

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21616

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 細胞増殖制御機序の解明

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

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）：糖尿病は進行性の膵 細胞の機能不全および膵 細胞量の低下を病因としているが、膵 細胞量を標的にした治療法は確立されていない。そこで、本研究では膵 細胞増殖の分子基盤解明に着目し、膵 細胞増殖制御に関わる遺伝子ネットワークを同定することを目的とした。膵 細胞増殖を促す膵部分切除（PPTx）を行った単離膵島でのシングルセルRNAシーケンスでは、擬似時系列解析により、成熟膵 細胞における増殖停止期から増殖期への遷移時に、小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現が増強していた。これにより、PPTxによる膵 細胞増殖にはERストレスが関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は進行性の膵 細胞の機能不全および膵 細胞量の低下を病因としている。膵 細胞機能不全についてはこれまで多種の治療薬が開発されている一方で、膵 細胞量を標的にした治療法は確立されていない。本研究により、膵 細胞増殖にはERストレスが関与している可能性が示唆されたことで、今後、膵 細胞増殖制御の分子機構解明、さらには、増殖促進を介した膵 細胞量を標的にした治療法の開発が進むものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Heterogeneity of gene expression and rarity of replication hamper molecular analysis of  $\beta$ -cell mass restoration in adult pancreas. Here, we show transcriptional dynamics in  $\beta$ -cell replication process by single-cell RNA sequencing of murine pancreas with or without partial pancreatectomy. We observed heterogeneity of Ins1-expressing  $\beta$ -cells and identified the one cluster as replicating  $\beta$ -cells with high expression of cell proliferation markers. Both transient activation of endoplasmic reticulum stress responders like Atf6 and Hspa5 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  $\beta$ -cells.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵 細胞 増殖

## 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。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。成体における膵細胞増殖制御の分子基盤、特に加齢により膵細胞が増殖能を失うメカニズムは不明である。若齢マウスと高齢マウスの膵島全体の遺伝子発現について比較解析も報告されているが、成体でのそもそも増殖する膵細胞数が極めて少ないこともあり、有意な結果は得られていない。さらに、膵細胞の中でも潜在的に増殖能を有する細胞と増殖能を有しない細胞の存在が示唆されており、このような膵細胞自体の不均質性が、加齢により増殖能を失うメカニズムの解明を困難にしている。また、増殖細胞自体が膵島内に希少であることに加え、細胞以外にも複数の内分泌細胞(細胞、細胞、PP細胞など)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。

## 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。膵細胞増殖を制御する分子機構を、増殖刺激、加齢の観点を含め明らかにする。

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。同定した鍵分子の発現量を膵細胞特異的に調整可能なマウスの作製・解析を行い、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。

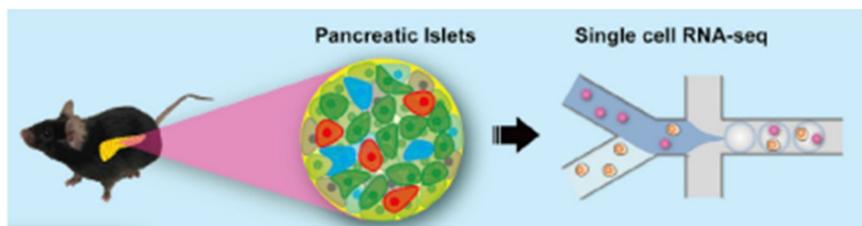
膵細胞の増殖過程における様々な遺伝子の役割を解明しようとする本研究は基礎的な研究であるが、その最終的な目標は、すでに膵細胞量の減少した2型糖尿病患者を対象として膵細胞量を回復させるような治療法の開発や、家族歴などから2型糖尿病発症リスクが元来高いと予測されるような若年者において、発症前に膵細胞量を保持するような介入を行うことで糖尿病発症予防を目指すものである。

## 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(下図)。



1) PPTx 刺激に対する膵島内遺伝子発現変化：化若齢・高齢マウスでの比較

膵島全体に対する 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た一方で、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。

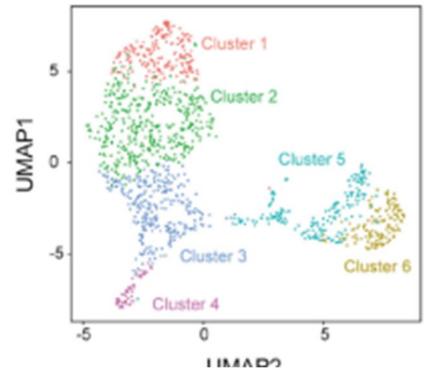
この結果から、PPTx により若齢マウスで膵細胞増殖が活発になっていることが示唆された。

