

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08984

研究課題名(和文)新規 細胞起源の探索—PPY細胞の細胞系譜制御機構の解明

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)

埼玉医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60570009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、Pdx1f/f or f/+ or +/+; Rosa26-eYFPマウスの膵臓に、電気穿孔法により、rat insulinII promoter-Creプラスミドを遺伝子導入し、膵島辺縁部のVirgin (V)細胞を選択的に標識して系譜を追跡した。結果、遺伝子導入された膵島辺縁部に存在するYFP発現V細胞が、時間経過と共に膵島中央部へと移動することが明らかとなった。さらに、膵島辺縁領域に位置する未分化細胞のPdx1遺伝子濃度の低下により、未分化細胞から細胞あるいはPP細胞への分化転換が誘導され、分化転換率に膵臓の領域差が存在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の電気穿孔法は、膵炎を惹起しないため炎症による影響を受けず、導入遺伝子は局所的に導入されホストとなるマウスの遺伝子型により、導入遺伝子の発現量を調節できる。遺伝子導入により組み換えが起きた遺伝子を長期的に発現させることが可能。膵島内で、目的遺伝子欠損細胞と非欠損細胞が存在することとなりモザイク解析が可能であり、このような膵島への遺伝子導入法は、世界でも未だ報告がない。我々の研究成果は、単一の細胞における遺伝子発現変化による分化転換制御機構を、個体の恒常性を保持した条件で解明した結果で、「真の細胞の性質」を解明する一歩となり、今後、新たな糖尿病治療法の開発への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the gene functions that regulate the maintenance of differentiated traits in β -cells, it is necessary to analyze the function of each gene in individual cells under conditions unaffected by physiological changes. We transfected the rat insulinII promoter-Cre plasmid into the pancreas of Pdx1f/f or f/+ or +/+; Rosa26-eYFP mice by electroporation. Then, Virgin (V) cells in the peripheral region of pancreatic islets were selectively labeled and lineage traced. The analysis revealed that YFP-expressing V cells in the gene-transfected islet peripheral region migrated to the core region of the islet. Furthermore, a decrease in Pdx1 gene concentration in undifferentiated cells located in the islet peripheral region induced differentiation conversion from undifferentiated cells to β cells or PP cells, indicating that there are regional differences in the rate of differentiation conversion in the pancreas.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞 Virgin 細胞 PP細胞 細胞 分化転換 膵島 電気穿孔法

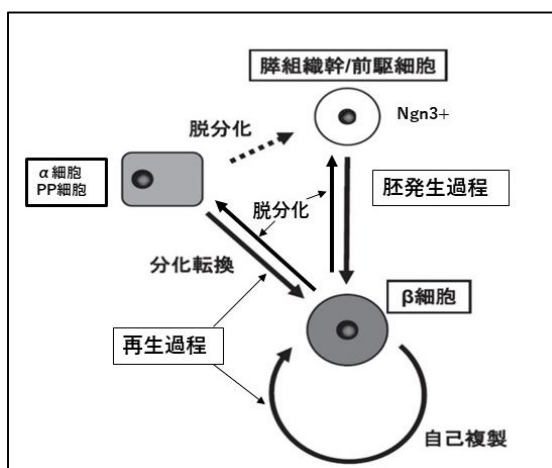
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 「細胞は持続的高血糖によって PPY 細胞への分化転換が誘導される」 我々のこれまでの検討において、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負荷した (HF+STZ) マウスでは、血糖上昇持続に伴い、細胞で Pdx1 発現量が低下し、細胞から PPY 細胞への分化転換が誘導された。さらに、細胞から PPY 細胞への分化転換は持続する高血糖に依存すると結論づけた。我々は、元来、PPY 細胞は細胞の未分化な状態の細胞であり、発生過程で PPY 細胞から細胞へ分化成熟した細胞が、高血糖ストレス下で再び PPY 細胞へと脱分化しているのではないかと考えた。(2) PPY-Cre ノックインマウスの作製と抗マウス PPY モノクローナル抗体の作製 (平成 27、28 年度若手研究 B) これまで市販されていた抗 PPY 抗体は、ポリクローナル抗体であり、抗体の特異性に乏しく、我々のこれまでの検討でも、PPY 欠損マウスの膵島においても複数の陽性細胞が認められた。また、多くの文献において、その特異性の低さについては問題となっていた。そこで PPY に特異的な抗体の作製を試みた。まず、我々は、Ppy promoter-driven NLS-Cre ノックインマウス (PPY-Cre) を作製した。さらにそのホモ個体にマウス PPY ペプチドを免疫することにより、抗マウス PPY モノクローナル抗体を樹立した。作製した抗体により、野生型マウスの膵島辺縁では明瞭な陽性細胞を認めるが、PPY 欠損マウスでは陽性細胞を全く認めず、非常に特異性の高い抗体であることが示された (特許第 6778365 号、引用文献 1)。(3) PPY 細胞の細胞系譜の追跡 (平成 27、28 年度若手研究 B) 申請者は、PPY-Cre; Rosa26-eYFP マウスを作製した。4~18 週齢の膵島におけるインスリン、PPY、YFP の発現を免疫組織化学的に解析した結果、加齢に伴い、PPY 細胞を由来とする細胞が膵島辺縁領域から増加した。我々は、前述した検討結果から、同様のメカニズム、すなわち Pdx1 の発現量が発生期における PPY 遺伝子発現細胞から細胞への分化成熟を制御する可能性があると考えた。本研究課題では、PPY 細胞で Pdx1 を人為的に過剰発現あるいは低下させることで、PPY 細胞から細胞への分化過程を制御することができるのか? を検証することを目的として研究を遂行することとした。

