

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461348

研究課題名(和文) 膵 細胞新生における遺伝子発現調節機構の解析と再生医療への応用

研究課題名(英文) Uncovering molecular mechanisms in beta-cell neogenesis toward regeneration therapy for diabetes

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Insulin-Timerマウスの胎生期膵臓から新生 細胞および成熟 細胞を単離し、TagMan arrayにより膵臓特異的遺伝子を定量した結果、新生 細胞ではGLP-1受容体が発現していた。このことからGLP-1シグナルが 細胞新生過程に何らかの役割を果たしていると考え、GLP-1受容体を外因性に誘導する遺伝子改変マウスを作成した結果、ガストリンおよびGLP-1受容体刺激薬(Exendin-4)存在下に膵房細胞から 細胞へのリプログラミングが誘導されることが明らかとなった(Sasaki S et al. Diabetologia 2015;58:2582-2591)。

研究成果の概要(英文)：To analyze newly-generated cells with better time resolution, we developed the reporter mouse models "Insulin-Timer", which permitted sequential analyses of the sorted endocrine progenitors and revealed their unique features [Miyatsuka et al. Diabetes 63: 3388-3393, 2014]. Furthermore, microarray analysis identified genes specifically expressed in endocrine progenitors during development. Among these genes, we focused on GLP-1 receptor (Glp1r), which plays an essential role in acinar-to- reprogramming and generated the transgenic mouse model "exo-Glp1r", which expressed Glp1r exclusively in exocrine cells. When exo-Glp1r mice were treated with the GLP-1 analogs exendin-4 and gastrin, a fraction of the exocrine cells were reprogrammed into insulin-producing cells. The exocrine-derived cells formed islet-like clusters in the pancreata of exo-Glp1r mice. These findings propose possible directions of future therapies for generating cells via these signaling pathways.

研究分野：糖尿病再生医療

キーワード：糖尿病 膵発生 再生医療 インクレチン 細胞

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の根治を可能とするためには失われた膵β細胞機能を再現することが不可欠である。こうした中でES細胞や組織幹細胞等の非β細胞からインスリン産生細胞への分化誘導を促す再生医療が注目されている。その実現に向けた一つの手掛かりは、胎生期から成体に至るまでの膵臓の分化過程を詳細に解析し、それを再現することにある。

我々を含む多くの研究者は上記のような目標を掲げ、膵臓特異的転写因子の機能、および発現制御機構に焦点を当てて研究してきた。これまでの研究により膵幹細胞・前駆細胞および内分泌前駆細胞における転写因子間のネットワークが解明されてきている(Miyatsuka T et al. Expert Opin Ther Targets 2008)。一方で、内分泌細胞分化の最終局面であるインスリン産生細胞の新生(neogenesis)、および成熟(maturation)を規定する遺伝子に関してはほとんど明らかにされていない。

膵β細胞の新生・成熟過程を制御する分子機構が未解明である一因は、β細胞分化を時間軸に沿って解析するのに適した手法が存在しなかったことにある。Katsutaらはinsulin promoterの支配下に緑色蛍光蛋白質eGFPを発現するMIP(mouse insulin promoter)-eGFPマウスを用いて様々な発生段階で緑色蛍光細胞を単離し、β細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した(Katsuta H et al. Diabetologia 53: 128-138, 2010)。この方法により各発生段階のβ細胞における遺伝子発現プロファイルの総和を比較することができるが、どの発生段階においても内分泌前駆細胞から分化したばかりの新生β細胞と成熟β細胞が混在しており、言い換えればheterogeneousな分化段階のβ細胞の集合体であるため、真に時間軸に沿った解析をすることはできない。

今回の研究では、このような問題点を克服するため、時間依存性にその蛍光波長がシフトする蛋白質“DsRed-E5(Fluorescent Timer)”を用いる。Fluorescent Timer蛋白質は時間経過とともにそのconformationを変え、蛍光波長を変化させる(Terskikh A et al. Science 290: 1585-1588, 2000)

