

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08895

研究課題名(和文)新規レポーターマウスを用いた α -cell heterogeneityの解析

研究課題名(英文)Deciphering alpha-cell heterogeneity using a novel reporter mouse

研究代表者

荻原 健(Ogihara, Takeshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60399772

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):近年、グルカゴン産生細胞である膵細胞の質的・量的異常が糖代謝異常の病態を修飾することが解明されてきたが、細胞新生、成熟の分子機構の詳細は未解明である。我々は細胞分化を高時間分解能で解析するため、新生細胞のみを標識できる“Gcg-Timer”マウスを作製した。flow cytometryの結果、細胞新生が胎生期から生後数日までに生じ、1週齢以降は生じないことが明らかとなった。またRNA-sequencingの結果、新生細胞には血管新生に関する遺伝子群が高発現していた。さらに組織学的検討の結果、細胞新生は膵管・血管周囲のnicheで起こることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖代謝・アミノ酸代謝においてグルカゴンが重要な役割を担っていることが解明されているが、グルカゴン分泌の制御機構やグルカゴン産生細胞である細胞の発生・分化機構の詳細は未解明である。本研究は細胞の新生・分化過程を高時間分解能で解析する世界初の研究である。細胞新生が胎生期に特化した現象であること、そして膵管または血管近傍においてのみ起こることは、細胞新生過程とほぼ同様の知見であり、膵内分泌細胞に共通した特性である可能性がある。また本研究で開発した高時間分解能の時空間解析は他の細胞系譜にも応用可能であり、器官形成の統合的理解に役立つ。

研究成果の概要(英文):Glucagon-expressing pancreatic alpha cells have been shown to play roles in glucose metabolism, although it remains unclear precisely when and where alpha cells emerge from and what regulates alpha-cell fate. We therefore explored the spatial and transcriptional heterogeneity of alpha-cell differentiation, using a novel time-resolved mouse model, ‘Gcg-Timer’, in which newly generated alpha cells can be distinguished from more differentiated cells by their fluorescence. Fluorescence imaging and flow cytometry with Gcg-Timer mice demonstrated that green-fluorescent cells were observed in Gcg-Timer mice at the embryonic and neonatal stages, but not after 1 week of age. Transcriptome analysis of Gcg-Timer embryos revealed that the mRNAs related to angiogenesis were enriched in newborn alpha cells. Histological analysis revealed that some newborn alpha cells arise close to the pancreatic ducts, whereas the others arise away from the ducts and adjacent to the blood vessels.