2. 研究の目的

糖尿病研究のゴールはインスリンを産生する機能的細胞を補填する方法を開発することにある。そのため細胞がどのようなメカニズムで産生され、その分化形質を維持できるかを解明することが重要である。細胞系譜解析によって生理的条件下の細胞の再生に関しては、既存の成熟した細胞の複製によるという説が 2004 年に Melton ら (引用文献 2) により提唱されて以来主流となっている。しかし、細胞を多量に失うようなストレス状況下で、膵導管に出現する Neurogenin3 (ngn3) 陽性の内分泌前駆細胞から、あるいは膵島内の非細胞等から分化転換して細胞の産生が起こることも報告されており、成体の膵島における細胞の数を維持するメカニズムが、既存の細胞の複製によるのか成体膵に存在する前駆細胞からの分化によるのか未だ結論が出ていない (右上図、従来の細胞維持モデル)。



膵管に出現する Neurogenin3 (ngn3) 陽性の内分泌前駆細胞から、あるいは膵島内の非細胞等から分化転換して細胞の産生が起こることも報告されており、成体の膵島における細胞の数を維持するメカニズムが、既存の細胞の複製によるのか成体膵に存在する前駆細胞からの分化によるのか未だ結論が出ていない (右上図、従来の細胞維持モデル)。我々はこれまで、2 型糖尿病モデルである HF+STZ を負荷したマウスでは、随時血糖値が 400mg/dL という高血糖をきたし、Pdx1 の発現量の低下と共に、細胞が減少する一方、細胞から非細胞への分化転換が起きており、その制御機構を解析してきた。その解析過程で、特に膵島辺縁領域の細胞におい

て、細胞から細胞あるいはPP細胞への分化転換が盛んに起きていることを発見した。この結果から、我々は、膵島辺縁領域の細胞には可塑性が高い細胞集団が存在するのではないかと考えた。膵島辺縁領域の細胞に関しては、2017年にVan der Meulenらによって、Virgin細胞(V細胞)と呼ばれる未成熟な細胞の存在が報告されている(引用文献3)。Virgin細胞は膵島の辺縁領域に存在し、インスリンは産生しているが、成熟した細胞に認められるUrocortin3やGlut2を発現せず、血液中のグルコース濃度感受性をまだ確立していない未熟な細胞である。細胞系譜解析によってV細胞は細胞に由来する事は明らかになったが、V細胞のみで発現する遺伝子が同定されていないためにV細胞自体の細胞系譜解析ができないことから、V細胞が成熟した細胞に分化するかどうかについては証明されていない。我々は、このV細胞と我々が発見した膵島辺縁領域の可塑性の高い細胞が非常に類似、あるいは一致しているのではないかと考えた。そこで我々は、辺縁部のV細胞特異的に遺伝子導入可能な方法を開発し、その方法を用いて本研究課題を遂行することとした。我々が開発・確立した新しい遺伝子導入法は、ファーター乳頭から膵導管経由で膵液とは逆行性に遺伝子発現ベクターを注入し、電気穿孔法によって膵島周囲から物理的に遺伝子を導入する方法である。電気パルスの電圧と回数によって導入する細胞をほぼ膵島辺縁部のV細胞が局在する領域に局限することができる。我々は、この電気穿孔法を用いて、細胞がPdx1の発現量を段階的に低下させることによって、PP細胞や細胞へと運命転換するという仮説の検証を行うこととした。