Fluorescent Timerをマウス胎生期の内分泌前駆細胞にのみ発現させたところ、この蛋白質によって緑色に標識される細胞集団は6時間という短い時間分解能で識別され、内分泌前駆細胞に特徴的な遺伝子群を抽出することに成功した(Miyatsuka T et al. Diabetes 2009, Miyatsuka T et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2011)。これはFluorescent Timer蛋白質が哺乳動物において、しかも*in vivo*において時間依存的な解析を可能とすることを示した最初の報告である。

このFluorescent Timer(DsRed-E5遺伝子)をインスリンプロモーターの連結したtransgene(図1A)を有する“MIP-Timer”マウスは、β細胞のみが蛍光蛋白質で標識される。内分泌前駆細胞からβ細胞へと分化したば

りの新生β細胞ではinsulin 1 promoterの制御下に翻訳された直後のTimer蛋白質だけが発現しているため、flow cytometryでは緑色に標識される。β細胞が分化するにつれて、より成熟したTimer分子が細胞内に混在するようになるため、個々の細胞単位で考えた場合、緑→黄色→橙色領域へと蛍光波長を変化させる(図1B)。

今回のプロジェクトではこのTimer蛋白質の特性を応用し、neogenesis直後のβ細胞に焦点を当てる。成熟したβ細胞、および自

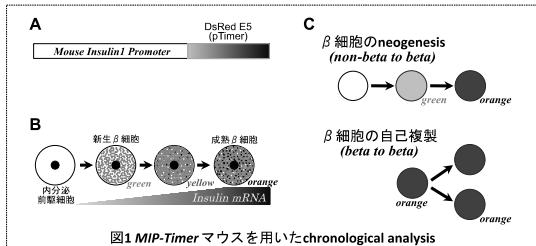


図1 MIP-Timer マウスを用いたchronological analysis

己複製によって新たに生まれたβ細胞は、前述の通り一定時間経過したTimer分子を含むため、橙色に標識される(図1C)。したがって、非β細胞から分化した直後の新生β細胞だけが緑色に標識され、蛍光顕微鏡、flow cytometry、FACS等を利用することにより、新生β細胞とそれ以外のβ細胞とを区別して解析できる。

最初にβ細胞新生が活発に起こっていることが知られている胎生後期において、MIP-Timerマウス膵臓の緑色蛍光細胞をFACSにより単離、精製し、内分泌前駆細胞から分化したばかりの新生β細胞を単離する。FACS後の細胞集団より精製したmRNAを用いてtranscriptome解析を行うことにより、生理的条件下で分化した新生β細胞における遺伝子発現プロファイルを時間依存的かつ網羅的に解析できる。

一方、出生後の膵臓においてはβ細胞新生がほとんど起こらないが、膵臓特異的転写因子であるPdx1, Neurog3, Mafaを外来性に遺伝子導入すると外分泌細胞からインスリン陽性細胞へのreprogrammingが起きることが報告されている(Zhou Q et al. Nature 455: 627-632, 2008)。このことは糖尿病再生医療のツールとして、終末分化を遂げた体細胞が使用できる可能性を示しているが、生理的条件下で起こるβ細胞分化との類似性、相違性についてはほとんど解明されていない。そこでMIP-Timerマウスの外分泌細胞にこれら膵臓特異的転写因子を異所性に発現させ、β細胞新生を誘導、reprogramming直後の緑色蛍光細胞をFACSで単離した後、transcriptome解析を行うことにより、誘導インスリン産生細胞における遺伝子発現プロファイルを明らかにする。この結果と前述の胎生期新生β細胞における遺伝子発現プロファイルとの類似性、相違性を検討し、誘導インスリン産生細胞が持つ特性を時間依存的に明らかにしたい。そして以上の実験から抽出されてきた「β細胞新生を規定する新規遺伝子」の機