研究分野：細胞再生医療

キーワード：細胞 膵発生 内分泌細胞 グルカゴン 糖尿病再生医療

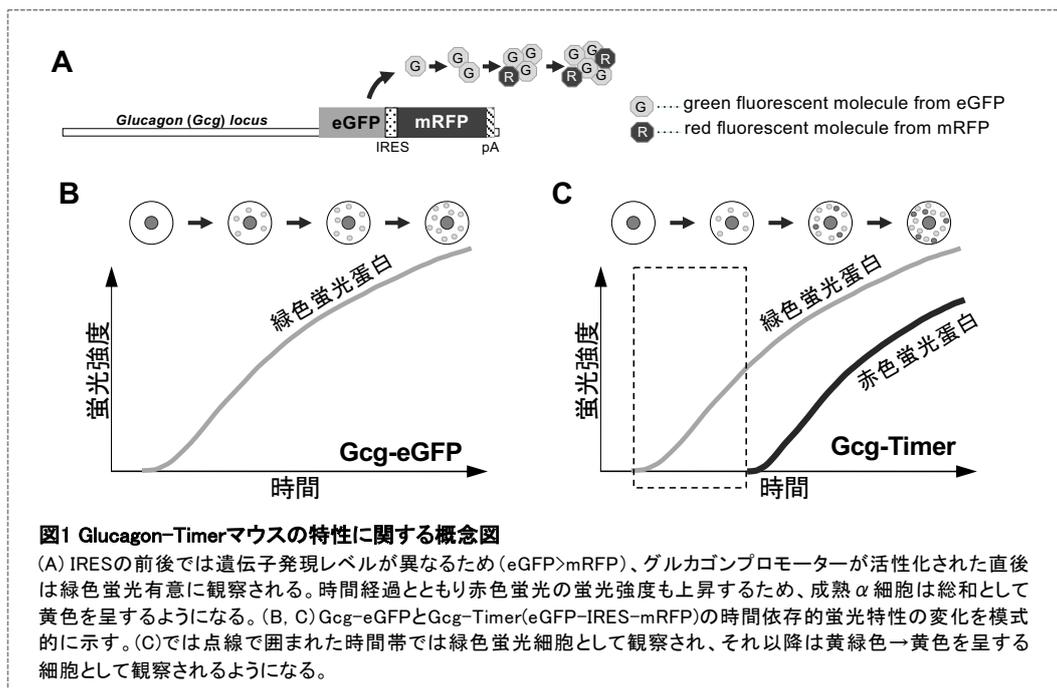
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は全世界で4億人以上が罹患し、糖尿病が原因で死亡する人の数は年間400万人を超える。その対策には糖尿病の病態解明とそれに基づく新規治療法の開発が急務である。全ての糖尿病患者はインスリン産生細胞である膵β細胞の質的・量的異常に基づくβ細胞不全を合併しているため、β細胞不全の病態解明、あるいはβ細胞再生を目指した研究が古くから行われてきた。一方、グルカゴン産生である膵α細胞の質的・量的異常も糖尿病の病態を修飾することが徐々に解明されている。しかし、膵β細胞研究に比較して、α細胞の研究は大きく後れを取っており、とくにα細胞の新生・分化・成熟過程については未解明の問題が多い。

2. 研究の目的

我々が開発した新規レポーターマウス“*Gcg-Timer*”を用いて新生α細胞(内分泌前駆細胞から分化したばかりのα細胞)と成熟α細胞を高時間分解能で識別しながら時空間解析を行う(図1)。これによりα細胞が「いつ、どこで、どのようにして生まれ、分化・成熟するのか?」を明らかにする。



3. 研究の方法

(1) 新生α細胞の spatiotemporal pattern の解析

胎生13.5日から生後3週齢の*Gcg-Timer*マウスより膵臓を摘出し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、新生α細胞=緑色蛍光優位な細胞を観察した。同様にflow cytometryを用いて緑色蛍光優位な細胞数を定量化することにより、新生α細胞数を定量化した。

さらに膵管や血管といったα細胞を囲む種々の細胞種と新生α細胞との位置関係を観察することにより、新生α細胞がどのようなniche(s)の下に生まれるのか解析した。

(2) 胎生期新生α細胞に対するトランスクリプトーム解析

胎生17.5日*Gcg-Timer*マウス膵臓を単離し、FACS (fluorescence activated cell sorting)を用いて新生α細胞、成熟α細胞、および非α細胞の3分画に分けてソーティングした後、bulk RNA sequencing解析を行った。

(3) 新生α細胞を用いた single-cell RNA sequencing

上記(2)と同様の方法で単離した新生α細胞、成熟α細胞を用いてsingle-cell RNA sequencingを行い、α細胞新生過程における遺伝子発現プロファイルの変化を1細胞レベルで網羅的に解析する。新生α細胞のt-SNEプロットを作製するとともに、pseudotime解析を行うことにより、個々の新生α細胞の特性を時間軸に沿って再分類する。

4. 研究成果

[1] 新生 α 細胞の spatiotemporal pattern の解析

共焦点レーザー顕微鏡を用いて緑色蛍光細胞 = 新生 α 細胞を定量化したところ、新生 α 細胞は胎生 12.5 日から生後 3 日にかけて観察され、生後 7 日以降は認められなかった。さらに flow cytometry を施行し、新生 α 細胞を定量化したところ、 α 細胞新生率 (膵細胞数全体に占める新生 α 細胞数の割合) は胎生 18.5 日から生後 0.5 日にかけて最大となることが明らかとなった。