3. 研究の方法

膵島における単一細胞への電気穿孔法を用いた遺伝子導入法

増殖や発分化に関わる遺伝子の生体での機能解析は、これまでは専ら、遺伝子改変マウスに依存してきたため、既存のプロモーター依存的にしか発現させられなかった。そのため、手間とコストが掛かる上に、血糖値等の変化の影響を受けるにも関わらず、すべての細胞に遺伝子導入する以外に方法がなく、因果関係を明らかにする上で問題であった。しかし、細胞の分化形質の維持を制御する遺伝子機能を解明するためには、生理的变化による影響を受けない条件で、個々の細胞における各遺伝子の機能を解析する必要がある。遺伝子改変マウスを用いた場合、改変した遺伝子だけでなく、その遺伝子と相互関係を有する他の遺伝子による個々の細胞への糖毒性、脂肪毒性をはじめとする生理的变化を避けることは非常に難しい。今後数多くの遺伝子を対象にして、分化形質維持に関わる遺伝子の機能解析を効率よく進めるためには、生体の膵細胞において、簡便に、かつ、コントロールされたタイミングで血糖値そのものを変化させずに一部の細胞にのみ遺伝子の導入を可能にする方法が求められている。電気穿孔法による導入法は以下の通りである(特許出願準備中)。(1)麻酔薬の吸引麻酔によりホストマウスに麻酔をかけた。(2)開腹(3)肝臓方向と胆管方向から流入する総胆管の合流部位を血管鉗子で止めた。(4)ファーター乳頭からDNA注入用の針を刺した。(5)DNA注入用の針の部分に血管鉗子を止め、十二指腸へのDNAの漏れを防止した。(6)DNAを注入した。(7)電流を流した。(8)DNA注入用の針を抜き、血管鉗子を外した。腹膜、皮膚の順に縫合した。

In vivoにおける電気穿孔法を用いた細胞への遺伝子導入と遺伝子導入細胞の追跡

電気穿孔法により、Rosa26-eYFPマウスの膵臓に、rat insulinII promoter-Cre recombinase(RIP-Cre)プラスミドを遺伝子導入した。その後、膵臓を摘出し、固定後、凍結切片を作製、共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫組織化学的解析を行った。免疫組織化学的解析では、膵臓全体における遺伝子導入細胞の膵島内での分布に焦点を当てた。

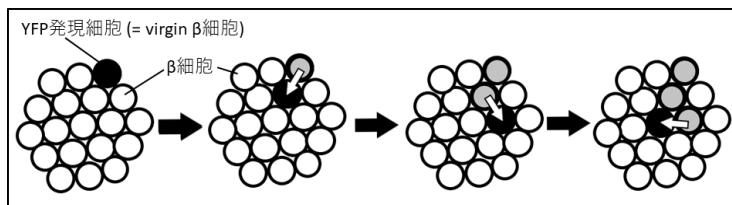
In vivoにおける電気穿孔法を用いた細胞-PP細胞、細胞の分化形質維持機構及び分化転換制御機構の解明

細胞から PPY 細胞、細胞に分化転換する際に発現が変動する遺伝子を、電気穿孔法により単一細胞レベルで遺伝子導入し、その遺伝子の分化転換への機能を解析した。検討に用いるホストとして、細胞の発生、成熟、分化に重要である Pdx1 に焦点を当て、Pdx1^{f/f}; Rosa26-eYFP, Pdx1^{f/+}; Rosa26-eYFP, Pdx1^{+/+}; Rosa26-eYFP マウスを用いた。一方、細胞特異的 Pdx1 遺伝子欠損マウスは、生後短時間で高血糖により死亡することが報告されている。具体的な解析方法を以下に示した。(1)Pdx1-flox^{f/f}, f/+、+/+の遺伝子型のマウスに、RIP-Cre プラスミドを電気穿孔法により遺伝子導入した。(2)膵臓を摘出、凍結連続切片を作製し、免疫組織化学的解析により、膵臓全体における導入した遺伝子の発現量による分化転換の割合を評価した。膵島細胞は、十二指腸側(膵頭部)と脾臓側(膵尾部)で PP 細胞と細胞の局在が異なるため、膵臓摘出時に十二指腸近傍の領域(十二指腸葉)と脾臓近傍の領域(脾葉)を別に摘出し、免疫組織化学的手法を用いて解析に供した。(3)Pdx1 の発現量の違いによる細胞から他の細胞への分化転換調節機構を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、正確に解析した。