2) PPTx 刺激によって増殖する単一膵島内の遺伝子発現変化：scRNA-seq に基づく擬似時系列解析

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）が観察された（右図：Cluster1-6）。

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（右下図）。

また、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。結果、小胞体ストレス応答関連遺伝子の術後一過性の発現増強を認めた。

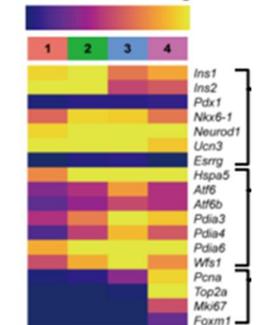


遺伝子発現プロファイルから細胞状態の遷移を解析する擬似時系列解析によって、増殖停止期から増殖期への遷移に関する遺伝子群を捉え、膵細胞が増殖するプロセスを一細胞レベルで解析することに成功した。これにより、膵細胞増殖に小胞体ストレス関連遺伝子の発現が関与している可能性が示唆された（下図）。



Gene expression

Low ← → High



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9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tokumoto S, Yabe D, Tatsuoka H, Usui R, Fauzi M, Botagarova A, Goto H, Herrera PL, Ogura M, Inagaki N.	4. 巻 69
2. 論文標題 Generation and Characterization of a Novel Mouse Model that Allows Spatiotemporal Quantification of Pancreatic $\beta$ -Cell Proliferation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes.	6. 最初と最後の頁 2340-2351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db20-0290.	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 該当する
1. 著者名 Tatsuoka H, Sakamoto S, Yabe D, Kabai R, Kato U, Okumura T, Botagarova A, Tokumoto S, Usui R, Ogura M, Nagashima K, Mukai E, Fujtani Y, Watanabe A, Inagaki N	4. 巻 23
2. 論文標題 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
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 -
1. 著者名 Kanemaru Y, Harada N, Shimazu-Kuwahara S, Yamane S, Ikeguchi E, Murata Y, Kiyobayashi S, Hatoko T, Inagaki N.	4. 巻 245
2. 論文標題 Absence of GIP secretion alleviates age-related obesity and insulin resistance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 13-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JOE-19-0477.	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 -
1. 著者名 Mikawa T, Shibata E, Shimada M, Ito K, Ito T, Kanda H, Takubo K, Lleonart ME, Inagaki N, Yokode M, Kondoh H.	4. 巻 23
2. 論文標題 Phosphoglycerate Mutase Cooperates with Chk1 Kinase to Regulate Glycolysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience.	6. 最初と最後の頁 101306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101306.	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 -

1. 著者名 Gobron B, Bouvard B, Vyavahare S, Blom LV, Pedersen KK, Windelov JA, Boer GA, Harada N, Zhang S, Shimazu-Kuwahara S, Wice B, Inagaki N, Legrand E, Flatt PR, Chappard D, Hartmann B, Holst JJ, Rosenkilde MM, Irwin N, Mabileau G.	4. 巻 35
2. 論文標題 Enteroendocrine K Cells Exert Complementary Effects to Control Bone Quality and Mass in Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Bone Miner Res.	6. 最初と最後の頁 1363-1374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.4004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamauchi Y, Kodama Y, Shiokawa M, Kakiuchi N, Marui S, Kuwada T, Sogabe Y, Tomono T, Mima A, Morita T, Matsumori T, Ueda T, Tsuda M, Nishikawa Y, Kuriyama K, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Uza N, Masuda A, Tatsuoka H, Yabe D, Minamiguchi S, Masui T, Inagaki N, Uemoto S, Chiba T, Seno H.	4. 巻 80
2. 論文標題 Rb and p53 Execute Distinct Roles in the Development of Pancreatic Neuroendocrine Tumors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 3620-3630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-2232.	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 -

1. 著者名 Murakami T, Fujimoto H, Fujita N, Hamamatsu K, Yabe D, Inagaki N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of glucagon-like peptide-1 receptor-targeted imaging probe with in vivo glucagon-like peptide-1 receptor agonist glucose-lowering effects.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 1448-1456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13281.	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 -

