

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22642

研究課題名(和文) 高時間分解能レポーターマウスを用いた 細胞不全の経時的解析

研究課題名(英文) Chronology of beta-cell failure with a novel time-resolved reporter system in mice

研究代表者

宮塚 健 (Miyatsuka, Takeshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60622363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：肥満糖尿病マウス(db/db)の膵島で発現が亢進し、SGLT2阻害薬投与による高血糖是正後に発現レベルが低下する遺伝子SB1(sick beta 1)を同定した。8週齢のdb/dbマウス膵切片を用いて組織学的検討を行った結果、一部の細胞にのみSB1が高発現しており、SB1遺伝子発現のspatial heterogeneityが確認された。

SB1遺伝子プロモーターの制御下にCre recombinaseを発現するSB1-Creマウスを用いてSB1発現細胞のlineage tracing解析を行った。成体マウス膵島の一部がSB1細胞系譜に属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

糖尿病患者では経年的に細胞機能が低下することが古くから知られていたが、全ての細胞がhomogenouslyに不全状態に陥るのか、細胞不全の程度にheterogeneityがあるのかについては未解明であった。

本研究において糖尿病マウスにおいて発現が亢進する遺伝子SB1を同定し、heterogenousな発現プロファイルを解明したことは、細胞不全の病態を解析する際に、膵島全体ではなく、1細胞レベルで解析することの重要性を示唆している。今後糖尿病患者膵島におけるSB1遺伝子の発現プロファイルを解析することにより、ヒト膵島における細胞不全の進展過程を時空間的に捉えなおすことができるであろう。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel gene, sick beta 1 (SB1), the expression of which was upregulated in the islets of obese diabetic mice (db/db), and was suppressed after the mice were treated with SGLT2 inhibitor. Histological analysis revealed that SB1 protein was detected in subpopulations of insulin-producing beta cells, showing the spatial heterogeneity of SB1 expression in the islets.

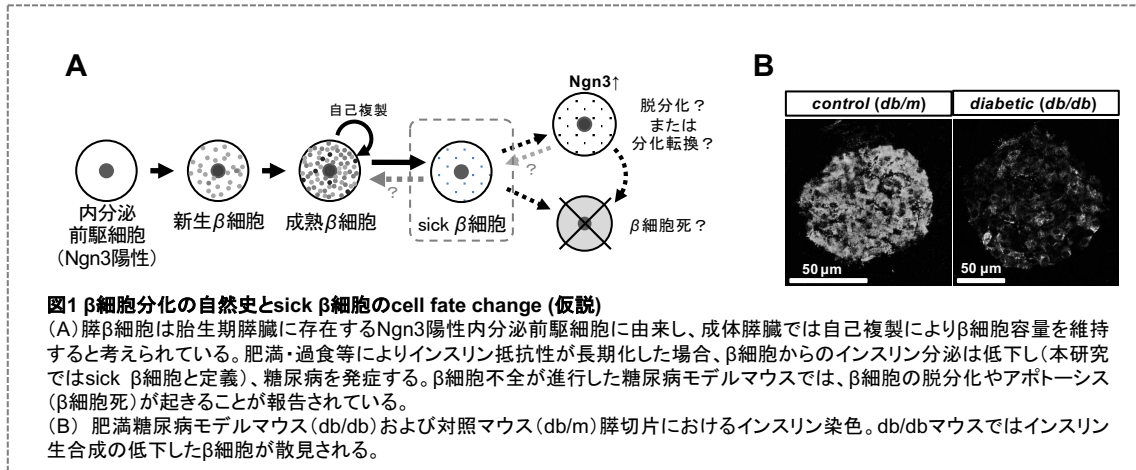
Lineage tracing analysis with SB1-Cre mice, which express Cre recombinase under the control of SB1 promoter, demonstrated that only part of beta cells were in the lineage of SB1 cells in non-obese control mice.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病 細胞 sick cells -cell heterogeneity オートファジー不全

1. 研究開始当初の背景

全ての糖尿病患者は膵β細胞からのインスリン分泌不全、即ちβ細胞不全を合併しており、その病態解明は糖尿病の新規治療標的の同定に不可欠である。糖尿病患者やモデル動物の膵島では病期の進行とともに遺伝子発現プロファイルが変化していくことが知られているが、「膵β細胞がいつ、どのような時間経過でインスリン分泌不全へと至るのか?」「全てのβ細胞が均質に病んでいくのか?」「病んだβ細胞は正常な機能を回復することはできるのか? (point of no return はどこにあるのか?)」といった根源的な疑問は未解明のままである(図1)。



2. 研究の目的

本研究ではβ細胞が不全状態に至る過程を短い time window で解析するレポーターマウスを作製し、β細胞不全の動的変化を時間軸に沿って解析する。病んだβ細胞”sick β cells”を観察するためのモデルマウスとして以下の2つの糖尿病モデルマウスを用いる。

[1] 肥満糖尿病モデルマウス (db/db マウス)

[2] β細胞特異的オートファジー不全マウス (*MIP-CreER; Atg7^{lox/lox}* マウス)

上記2つの糖尿病モデルマウスの両方あるいは一方で高発現している遺伝子群 “sick β genes” はβ細胞不全の病態に関与し、β細胞不全のマーカーとなる可能性がある。sick β genes 支配下に蛍光タンパク質を発現する sick-β-Timer マウスを作製することにより、病んだβ細胞を単離し、その遺伝子発現プロファイルを詳細に解析する。