能を *in vitro* および *in vivo* において解明する。

## 2. 研究の目的

- (1) 時間依存的に蛍光波長を変化させる蛍光蛋白質“Fluorescent Timer”をβ細胞特異的に発現させ、内分泌前駆細胞から分化したばかりの新生β細胞を単離し、遺伝子発現プロファイルを解析することにより、β細胞の新生(neogenesis)を制御する遺伝子群を同定する。
- (2) 上記(1)で同定した遺伝子の機能を *in vitro* および *in vivo* において解析する。
- (3) β細胞新生量を定量化するための Insulin-Timer 細胞株を作製し、β細胞新生を効率化するための条件を検討する。

## 3. 研究の方法

### [A] β細胞新生の経時的定量化

いくつかの発生段階で MIP-Timer マウスの膵臓を摘出し、トリプシン処理により single cells を得た後、flow cytometry を行う。胎生 13 日から成体マウスに至るまで flow cytometry を繰り返し行い、新生β細胞を最も効率良く (= 多く) 単離できる発生時期を同定する。

### [B] FACS による新生β細胞の単離および RNA の抽出

上記実験で得た情報をもとに、β細胞新生が最も活発な発生時期に FACS を行い、効率良く新生β細胞を回収する。対照群として非蛍光細胞と黄色および赤色蛍光細胞(=より分化したβ細胞)を同時に分離し、単離したβ細胞より RNA を抽出する。FACS 後に回収できる内分泌細胞の数は少ないので、数匹の embryos を一つにまとめ、さらに Nugen 社の RNA amplification kit を用いて RNA を増幅する。

### [C] マイクロアレイ解析

新生β細胞および対象となる細胞集団より抽出した mRNA を用いてマイクロアレイを行う。各細胞集団に対し、少なくとも3つの異なるサンプルを用意し、UCLA の DNA Microarray Core Facility に依頼し、GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array (AFFYMETRIX) を用いたマイクロアレイを行い、GeneSpring software を用いて解析する。新生β細胞に発現している遺伝子群を抽出する。

## 4. 研究成果

### β細胞新生の経時的定量化

胎生 14~18 日の MIP-Timer マウスより胎生期膵臓を摘出し、トリプシン処理後 flow cytometry を行なったところ、胎生 15~18 日の胎生膵より最も多くの新生β細胞 = green-dominant fluorescent cells を単離できることが明らかとなった。

胎生 16 日の MIP-Timer マウスの膵臓を用いて FACS を行い (MoFlow を使用) 新生β細胞および成熟β細胞を単離し、RNA を抽出後、マイクロアレイを行なった。Neurog3,

Pax4, Arx といった内分泌前駆細胞特異的遺伝子が新生β細胞に強く発現しており、TaqMan array を用いた定量化においても同様の傾向が確認され、新生β細胞が内分泌前駆細胞の特性を有することが示唆された (Miyatsuka T et al. Diabetes 63: 3388-3393, 2014)。

### GLP-1 過剰発現マウスを用いた acinar-to-β reprogramming の誘導

前述のマイクロアレイおよび TaqMan array の結果、新生β細胞では GLP-1 受容体が発現していた。このことから GLP-1 シグナルがβ細胞新生過程に何らかの役割を果たしていると考え、GLP-1 受容体を外因性に誘導する遺伝子改変マウス (CAG-CAT-Glp1r マウス) を作成した結果、ガストリンおよび GLP-1 受容体刺激薬 (Exendin-4) 存在下に腺房細胞からβ細胞へのリプログラミングが誘導される

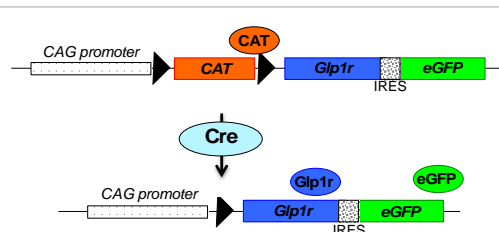


図2 CAG-CAT-Glp1r-(IRES)-eGFP transgene の模式図

Cre recombinase 非存在下では CAT 蛋白質が発現し、Glp1r が発現することはない。一方、Cre 存在下では stuffer 配列 = CAT 遺伝子部分が外れ、Glp1r および IRES の下流に連結した eGFP が翻訳されることになる。