1. 著者名 Kato T, Harada N, Ikeguchi-Ogura E, Sankoda A, Hatoko T, Lu X, Yasuda T, Yamane S, Inagaki N.	4. 巻 66
2. 論文標題 Gene expression of nutrient-sensing molecules in I cells of CCK reporter male mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Mol Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 11-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JME-20-0134.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Y, Hirota K, Yamauchi I, Hakata T, Yamashita T, Fujii T, Yasoda A, Inagaki N.	4. 巻 15
2. 論文標題 Is C-type natriuretic peptide regulated by a feedback loop? A study on systemic and local autoregulatory effect.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0240023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0240023.	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13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Minamino H, Fujita Y, Goto H, Ohashi A, Furuya F, Isomura N, Takesue K, Li Y, Kawarasaki S, Kawada T, Hasegawa H, Inagaki N.
2. 発表標題 Maternal Supplementation of Tetrahydrobiopterin Regulates Differentiation of Fetal Brown Adipose Tissue and Contributes to Offspring Metabolic Health
3. 学会等名 American Diabetes Association (ADA) 80th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Tanaka, Saki Okamoto, Yanyan Liu, Katsumi Iizuka, Yoshiyuki Hamamoto, Yukio Horikawa, Daisuke Yabe and Nobuya Inagaki
2. 発表標題 Exome Sequencing in a Family with Multiple Cases of Early-Onset Diabetes Reveals a Candidate Causative Mutation in the PTF1A Gene.
3. 学会等名 American Diabetes Association (ADA) 80th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Tanaka, Saki Okamoto, Yanyan Liu, Katsumi Iizuka, Yoshiyuki Hamamoto, Yukio Horikawa, Daisuke Yabe and Nobuya Inagaki
2. 発表標題 Whole-exome sequencing in a family with multiple cases of early-onset diabetes reveals a candidate causative mutation in the PTF1A gene.
3. 学会等名 The 56th European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南野 寛人、藤田 義人、小栗 靖生、大橋 晶子、後藤 剛、川原崎 聡子、古谷 太志、磯村 望、武居 晃平、李 瀛、河田 照雄、長谷川宏幸、稲垣 暢也
2. 発表標題 テトラヒドロピオプテリンは胎児期の褐色脂肪組織の分化を制御し、出生後の糖及びエネルギー代謝に関与する。
3. 学会等名 第23回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南野 寛人、藤田 義人、小栗 靖生、大橋 晶子、後藤 剛、川原崎 聡子、古谷 太志、磯村 望、武居 晃平、李 瀛、河田 照雄、長谷川宏幸、稲垣 暢也
2. 発表標題 テトラヒドロピオプテリンは胎児期より褐色脂肪組織の分化を制御し、出生後の糖・エネルギー代謝に関与する。
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 大祐、稲垣 暢也
2. 発表標題 若年発症非肥満糖尿病患者における、網羅的次世代シーケンスを用いた発症原因遺伝子変異の検討
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南野 寛人、藤田 義人、小栗 靖生、大橋 晶子、後藤 剛、川原崎 聡子、古谷 太志、磯村 望、武居 晃平、李 瀛、河田 照雄、長谷川 宏幸、稲垣 暢也。
2. 発表標題 テトラヒドロピオプテリンは胎児期より褐色脂肪組織の分化に関与し、出生後の糖・エネルギー代謝に持続的な影響を与える
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南野 寛人、藤田 義人、小栗 靖生、大橋 晶子、後藤 剛、川原崎 聡子、古谷 太志、磯村 望、武居 晃平、李 瀛、長谷川 宏幸、河田 照雄、稲垣 暢也.
2. 発表標題 テトラヒドロピオプテリンは胎仔期の褐色脂肪組織の分化を制御し、出生後の糖及びエネルギー代謝に関与する
3. 学会等名 第59回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内 一郎、坂根 依利子、伯田 琢郎、山下 貴史、植田 洋平、藤井 寿人、八十田 明宏、稲田 暢也
2. 発表標題 化合物スクリーニングを用いた甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の新規調節因子の探索
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内 一郎、伯田 琢郎、山下 貴史、植田 洋平、藤井 寿人、八十田 明宏、稲垣 暢也
2. 発表標題 TSH受容体とIGF1受容体のcAMP産生における相互作用 機能獲得型変異を用いた検討
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内 一郎、山下 貴史、伯田 琢郎、植田 洋平、藤井 寿人、稲垣 暢也
2. 発表標題 甲状腺ホルモン不応症におけるベザフィブラートによる甲状腺機能低下症 マウスモデルの作成と解析
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植田洋平、八十田明宏、伯田琢郎、山内一郎、藤井寿人、稲垣暢也
2. 発表標題 グルココルチコイド誘発性成長障害モデルマウスに対するC型ナトリウム利尿ペプチドの骨伸長障害改善効果の検討
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内 一郎、伯田 琢郎、植田 洋平、藤井 寿人、稲垣 暢也
2. 発表標題 TSH過剰発現マウスの作成と甲状腺機能に関する検討
3. 学会等名 第63回日本甲状腺学会学術集会
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	臼井 亮太 (Usui riot) (40850996)	京都大学・医学研究科・特定助教  (14301)	
研究分担者	龍岡 久登 (Tatsuoka Hisato) (70850981)	京都大学・医学研究科・特定助教  (14301)	

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