4. 研究成果

In vivo における電気穿孔法を用いた細胞への遺伝子導入と遺伝子導入細胞の追跡

電気穿孔法により、RIP-Cre プラスミドベクターを Rosa26-eYFP マウスの膵臓に導入することにより、辺縁部の V 細胞を選択的に標識して系譜を追跡することが可能である。我々は、Rosa-eYFP マウスの膵臓に、RIP-Cre プラスミドを遺伝子導入し、YFP 発現細胞 1 個の動態を観察した。その結果、GFP 陽性である遺伝子 RIP-Cre 遺伝子導入細胞は、遺伝子導入直後には膵島辺縁部に分布していたが、時間経過に伴って膵島辺縁部の GFP 陽性細胞は減少し、膵島中央部で GFP 陽性細胞が認められるようになった。この結果から、膵島

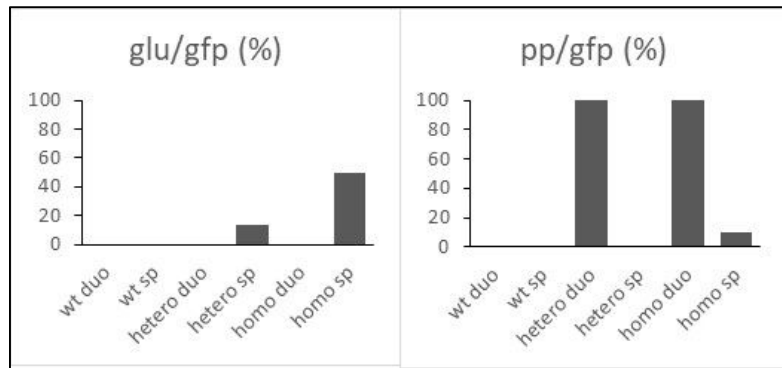


辺縁部に存在する V 細胞が、時間経過と共に膵島中央部を構成する成熟した細胞に分化することが示唆された。右上図では、電気穿孔法により、Rosa26-eYFP マウスの膵臓に、RIP-Cre プラスミドを遺伝子導入後の、YFP 発現細胞 1 個の動態を模式図に示した(右上図)。Rosa26-eYFP マウスの膵臓に、RIP-Cre プラスミドを遺伝子導入し、YFP 発現細胞 1 個の動態を観察すると、遺伝子導入された膵島辺縁部に存在する V 細胞が、時間経過と共に膵島中核部へと YFP 発現細胞が移動することを示した。この結果をもとに、膵島辺縁領域に位置する細胞の分化転換制御機構を解析し、以下の結果を得た。

In vivo における電気穿孔法を用いた細胞 - PP 細胞、細胞の分化形質維持機構及び分化転換制御機構の解明

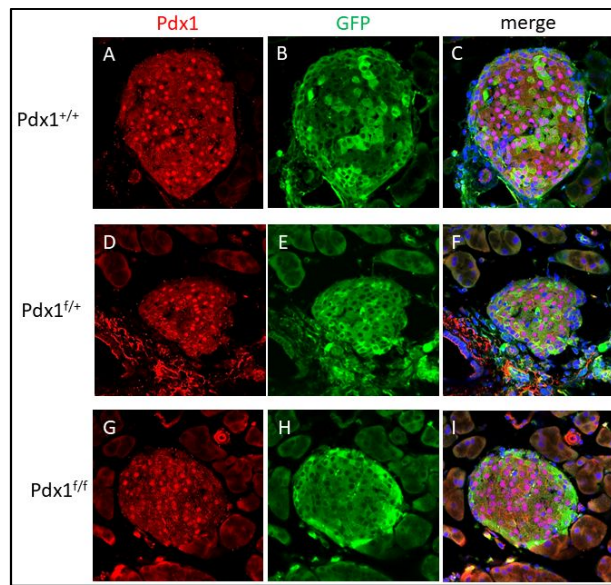
Rosa26-eYFP と Pdx1-flox の両遺伝子を保有するマウスの膵臓に、同じ Rip-Cre プラスミドを電気穿孔法で導入し、Pdx1 の発現を低下または欠失させた。電気穿孔法による遺伝子導入 2 週間後、細胞の減少と同時に細胞(膵尾部(sp)の場合)または PP 細胞(膵頭部(duo)の場合)の増加が認められた(右下図)。右下図のグラフでは、Pdx1^{+/+}(wt), f/+ (hetero), f/f (homo); Rosa26-eYFP マウスに RIP-Cre プラスミドを導入後の、GFP 陽性細胞におけるグルカゴン、PP 陽

