

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17531

研究課題名(和文) シングルセルATAC-seqと膵切除モデルを用いた増殖膵細胞のエピゲノム解析

研究課題名(英文) Single-Cell Transcriptome Analysis of the Replicating Process of Pancreatic Beta Cells

研究代表者

龍岡 久登 (Tatsuoka, Hisato)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：70850981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：若齢及び高齢のC57BL/6マウスを用いて、膵細胞増殖を誘導する膵部分切除(PPTx)を行った。術後2日で膵島を単離し、膵島全体のRNAシーケンス(RNA-seq)およびシングルセルRNA-seq(scRNA-seq)を行い解析した。PPTxにより若齢マウスでは693の発現上昇遺伝子および573の発現低下遺伝子を認め、一方で、高齢マウスでは52の発現上昇遺伝子と31の発現低下遺伝子を認め、PPTxにより若齢マウスで膵細胞増殖が活発化することが示唆された。scRNA-seqでは、遺伝子発現パターンからクラスタリングを行ったところ、増殖前段階にて小胞体ストレス関連遺伝子の発現上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病状態ではインスリンを産生する膵細胞の量が少なくなることから、その再生を誘導する治療法の確立が期待されている。一方で、細胞以外にも複数の内分泌細胞がある膵臓では、細胞だけに注目して解析することが困難であった。本研究では、細胞の増殖が促されるモデルマウスの膵臓について、一細胞レベルで遺伝子発現を観察するシングルセルRNAシーケンスを行い、細胞の増殖過程の詳細を解析した。遺伝子発現プロファイルから細胞状態の遷移を解析する擬似時系列解析によって、増殖停止期から増殖期への遷移に関する遺伝子群を捉え、膵細胞が増殖するプロセスを一細胞レベルで解析することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Heterogeneity of gene expression and rarity of replication hamper molecular analysis of β -cell mass restoration in adult pancreas. Here, we show transcriptional dynamics in β -cell replication process by single-cell RNA sequencing of murine pancreas with or without partial pancreatectomy. We observed heterogeneity of Ins1-expressing β -cells and identified the one cluster as replicating β -cells with high expression of cell proliferation markers PcnA and Mki67. We also recapitulated cell cycle transition accompanied with switching expression of cyclins and E2F transcription factors. Both transient activation of endoplasmic reticulum stress responders and elevated expression of tumor suppressors and DNA damage responders during the transition to replication associated fine balance of cell cycle progression and protection from DNA damage. Taken together, these results provide a high-resolution map depicting a sophisticated genetic circuit for replication of the β -cells.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵細胞 増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は種々の合併症を引き起こす進行性の疾患であり、その病態において内因性インスリン分泌の相対的ないし絶対的欠乏が重要と考えられている。内因性インスリン分泌は、膵細胞からのインスリン分泌と膵細胞量により規定され、2 型糖尿病においてはその両者の低下が報告されている。膵細胞からのインスリン分泌低下を標的とした薬剤は複数が実臨床で用いられている一方、膵細胞の量を標的とした治療はいまだ存在しない。膵細胞量を増加させることが、新規治療戦略の一つに考えられるが、膵細胞は生後間もなく増殖のピークを迎えその後徐々に低下してゆき、成人ではその増殖率は極めて低い。膵細胞増殖の分子基盤については不明な点が多く、その解明を困難にしているのは、膵島組織内に細胞以外の種々の細胞(細胞、細胞、PP 細胞など)が存在すること、増殖細胞自体が膵島内に希少であること、そもそも細胞集団内に不均質性が存在すること、などである。

2. 研究の目的

糖尿病における膵細胞量の減少を標的とした治療は未だ存在せず、膵細胞の増殖制御や加齢との関係についても不明な点が多い。膵細胞は不均一性を有しており、増殖能を有する膵細胞の詳細な解析のためには、膵細胞集団を一細胞レベルで解析する必要がある。申請者は、若齢および加齢したマウスの部分膵切除(PPTx)モデルを用いて、膵細胞の組織学的検討および単細胞レベルでの遺伝子発現変化を解析する。さらに、本研究では単細胞での遺伝子解析、オープンクロマチン解析、そしてパイオインフォマティクス手法を用いて、膵細胞の不均質性、膵細胞増殖の制御機構、加齢と膵細胞増殖の関係、について明らかにすることを目的とする。

膵細胞の増殖過程における様々な遺伝子の役割を解明しようとする本研究は基礎的な研究であるが、その最終的な目標は、すでに膵細胞量の減少した 2 型糖尿病患者を対象として膵細胞量を回復させるような治療法の開発や、家族歴などから 2 型糖尿病発症リスクが元来高いと予測されるような若年者において、発症前に膵細胞量を保持するような介入を行うことで糖尿病発症予防を目指すものである。

