

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20902

研究課題名（和文）膵 細胞分化・成熟過程における細胞内エネルギー代謝様式変化の解明

研究課題名（英文）Elucidation of changes in intracellular energy metabolism during pancreatic beta-cell differentiation and maturation

研究代表者

佐々木 周伍（Sasaki, Shugo）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：60908185

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：糖尿病に対する再生医療が注目されている。本研究では、膵 細胞の分化・成熟過程における細胞内代謝変化を脂質代謝に着目して解明し、その介入によってヒトiPS細胞由来 細胞分化誘導の効率化を目指した。胎生後期マウス 細胞のscRNA-seq解析により、細胞分化早期においては解糖系酵素遺伝子の発現は大きく変化しないが、脂肪合成（DNL）系酵素遺伝子の発現量は増加していた。ヒトiPS細胞由来 細胞においても分化に伴い、同様にDNL関連遺伝子の発現増加、細胞脂肪滴増加を認めた。さらにPPAR 作用の阻害によりインスリン遺伝子およびDNL関連遺伝子の発現上昇を認め、細胞分化誘導促進が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病の根治を目指した代替 細胞による細胞治療のためには、ES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞から細胞や膵島を効率よく分化誘導させる必要がある。現状、最新の方法を用いても約半数の細胞しか 細胞に分化せず、インスリン分泌能も本来の 細胞と比べ未熟である。この解決には 細胞発生・分化の詳細な解析が必要である。本研究では、細胞分化・成熟における脂質代謝・合成の重要性を高解像度のシングルセル解析およびヒトiPS細胞モデルを用いて調べる限り初めて明らかにした。さらにPPAR を介した脂質代謝経路の修飾によりiPS細胞由来 細胞分化誘導効率の改善が示唆され、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Regenerative medicine for diabetes has been attracting attention. In this study, we aimed to elucidate intracellular metabolic changes during differentiation and maturation of pancreatic β cells with a focus on lipid metabolism, and to improve the efficiency of human iPS cell-derived β -cell differentiation through modification of lipid metabolism. scRNA-seq analysis of late embryonic mouse β cells revealed that the expression pattern of glycolytic enzyme genes did not change significantly in the early stage of β cell differentiation, while the expression levels of de novo lipogenesis (DNL)-related enzyme genes were increased. Similarly, in human iPS cell-derived β -like cells, increased the expression levels of DNL-related genes and cellular lipid droplets were increased during differentiation. Furthermore, inhibition of PPAR α action increased the expressions of the insulin gene and DNL-related genes, suggesting promoted induction of β -cell differentiation.

研究分野：糖尿病再生医療

キーワード：膵 細胞 iPS細胞 脂肪酸代謝 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病ではインスリン産生膵細胞の質的および量的な低下が認められる。そこで糖尿病根治を実現する治療法の1つとして細胞以外の細胞から細胞への分化を誘導する「細胞再生医療」が注目されている。海外では、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)やヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)からインスリン産生細胞への分化を誘導し、この細胞を1型糖尿病患者に移植する方法が開発され、臨床試験も行われている。しかし、食後高血糖に应答して十分量のインスリンを分泌する機能面の観点から、我々の身体に内在する細胞とでは似て非なるものと言わざるを得ない。また、インスリン産生細胞への分化誘導過程において未分化細胞や非膵臓系細胞が混在し、これらの細胞が腫瘍化する可能性を伴うという安全面の問題も残る。このように、真に機能的なインスリン産生細胞を誘導するためには代替細胞と内在する細胞とのギャップを深く理解することが不可欠である。

近年、シングルセルRNAシーケンシング(scRNA-seq)解析が開発され、細胞の個性を1細胞レベルで解析できるようになった。最近、われわれはscRNA-seqを用いて胎生後期マウスにおける新生細胞の遺伝子発現プロファイルを1細胞レベルで解析するとともに、高時間分解能で新生細胞の位置情報を解析した。その結果、新生細胞が意外にも脂肪酸代謝関連遺伝子を高発現していることを見出した(図1A-C, Sasaki S, et al. Diabetologia 2022)。脂質の成体膵細胞に対する毒性はよく知られているが、一方で細胞分化・成熟過程における脂質代謝の重要性は不明である。