性細胞の割合を示した。この結果、V 細胞から 細胞（膵尾部 (sp)の場合)または PP 細胞（膵頭部 (duo)の場合)への分化が示唆された。Pdx1 は糖尿病モデルマウスの膵臓でも発現が低下することが我々の研究で



も明らかになっており、高血糖 And/Or Pdx1 の発現低下が V 細胞から 細胞または PP 細胞へ分化させる可能性が示唆された。

さらに、同遺伝子型のマウスの膵臓における Pdx1 と GFP の発現分布を解析した。結果、Pdx1^{+/+}; Rosa26-eYFP マウスでは、GFP 陽性細胞は膵島中央部で認められた。一方、Pdx1^{f/+}; Rosa26-eYFP では、GFP 陽性細胞は膵島辺縁部および中央部に散在するように分布した。さらに、Pdx1^{f/f}; Rosa26-eYFP では、GFP 陽性細胞は膵島辺縁部のみで認められた。また、GFP 陽性細胞は Pdx1 陰性であった (右図)。以上の結果、膵島辺縁領域に位置する未分化 細胞の Pdx1 遺伝子濃度の低下により、未分化



細胞から 細胞あるいは PP 細胞への分化転換が誘導され、分化転換率に膵臓の領域差が存在することが明らかとなった。

本研究結果から、膵島の領域特異的な未分化 細胞から、 細胞、PP 細胞への分化転換は、Pdx1 より上流の遺伝子 (Factor X)によって制御されている可能性が示唆された。そして、Van der Meulenらの提唱する V 細胞は、単に中間段階の未熟な 細胞というだけでなく、血糖値のみならずその他の生理的な変化に応じて、成熟した 細胞を産生したり、 または PP 細胞を分化させることから、膵島内分泌細胞のホメオスタシスを司る前駆細胞としての調節機能を担っているのではないかと考えた。

引用文献

1. Takahiro Fukaiishi, Yuko Nakagawa, Ayako Fukunaka, Takashi Sato, Akemi Hara, Keiko Nakao, Michiko Saito, Kenji Kohno, Takeshi Miyatsuka, Motoyuki Tamaki, Munehide Matsuhisa, Taka-aki Matsuoka, Tetsuya Yamada, Hiroataka Watada & Yoshio Fujitani. Characterisation of Ppy-lineage cells clarifies the functional heterogeneity of pancreatic beta cells in mice. *Diabetologia* 64 (12), 2803-2816, 2021
2. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429 (6987), 41-46, 2004
3. Van der Meulen T, Mawla AM, DiGrucchio MR, Adams MW, Nies V, Dölleman S, Liu S, Ackermann AM, Cáceres E, Hunter AE, Kaestner KH, Donaldson CJ, Huising MO. Virgin Beta Cells Persist throughout Life at a Neogenic Niche within Pancreatic Islets. *Cell Metab.* 25 (4), 911-926, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukaishi T, Nakagawa Y, Fukunaka A, Sato T, Hara A, Nakao K, Saito M, Kohno K, Miyatsuka T, Tamaki M, Matsuhisa M, Matsuoka T, Yamada T, Watada H & Fujitani Y.	4. 巻 64 (12)
2. 論文標題 Characterisation of Ppy-lineage cells clarifies the functional heterogeneity of pancreatic beta cells in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dibetologia	6. 最初と最後の頁 2803-2816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00125-021-05560-x	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	藤谷 与士夫 (Fujitani Yoshio) (30433783)	群馬大学・生体調節研究所・教授 (12301)	
研究分担者	中尾 啓子 (Nakao Keiko) (70338185)	埼玉医科大学・医学部・講師 (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------