

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670454

研究課題名(和文) New-timerマウスを用いた膵 細胞成熟化機構の解明

研究課題名(英文) Maturation Process of beta cells using New-timer mouse

研究代表者

綿田 裕孝 (Hiroataka, Watada)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60343480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：従来、 β 細胞は専ら膵管から新生すると考えられてきたが、直接的な証拠はなかった。我々は新生 β 細胞の位置情報を解析するための遺伝子改変マウスを作成し、“ β 細胞がどこから生まれるか？”を解析した。その結果、新生 β 細胞には膵管に近接して存在する前駆細胞から分化する「膵管近接型新生 β 細胞」と既存の成熟 β 細胞と血管内皮細胞に近接して分化する「血管近接型 β 細胞」の2つの分化様式が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We generated “Insulin-new-Timer mouse” and investigated the presence of “new-born-beta cells” and “matured-beta cells” by observing “green-cells” and “yellow cells”, respectively in pancreas isolated from the mice at P 0.5. In the pancreas, green cells locate around ducts and yellow cells form islet-like structure and locate far away from the ducts. These data suggest as expected before, beta cells differentiate from endocrine precursor cells around the ducts and move from ducts to inter-lobes of exocrine cells and form islets. On the other hand, green cells are also locate around islets and in the islets, green cells locates around endothelial cells. These data unexpectedly suggest that some beta cells are formed in the islets, and for this formation, signals from endothelial cells may be essential.

研究分野：代謝学

キーワード：膵 細胞 インスリン 発生分化

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、失われた膵細胞機能を補う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膵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。我が国では、「iPS 細胞の臨床応用の早期実現」を謳っているが、器官の発生現象は未解明の部分が多く、試験管内の分化誘導プロトコルがどの程度発生現象を再現しているのか? といった疑問が払拭できていない。この解決のためには、胎生期から成体に至るまで細胞がどのように分化するのか、その過程を詳細に解析することが不可欠である。

我々を含む多くの研究者は上記のような目標を掲げ、糖尿病で分泌が不足する血糖値を下げる唯一のホルモンを作るインスリンを産生する膵臓の発生分化機構の解明に焦点をあて、その発生分化を司る膵臓に発現する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臓は内胚葉由来上皮細胞のうち、中腸と前腸の境界部に位置する細胞に由来し、この細胞が、周囲からのシグナルを受容し、膵幹細胞へと分化するが、この分化には PDX-1 や Ptf1a という転写因子の発現が関与することが明らかになっている。また、その後、この細胞が膵内分泌細胞、外分泌細胞、膵管細胞へと分化するが、内分泌前駆細胞の分化には Ngn3 という転写因子の発現が重要な役割を有している。このように、現在までに、膵幹細胞および内分泌前駆細胞に発現する転写因子の細胞分化における役割が解明されてきている (Watada H et al. Endocrine J 2004; 51: 255-264)。

内分泌前駆細胞へと分化した細胞は、グルカゴンを産生する膵細胞やソマトスタチンを産生する膵細胞などの細胞に分化するが、その中で最も重要は細胞が、インスリンを産生する膵細胞である。この細胞が成人においては唯一の血糖降下作用を有するホルモンであるインスリンを分泌して全身の代謝状態をコントロールすることになるのであるが、この、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。

膵細胞の新生過程を制御する分子機構が未解明である一因は、膵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。我々はこの問題

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)" を用いて検討をおこなってきた。Timer 蛍光蛋白は時間経過とともにその蛍光波長を変化させる (Terskikh A et al. Science 290: 1585- 1588, 2000)。蛍光 Timer を *in vivo* で発現させると、緑色で標識された細胞を 6 時間という短い時間分解能で単離できる (Miyatsuka T et al. Diabetes 2009, Miyatsuka T et al. Proc Natl Acad Sci USA 2011)。我々はこの Timer 蛋白を insulin promoter で連結した Insulin-Timer マウスを用いて 新生細胞を単離することに成功しており (Miyatsuka T, Watada H 他 Diabetes 2014)、新生細胞が内分泌前駆細胞特性を持つことを見出している。このように Insulin-Timer マウスは優れた時間分解能で緑色蛍光を単離するのに適したモデルではあるが、DsRed-E5 の緑色蛍光の intensity が弱いため、蛍光顕微鏡において緑色蛍光細胞を観察することができず、新生細胞の位置情報や migration の軌道を解明できなかった。そこで、本研究は、新生細胞の分化過程の解明を目指し、新生膵細胞の tracing を可能とする手段を解明し、膵細胞の分化過程の解明を目指す。