これまでに、例えば心臓では胎生期から成熟するにつれて心筋細胞の主要な栄養素がブドウ糖から脂質に移行することが知られており(Malandraki-Miller S, et al. Front Cardiovasc Med 2018)その知見をiPS細胞から心筋細胞への分化誘導に応用することで、より成熟した心筋細胞を得ることに成功している(Yang X, et al. Stem Cell Reports 2019)。翻って膵細胞においては、インスリン分泌のトリガーとしての栄養素に関する研究が多く、細胞自身の栄養が発生段階でどう変化するかはほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、まず膵細胞の分化・成熟に伴う細胞内エネルギー代謝の変化を、特に脂肪酸に着目し、シングルセル・トランスクリプトーム解析およびメタボローム解析を駆使して解明し、基盤的知見を得ることを目的とした。さらに、その知見を利用して明らかとなった代謝変化に介入することにより、iPS細胞を用いてヒト膵細胞分化誘導法の効率化を目指した。

3. 研究の方法

(1) 胎生期マウス膵細胞のシングルセル解析

Ins1-GFP;Timer ダブルトランスジェニックマウスは、Ins1-GFP マウスと Ins1-Timer マウスを交配することで得た。Ins1-GFP;Timer 胚を E16.5 で採取し、トリプシン処理にて細胞単離を行った。セルソーター-Beckman Coulter MoFlo Astrios を用いて緑色蛍光画分と緑色/赤色二重蛍光画分に直ちに選別した。scRNA-seq 用の cDNA ライブラリーは Single Cell 3' Reagent Kits v2 を用いて 10x Genomics Chromium のパイプラインに従って作製した。同ライブラリーを Illumina NextSeq500 プラットフォームで 150 サイクル High Output v2 キットを用いてシーケンシングを行った。シーケンシング後、一般に公開されているソフトウェアプログラムと R 4.0 のパイプラインを使用してデータを解析した。まず cellranger mkfastq (10x Genomics)で FASTQ ファイルを生成し、次に cellranger count で参照ゲノム(マウス: GRCh38)へのアライメントを行い、single cell gene count を得た。さらに Scater V1.16 によってデータの品質管理を行った。データ解析には、Seurat V2.0 and V3.0 pipeline を用いた。Seurat を使用しモジュラリティ最適化に基づくクラスタリングを施行し、遺伝子発現パターンを反映させた細胞のグループ化を行った。同結果は次元削減し tSNE によって可視化した。Pseudotime 解析は Monocle v2.6.1 を使用した。クラスター間の遺伝子発現解析を行い、DDRTree を用いてツリー状の軌跡(trajecory)を学習させたのち、各細胞の擬時間(pseudotime)による順序を決定した。Monocle で提供されている分岐表現解析モデリングを実施し、擬似時間での遺伝子発現パターンを決定した。

(2) ヒト iPS 細胞の維持および分化

ヒト iPS 細胞株(1383D6, 1231A3)は理研バイオリソース研究センターより供与された。ヒト iPS 細胞は iMatrix-511(ニッピ)でコートしたプレート上で StemFit(リプロセル)を用いて維持した。細胞は3、4日ごとに継代し、継代の日には 10 μM Y-27632 を添加し、細胞の生存率を維持した。iPS 細胞は、Nairら(Nair GG, et al. Nat Biotechnol 2019)によって公開されたプロトコルを使用して3次元培養法で分化誘導した。1細胞単位へ剥離、単離した iPS 細胞を1ウェルあたり 5.5 mL 培地中に 550 万細胞の密度で 6 ウェルプレートに播種した。このプレートを 37 °C、5% CO₂、100rpm のオービタルシェイカーでインキュベートし、スフェロイド形成

を誘導した。24 時間後、6 段階の分化誘導を開始した。スフェロイドからの RNA 抽出には Trizol を使用し、cDNA 作製には Verso cDNA 作製キットを用いた。qPCR は IDT Prime Time のプレデザイン qPCR アッセイを用いて行った。スフェロイドの脂肪的染色には Lipi-Blue (同仁化学) を用いてプロトコールに従い施行した。PPAR アンタゴニスト GW6471 (Selleck) は通常の細胞分化誘導プロトコールに、分化 15 - 22 日目に加えて培養した。

4. 研究成果

(1) 膵 細胞の分化・成熟過程における脂質代謝変化の解明

以前われわれはマウスの胎生後期 (16.5 日) 細胞のシングルセル・トランスクリプトーム解析によって、分化早期 細胞が脂肪酸代謝関連遺伝子 (*Abcd3*, *Crot*, *Hadh*, *Acly*, *Mlxipl*) を高発現している時期があることを初めて見出した (図 1A-C)。これにより 細胞分化に脂質代謝が重要であることが示唆された。