3. 研究の方法

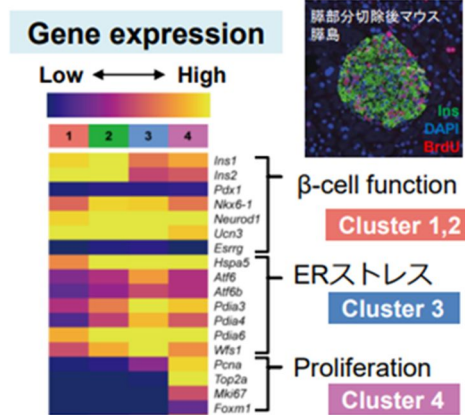
増殖能を有する膵細胞の単細胞レベルでの発現遺伝子の変化を探索するため、PPTx を行った若齢(8 週齢)のマウスと行っていない同週齢のマウスから膵島を単離し、単細胞にまで分解した後に、シングルセル RNA シークエンシング(scRNA-seq)を施行し、網羅的解析を行う。同様に、高齢(52 週齢)マウスを用いて、若齢マウスと同様に PPTx によって変化する細胞の遺伝子発現を、単細胞レベルで scRNA-Seq を行い網羅的に解析し、若齢マウスと比較する。また、増殖膵細胞において発現が増加している遺伝子群を同定し、膵細胞増殖制御機構における役割を明らかにする。

4. 研究成果

若齢及び高齢の C57BL/6 マウスを用いて、膵細胞増殖を誘導する膵部分切除(PPTx)を行った。術後 2 日で膵島を単離し、膵島全体の RNA シークエンシング(RNA-seq)および、膵島単離後に単細胞化した後に RNA 抽出を行う scRNA-seq を行い解析した。RNA-seq の結果では、PPTx により若齢マウスでは 693 の発現上昇遺伝子および 573 の発現低下遺伝子を認め一方で、高齢マウスでは 52 の発現上昇遺伝子と 31 の発現低下遺伝子を認めた。これらの発現変動遺伝子を Gene Ontology 解析にて生物学的機能で分類すると、若齢マウスでは細胞周期や有糸分裂等に関連した遺伝子群の発現が亢進していたのに対し、高齢マウス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。この結果から、PPTx により若齢マウスで膵細胞増殖が活発になっていることが示唆された。

scRNA-seq では、1623 細胞の遺伝子プロファイルを検出し、遺伝子発現パターンからクラスタリングを行ったところ、6 つの細胞亜集団(クラスター)が観察され、各クラスターごとの遺伝子発現プロファイルを詳細に解析したところ、擬似時系列解析にて、増殖前段階における小胞体ストレスに関連する遺伝子の発現上昇を認めた。

図1: 膵β細胞単一RNAシーケンス解析



上記同定遺伝子に関して、PPTx 後の膵島を用い、q-PCR にて各術後期間での mRNA 発現量の変化を確認した。実際には、若年マウスに対する PPTx 術前、術後 2 日、4 日、7 日目のタイミングで膵島単離し、qPCR にて、各関連遺伝子 mRNA の発現を評価した。その結果、PPTx 後早期に小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現が上昇し、その後、増殖マーカーの発現が上昇することを確認できた。これにより、膵細胞増殖制御には、小胞体ストレス応答または関連遺伝子の活性化が関与している可能性が示唆された。これにより、膵細胞増殖に小胞体ストレス関連遺伝子の発現が関与している可能性が示唆された。現在、これらの遺伝子が膵細胞増殖制御に果たす役割について、検討を行っている。



本研究で特定された増殖前段階の膵細胞で一過性に発現上昇する遺伝子に対し、個々の膵細胞増殖制御における役割を解明する。膵細胞の増殖過程における様々な遺伝子の役割を解明しようとする本研究は基礎的な研究であるが、その最終的な目標は、すでに膵細胞量の減少した 2 型糖尿病患者を対象として膵細胞量を回復させるような治療法の開発や、家族歴などから 2 型糖尿病発症リスクが元来高いと予測されるような若年者において、発症前に膵細胞量を保持するような介入を行うことで糖尿病発症予防を目指すものである。

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 Tatsuoka Hisato, Sakamoto Satoko, Yabe Daisuke, Kabai Ryotaro, Kato Unyane, Okumura Tatsuya, Botagarova Ainur, Tokumoto Shinsuke, Usui Ryota, Ogura Masahito, Nagashima Kazuaki, Mukai Eri, Fujitani Yoshio, Watanabe Akira, Inagaki Nobuya	4. 巻 23
2. 論文標題 Single-Cell Transcriptome Analysis Dissects the Replicating Process of Pancreatic Beta Cells in Partial Pancreatectomy Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101774 - 101774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101774	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
---------------------------	-----------------------	----

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