ことが明らかとなった (Sasaki S, Miyatsuka T

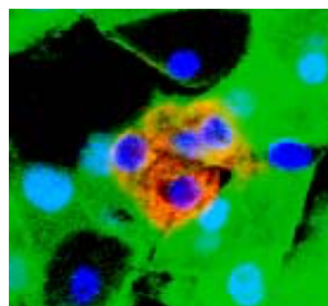


図3 膵外分泌細胞特異的 Glp1r 過剰発現マウスにおけるβ細胞新生  
外分泌細胞特異的に Glp1r を発現させ、Exendin-4 と Gastrin を投与したところ、外分泌領域に新生β細胞が誘導された (中央部分)。

et al. Diabetologia 58:2582-2591, 2015 )

### Gpr158 欠損マウスの表現型解析

β細胞の成熟化に伴い発現が上昇する遺伝子の1つとして Gpr158 を同定した。Gpr158 欠損マウスを KOMP (Knockout Mouse Project) より入手し、正常飼育下およびインスリン抵抗性条件下 (高脂肪食負荷あるいはインスリン受容体拮抗薬投与) での耐糖能を評価したが、随時血糖値およびブドウ糖負荷試験における血糖値の推移は対象同胞マウスと同程度であった。

Insulin-Timer 細胞株の樹立および細胞

## 新生効率化に向けた解析

膵腺房細胞株からインスリン産生細胞へのリプログラミングを定量化する実験系を構築し、転写因子 Pdx1, Neurog3, Mafa を外因性に導入することでインスリン産生細胞が誘導されること、Pdx1 を Neurog3, Mafa に先行して導入するとリプログラミング効率が向上することを見出した (Miyashita K, Miyatsuka T et al. Biochem Biophys Res Commun 444: 514-519, 2014)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Sasaki S, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Takahara M, Yamamoto Y, Yasuda T, Kaneto H, Fujitani Y, German MS, Akiyama H, Watada H, Shimomura I: Activation of GLP-1 and gastrin signalling induces in vivo reprogramming of pancreatic exocrine cells into beta cells in mice. Diabetologia 58: 2582-2591, 2015 (査読有)
2. Miyatsuka T, Matsuoka TA, Sasaki S, Kubo F, Shimomura I, Watada H, German MS, Hara M: Chronological analysis with fluorescent timer reveals unique features of newly generated beta-cells. Diabetes 63: 3388-3393, 2014 (査読有)
3. Miyashita K, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Sasaki S, Takebe S, Yasuda T, Watada H, Kaneto H, Shimomura I: Sequential introduction and dosage balance of defined transcription factors affect reprogramming efficiency from pancreatic duct cells into insulin-producing cells. Biochem Biophys Res Commun 444: 514-519, 2014 (査読有)

[学会発表](計5件)

1. 三浦正樹, 宮塚 健ほか「Stat3 シグナルの活性化は腺房細胞から細胞へのリプログラミングを制御する」Advans 研究会・東京都・2015年12月13日
2. 宮塚 健「糖尿病再生医療に向けた膵細胞新生・成熟機構の解明」第58回日本糖尿病学会年次集会・山口県・2015年5月21日
3. 佐々木周伍, 宮塚 健ほか「GLP-1 およびガストリンシグナルの活性化は外分泌細胞から細胞へのリプログラミングを誘導する」第88回日本内分泌学会学術総会・東京都・2015年4月23日
4. 宮塚 健「Chronology of  $\beta$  cell neogenesis for cure of diabetes」第57回日本糖尿病学会年次集会・大阪府・2014年5月24日
5. 佐々木周伍, 宮塚 健ほか「GLP-1 およびガストリンシグナルの活性化は膵細胞新生を誘導する」第57回日本糖尿病学会年次集会・大阪府・2014年5月22日

## 6. 研究組織

## (1)研究代表者

宮塚 健 (MIYATSUKA Takeshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60622363