分化早期 細胞で高発現していた *Mlxipl* は ChREBP (Carbohydrate Responsive Element-Binding Protein) をコードする遺伝子である。ChREBP は、解糖系・脂質生合成 (de novo lipogenesis) 系酵素遺伝子の発現を誘導することで、糖質から脂肪への変換を促進する糖応答性転写因子であることが知られている。そこで、シングルセル解析結果を解糖系、脂質合成系に着目し、さらに詳細に解析した。擬時間解析 (pseudotime analysis) の結果、細胞の分化に伴い、解糖系酵素 *Gck*, *Pfkm*, *Ldha*, *Ldhb* の遺伝子発現は不変または低下している一方で、脂肪合成酵素である *Mlxipl*, *Srebf1*, *Acly*, *Acaca*, *Mcat*, *Fasn* の遺伝子発現は増加していることが明らかになった (図 2A, B)。このことから、細胞分化が進むにつれ、ChREBP の発現上昇を中心とした脂質合成経路が活性化することが示唆された。

次に、ヒト細胞での 細胞分化・成熟過程における脂質代謝変化についてヒト iPS 細胞を用いて検討した。ヒト iPS 細胞を 3 次元培養すると、分化 15-22 日でインスリン陽性細胞が認められた (図 3A)。遺伝子発現解析の結果、分化 22 日のヒト iPS 細胞由来 細胞において、MLX1PL をはじめとした脂質合成関連遺伝子の発現上昇が認められた (図 3B)。さらに細胞内脂肪合成後の結果である脂肪滴も 細胞分化に伴った増加が観察され、合わせて脂肪滴形成に必要な遺伝子 *PLIN2* も分化段階に合わせた発現上昇が認められた (図 3C)。以上から、マウスのみならずヒト細胞でも同様に 細胞分化・成熟過程における脂質合成の重要性が明らかとなった。

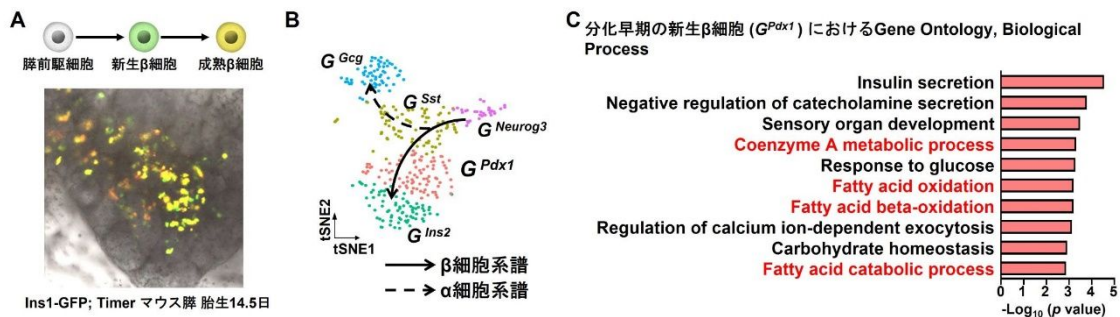


図 1. マウス新生 細胞のリアルタイム・シングルセルトランスクリプトーム解析

A) 膵 細胞新生の空間情報を高時間分解能かつ高解像度で取得可能な “Ins1-GFP; Timer” マウスでは、新生細胞は緑色蛍光を、成熟 細胞は黄色 (緑色 + 赤色) 蛍光を呈する。B) 胎生 16.5 日マウス新生 細胞のシングルセル解析により新生 細胞の遺伝子学的な不均質性が明らかとなった。C) 分化早期の新生 細胞 (G^{Pdx1}) における Gene Ontology 解析では、細胞分化早期の脂質代謝関連遺伝子の発現上昇を認めた。