2. 研究の目的

上述した研究背景を鑑み、当研究においては、下記の具体的目標を設定した。

インスリン産生細胞の新生(neogenesis)、および成熟(maturation)の分子メカニズムを解明する目的で、上述の Insulin-Timer マウスの弱点を克服し、空間分解能を大幅に改善し "new Insulin-Timer マウス (nIT マウス)" を作製する。nIT マウスの胎生期膵臓における新生細胞の位置情報を詳細に解析することにより、細胞がいつ、どこで生まれるのかを明らかにする。これにより細胞新生に必要な niche の特性を明らかにすることができる。

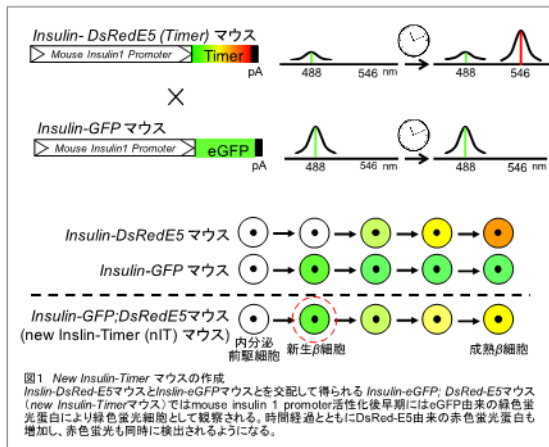
nIT マウス胎生期膵臓を *ex vivo* で培養し、新生細胞および成熟細胞の位置情報を経時的に観察することにより、細胞新生・成熟の軌道を解析する。

nIT マウスの胎生期膵臓より FACS を用いて新生細胞を単離し、マイクロアレイを行う。得られた遺伝子発現プロファイルを Insulin-DsRedE5 マウスのデータと比較する。

3. 研究の方法

new Insulin-Timer マウス(nIT マウス)の作成

前述の *Insulin 1* promoter-DsRedE5 マウスと *Insulin 1* promoter-eGFP マウスとを交配することにより、*Insulin-GFP; DsRedE5* double transgenic マウス (以降 *new Insulin-Timer* マウスあるいは nIT マウスと表記) を作製した (図1)。*Insulin-GFP* マウスは eGFP 蛋白質が翻訳されてから緑色蛍光として観察されるまでの時間が早く、また蛍光強度も強いいため、最も早い段階の新生細胞を緑色に標識することができる。また *insulin 1* promoter が活性化してから一定時間経過した細胞内には GFP 由来の緑色蛍光蛋白と DsRedE5 の緑色蛍光蛋白+赤色蛍光蛋白質が存在するため、その総和として黄緑色～黄色～橙色に標識される。



この new *Insulin-Timer* マウス胎仔より膵臓を摘出し、live imaging で観察し、また凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて緑色蛍光細胞および黄色蛍光細胞の位置情報を観察した。また DBA-lectin や血管内皮細胞、グリア細胞を標識する抗体を用いて免疫組織染色を行うことにより、膵管、血管系、神経系を標識しながら、新生細胞と周辺組織との位置関係を解析した。

4. 研究成果

胎生 16.5 日 (E16.5) の new *Insulin-Timer* マウス膵臓を摘出し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて live imaging で観察したところ、緑色蛍光細胞が時間経過とともに赤色蛍光を呈するようになることを観察した (次頁図2: 緑色蛍光は消失せず)。これは、我々の想定通り、緑色蛍光細胞を観察することにより新生細胞の位置情報を得ることができることを意味している。

