, Yamashita T, Ueda-Sakane Y, Fujii T, Yasoda A, Inagaki N. Exogenous C-type natriuretic peptide restores normal growth and prevents early growth plate closure in its deficient rats. *PLoS One*. 2018;13:e0204172.
7. Ikeguchi E, Harada N, Kanemaru Y, Sankoda A, Yamane S, Iwasaki K, Imajo M, Murata Y, Suzuki K, Joo E, Inagaki N. Transcriptional factor Pdx1 is involved in age-related GIP hypersecretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018;315:G272-G282.
8. Hirota K, Yasoda A, Kanai Y, Ueda Y, Yamauchi I, Yamashita T, Sakane Y, Fujii T, Inagaki N. Live imaging analysis of the growth plate in a murine long bone explanted culture system. *Sci Rep*. 2018;8:10332.
9. Jambaljav B, Tanaka D, Nagashima K, Harashima SI, Harada N, Harada T, Fujiwara Y, Wang Y, Liu Y, Tabara Y, Matsuda F, Koizumi A, Inagaki N. Whole-exome sequencing in a Japanese family with highly aggregated diabetes identifies a candidate susceptibility mutation in ADAMTSL3. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;135:143-149.

10. Suzuki K, Iwasaki K, Murata Y, Harada N, Yamane S, Hamasaki A, Shibue K, Joo E, Sankoda A, Fujiwara Y, Hayashi Y, Inagaki N. Distribution and hormonal characterization of primary murine L cells throughout the gastrointestinal tract. J Diabetes Investig. 2018;9:25-32.

11. Hamamatsu K, Fujimoto H, Fujita N, Murakami T, Kimura H, Saji H, Inagaki N. Establishment of a method for in-vivo SPECT/CT imaging analysis of (111)In-labeled exendin-4 pancreatic uptake in mice without the need for nephrectomy or a secondary probe. Nucl Med Biol. 2018;64-65:22-27.

〔学会発表〕(計5件)

1. Hisato Tatsuoka, Daisuke Yabe, Satoko Sakamoto, Akira Watanabe, Ryota Usui, Ainur Botagarova, Shinsuke Tokumoto, Hisanori Goto, Masahito Ogura and Nobuya Inagaki. Single cell RNA-sequencing dissects proliferation of pancreatic beta cells. 79th Scientific Sessions of American Diabetes Association, 10th/Jun/2019. San Francisco, USA.

2. Shinsuke Tokumoto, Daisuke Yabe, Hisato Tatsuoka, Ryota Usui, Muhammad Fauzi, Hisanori Goto, Masahito Ogura, Nobuya Inagaki. Generation of a Novel Mouse Model to Study β -Cell Proliferation. 79th Scientific Sessions of American Diabetes Association, 8th/Jun/2019. San Francisco, USA.

3. 徳本信介, 矢部大介, 龍岡久登, 臼井亮太, 後藤久典, ファウジムハンマド, ボタガロバア イヌラ, 小倉雅仁, 稲垣暢也. 細胞周期可視化蛍光プローブ Fucci2aR を用いた膵 細胞増殖の新規定量法の開発. 第62回日本糖尿病学会年次学術集会, 2019年5月23日. 仙台. (日本糖尿病学会若手研究奨励賞受賞).

4. 龍岡久登, 矢部大介, 坂本智子, 渡辺亮, 臼井亮太, Botagarova Ainura, 徳本信介, Muhammad Fauzi, 後藤久典, 小倉雅仁, 稲垣暢也. 老化による膵 細胞増殖能低下の分子機構のマルチオミクス解析. 第62回日本糖尿病学会年次学術集会, 2019年5月23日. 仙台.

5. Hisato Tatsuoka, Daisuke Yabe, Satoko Sakamoto, Akira Watanabe and Nobuya Inagaki. Difference in epigenetic regulations between young and old mice explored the mechanism of beta cell proliferation. International Symposium on Epigenome 2019. 4th/Feb/2019. Tokyo, Japan.

6. 渡辺亮, 中村正裕, 龍岡久登, 矢部大介, 稲垣暢也, 膵臓の再生を明らかにするシングルセル遺伝子発現及びマルチオミクス解析. 第61回日本糖尿病学会年次学術集会. 2018年5月26日. 東京.

7. Hisato Tatsuoka, Masahiro Nakamura, Daisuke Yabe, Ryota Usui, Fauzi Muhammad, Shinsuke Tokumoto, Yumiko Tahara, Masahito Ogura, Kazuaki Nagashima, Akira Watanabe, Nobuya Inagaki: Genetic and epigenetic programs for regenerating pancreatic β -cells following partial pancreatectomy in mice. Kyoto Diabetes Mini-Symposium: Beta Cell Replacement Strategies. 2017年6月5日. 京都大学医学部芝蘭会館.

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 矢部 大介 (京都大学大学院医学研究科 先端糖尿病学 特定准教授)
ローマ字氏名: YABE, Daisuke

研究協力者氏名: 渡辺 亮 (京都大学 iPS 細胞研究所 未来生命科学開拓部 主任研究員)
ローマ字氏名: WATANABE, Akira

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。