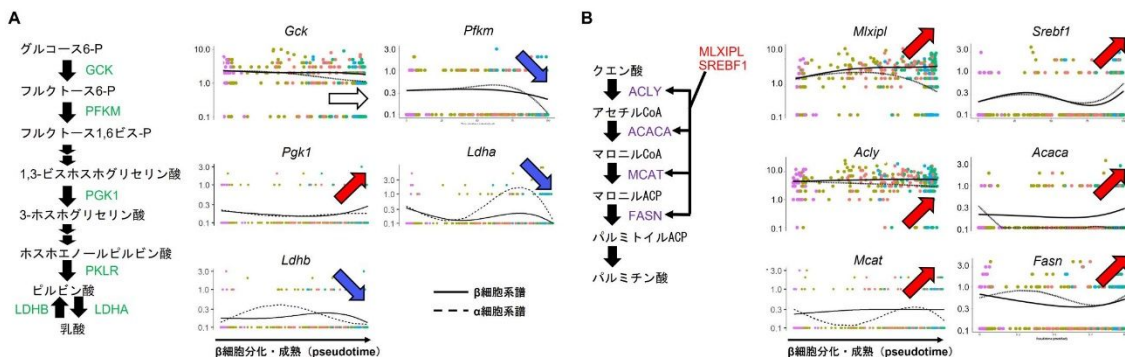


図 2. マウス 細胞分化・成熟における代謝関連遺伝子発現の擬時間解析

図 1 のシングルセルデータをもとに膵内分泌細胞の擬時間解析を行った。実線は 細胞系譜。点線は 細胞系譜。A) 解糖系関連遺伝子の多くは 細胞分化に伴い低下する。B) 脂質合成 (de novo lipogenesis) 関連遺伝子は 細胞分化に伴い上昇する。

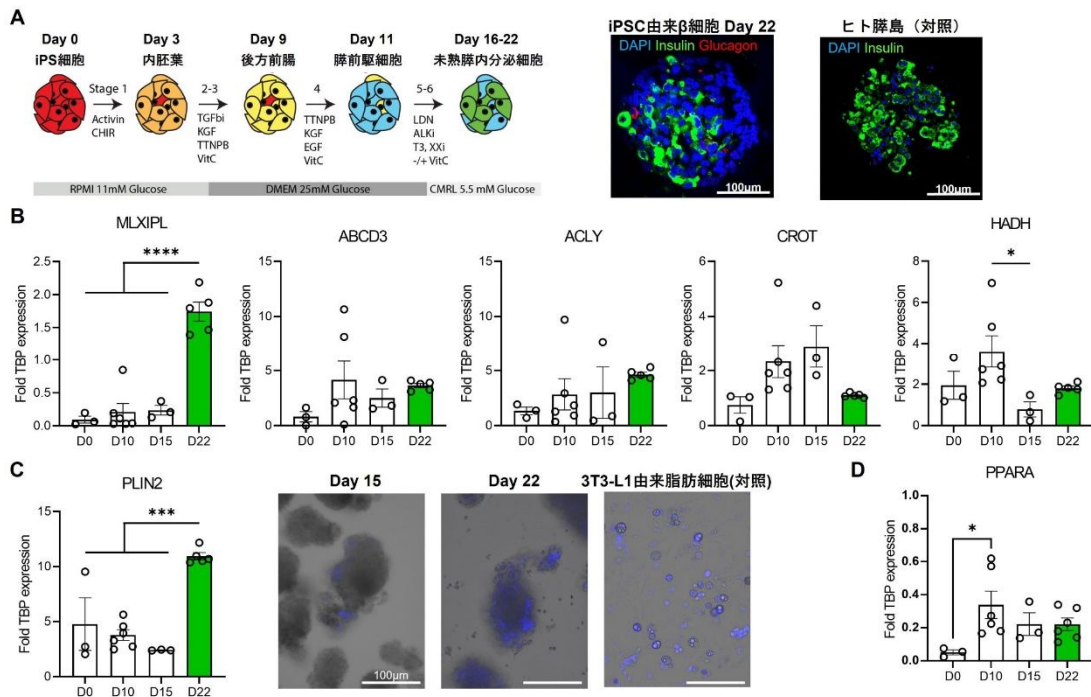


図3. ヒト iPS 細胞由来 細胞における脂質合成関連遺伝子発現と脂肪滴形成の推移

A) ヒト iPS 細胞由来 細胞作製 3 次元培養プロトコール。分化開始 22 日目のスフェロイドでヒト膵島によく似たインスリン陽性細胞がみられる。B) 細胞分化に伴い MLXIPL をはじめとした脂質合成関連遺伝子の発現上昇がみられる。C) 細胞分化に伴い脂肪滴形成遺伝子 PLIN2 が高発現し、脂肪滴 (Lipi-Blue 染色) が増加する。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, Tukey's test.