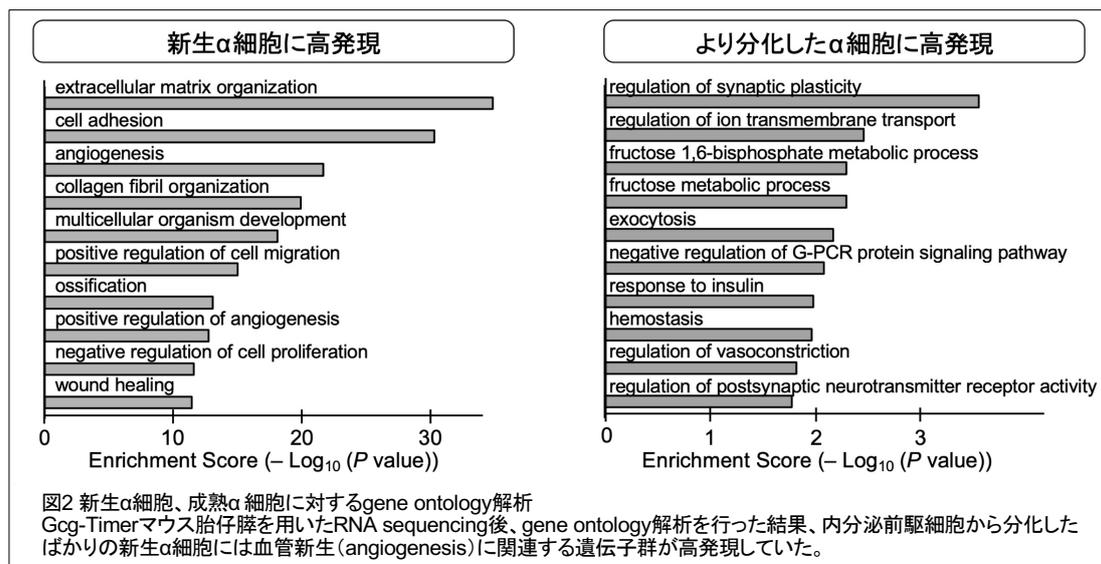
共焦点レーザー顕微鏡を用いて新生 α 細胞を観察したところ、膵管に近接する新生 α 細胞 (α^{duct} 細胞) と血管に近接する新生 α 細胞 (α^{vessel} 細胞) の 2 つに大別され、それ以外の空間には観察されなかった。

[2] 胎生期新生 α 細胞に対するトランスクリプトーム解析

胎生 17.5 日 *Gcg-Timer* マウス膵臓より新生 α 細胞、成熟 α 細胞、および非 α 細胞の 3 分画を単離し、bulk RNA sequencing および gene ontology 解析を行った結果、新生 α 細胞には血管新生に関する遺伝子群が高発現していた (図 2)。

[3] 新生 α 細胞を用いた single-cell RNA sequencing

胎生 17.5 日 *Gcg-Timer* マウスより新生 α 細胞、成熟 α 細胞を単離し、Chromium システム (10X Genomics 社) を用いて 1 細胞ごとの cDNA ライブラリを作製し、塩基配列を決定した。一部の新生 α 細胞では *Gcg* mRNA のみならず *Ins1*, *Ins2*, *Sst* mRNA が高発現しており、bulk RNA-seq と一致する結果であった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 氷室 美和, 宮塚 健, 若林侑香, 荻原 健, 西田友哉, 大島 茂, 岡本隆一, 綿田裕孝
2. 発表標題 新規レポーターマウスを用いた膵 細胞新生機構の解明
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 氷室 美和, 宮塚 健, 若林侑香, 荻原 健, 西田友哉, 大島 茂, 岡本隆一, 綿田裕孝
2. 発表標題 新規レポーターマウスを用いた 細胞新生・分化機構の解明
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021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	宮塚 健 (Miyatsuka Takeshi) (60622363)	順天堂大学・大学院医学研究科・客員教授 (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
---------	---------