3. 研究の方法

(1) 肥満糖尿病モデルマウスを用いた sick β genes の抽出

以下の3つのモデルマウスの単離膵島を用いる。

① 肥満糖尿病マウス (db/db マウス) → 8週齢で膵島単離

② 非肥満同胞マウス (db/m マウス) → 8週齢で膵島単離

③ 肥満糖尿病マウス (db/db マウス) → 7週齢より SGLT2 阻害薬投与 → 8週齢で膵島単離

上記膵島①と膵島②を比較し、膵島①で高発現している遺伝子のうち、膵島③でその発現が低下する遺伝子群を抽出した。抗体が利用可能な場合には db/db/マウス膵島を用いて免疫組織染色を行った。

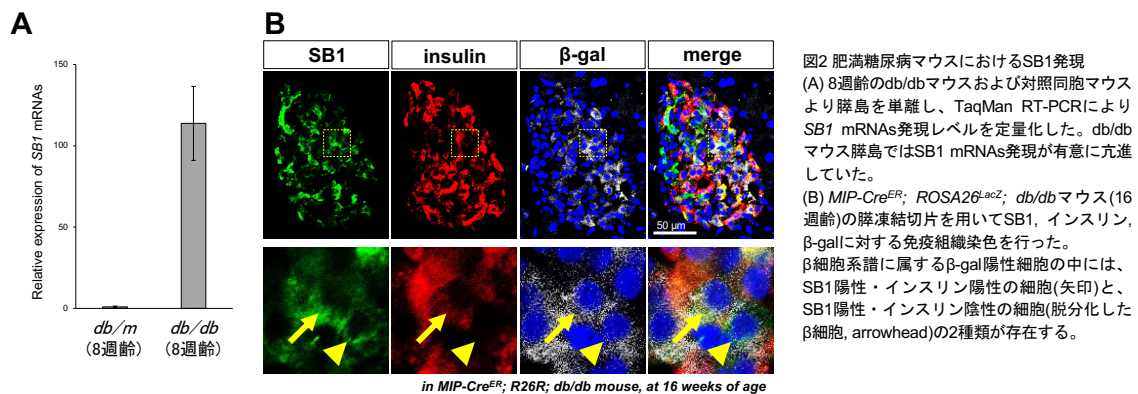
(2) β細胞特異的オートファジー不全マウスを用いた sick β genes の抽出

オートファジー機構に必須である遺伝子 *Atg7* をβ細胞特異的かつ時期誘導性に欠失させたオートファジー不全モデルマウス “*MIP-Cre^{ERTM}; Atg7^{lox/lox}* マウス” を作製し、膵島を単離した後、遺伝子発現プロファイルを RNA sequencing により解析した。*Atg7* ヘテロ欠損マウスに比較して発現が亢進している遺伝子群を抽出した。抗体が利用可能な場合には糖尿病モデルマウスの膵切片を用いて免疫組織染色を行った。

4. 研究成果

(1) 肥満糖尿病モデルマウスを用いた sick β genes の抽出

db/db マウス膵島で発現が亢進し、SGLT2 阻害薬投与により発現レベルが低下する遺伝子 SB1(sick beta 1)を同定した。8 週齢の *db/db* マウス膵切片を用いて抗 SB1 抗体を用いた免疫染色を行った結果、一部の β 細胞にのみ SB1 が高発現しており、SB1 遺伝子発現の spatial heterogeneity が確認された。*db/db* マウスにおいて β 細胞系譜を追跡するレポーターマウス *MIP-Cre^{ER}; Rosa26^{LacZ}*; *db/db* マウスを用いて免疫染色を行った結果、インスリン陽性・ β -gal 陽性細胞の一部が SB1 陽性であるのに加え、インスリン陰性・ β -gal 陽性細胞 (脱分化した β 細胞) の一部も SB1 陽性であることが明らかとなった(図 2)。



さらに SB1 遺伝子プロモーターの制御下に Cre recombinase を発現する SB1-Cre マウスと、Cre-mediated recombination 後に緑色蛍光タンパクを発現する ROSA26^{mT/mG} マウスを交配し、SB1 発現細胞の lineage tracing を行った結果、成体マウス膵島の一部が SB1 細胞系譜に属することが示された。

(2) β 細胞特異的オートファジー不全マウスを用いた sick β genes の抽出

オートファジー機構に必須である遺伝子 *Atg7* を β 細胞特異的かつ時期誘導性に欠失させたオートファジー不全モデルマウス “*MIP-Cre^{ERTM}; Atg7^{fllox/fllox}* マウス” より膵島を単離した後、RNA sequencing を行った結果、オートファジー不全により発現が誘導される遺伝子 *Sprr1a* (small proline-rich protein 1A) を同定した。*Sprr1a* は *Atg7* 欠損マウス膵島の一部の β 細胞に高発現しており、*Sprr1a* 遺伝子発現の spatial heterogeneity が確認された。さらに β 細胞株 (β HC9、 β TC3、INS-1 細胞)において *Atg7* を knockdown したところ、いずれの細胞株においても *Sprr1a* の発現が亢進していた。

db/db マウス膵島で *Sprr1a* mRNA 発現を定量化したところ、耐糖能正常である 4 週齢では遺伝子発現に変化はなかったが、 β 細胞不全およびオートファジー不全の進行した 8 週齢、12 週齢において有意な発現亢進が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮塚 健
2. 発表標題 Diabetes Cureに向けた 細胞新生誘導
3. 学会等名 第54回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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	綿田 裕孝 (Watada Hirotaka) (60343480)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (32620)	

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
---------	---------