(2) 脂質合成経路への介入によるヒト iPS 細胞由来 細胞作製の高効率化

ChREBP の働きを負に制御する因子の一つとして PPAR が知られている。実際に、われわれのヒト iPS 細胞由来 細胞分化の過程においても、酸化関連遺伝子である PPAR が MLXIPL に先駆けて発現し、その後 細胞の分化が進むにつれ、両者が入り替わるように PPAR は低下傾向、MLXIPL は著明な上昇を呈していた (図 3D)。そこで、PPAR 作用の阻害を介した ChREBP 発現上昇を期待して、ヒト iPS 細胞由来 細胞分化誘導プロトコールのうち、膵内分泌細胞分化ステップである分化 15-22 日間に PPAR アンタゴニスト GW6471 を投与した。その結果、GW6471 投与によりインスリン遺伝子の発現上昇、細胞特異的な転写因子 NKX6.1 の発現上昇傾向および MLXIPL, ACLY, SREBF1 等脂質合成関連遺伝子の発現上昇またはその傾向がみられた (図 4)。以上より、PPAR 作用の阻害によって iPS 細胞由来 細胞分化誘導が高効率化する可能性が示唆された。

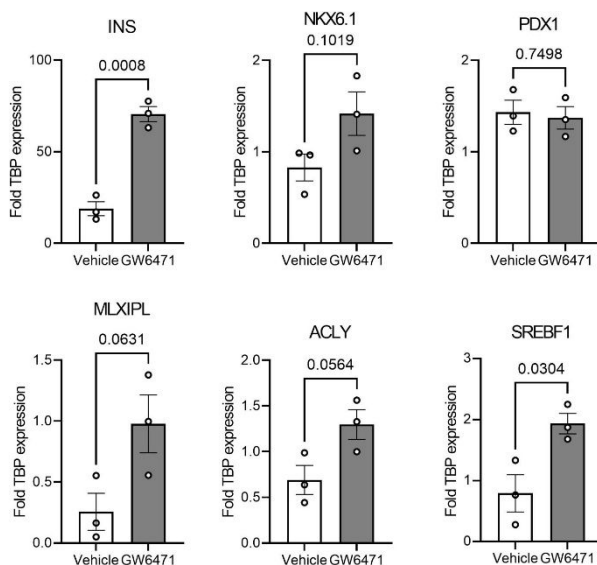


図4. PPAR アンタゴニスト GW6471 によるヒト iPS 細胞由来 細胞分化誘導の効率化

分化開始 15-22 日目の間 GW6471 1μM を添加した。GW6471 投与により 細胞関連遺伝子の発現上昇および脂質合成関連遺伝子の発現上昇がみられた。数値は Student t test による p 値。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki S, Lee M, Wakabayashi Y, Suzuki L, Winata H, Himuro M, Matsuoka TA, Shimomura I, Watada H, Lynn FC, Miyatsuka T	4. 巻 65
2. 論文標題 Spatial and transcriptional heterogeneity of pancreatic beta cell neogenesis revealed by a time-resolved reporter system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 811 ~ 828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00125-022-05662-0	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 Sasaki S and Miyatsuka T	4. 巻 47
2. 論文標題 Heterogeneity of Islet Cells during Embryogenesis and Differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diabetes & Metabolism Journal	6. 最初と最後の頁 173 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4093/dmj.2022.0324	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 Kawamori D and Sasaki S	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Newly discovered knowledge pertaining to glucagon and its clinical applications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.14009	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木周伍
2. 発表標題 リアルタイム・シングルセルトランスクリプトーム解析が明らかにした 細胞新生の特徴と再生医療への応用
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木周伍
2. 発表標題 リアルタイム・シングルセルトランスクリプトーム解析が明らかにした新生 細胞の特徴とニッチ
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木周伍
2. 発表標題 リアルタイム・シングルセルトランスクリプトーム解析が明らかにした新生 細胞の特徴とニッチ
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shugo Sasaki
2. 発表標題 Spatial and transcriptional heterogeneity of pancreatic β -cell neogenesis revealed by a time-resolved reporter system
3. 学会等名 2022 International Congress of Diabetes and Metabolism, Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木周伍
2. 発表標題 リアルタイム・シングルセルトランスクリプトーム解析が明らかにした新生 細胞の特徴とニッチ
3. 学会等名 第21回日本先進糖尿病治療・1型糖尿病研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木周伍
2. 発表標題 リアルタイム・シングルセルトランスクリプトーム解析が明らかにした新生 細胞の特徴とニッチ
3. 学会等名 NGS EXPO 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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