E15.5～E18.5 および生後 0.5 日 (P0.5) の new-*Insulin-Timer* マウスの膵臓を摘出、

凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、膵管 (DBA-lectin で標識される) 近傍に緑色蛍光細胞を認め、膵管からやや離れたところに黄色細胞 (= 分化した細胞) で構成される膵島様クラスターを認めた。これは Neurog3 陽性内分泌前駆細胞が膵管内あるいは膵管に近接して存在することと合わせて考えると、内分泌前駆細胞から細胞へと分化した後に膵管から離れて行き、膵島を形成する過程が想起される。

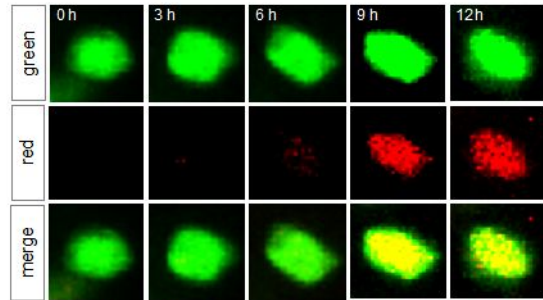
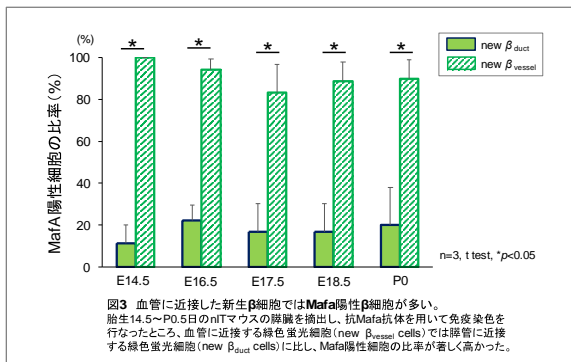


図2 New *Insulin-Timer* マウス胎生膵における蛍光細胞の live imaging。胎生 14.5 日の nIT マウスの胎生膵を摘出し、共焦点顕微鏡で経時的に観察したところ、緑色蛍光細胞 = 新生 β 細胞は観察開始後 9 時間で赤色蛍光を呈するようになった。

一方、緑色蛍光細胞の一部は膵管から離れた領域に存在していた。膵管から離れた領域に存在する全ての緑色蛍光細胞は血管内皮細胞と既存の膵島様クラスターに接していた。膵島近傍の新生細胞 (new β_{duct} cells) と血管内皮細胞近傍の新生細胞 (new β_{vessel} cells) とを定量したところ、胎生 16.5 日では全細胞の $3.2 \pm 0.3\%$ が new β_{duct} cells、 $3.3 \pm 0.5\%$ が new β_{vessel} cells 細胞であった。

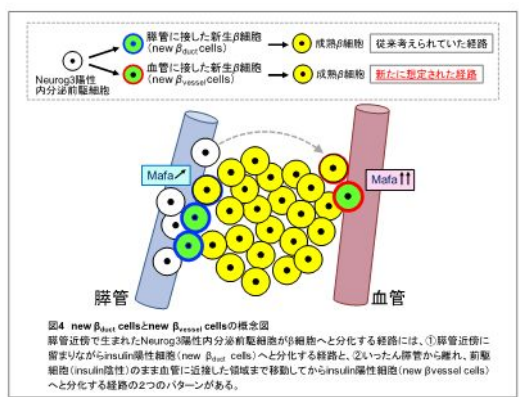
nIT マウスの胎生膵および新生児膵を摘出し、転写因子 Mafa に対する抗体を用いて免疫染色を行なった結果、new β_{vessel} cells では new β_{duct} cells に比し、Mafa 陽性率が著しく高かった (図3)。Mafa は膵細胞特異的転写因子の 1 つであり、膵細胞分化を制御する転写因子の hierarchy の中でも最も下流に位置することから、new β_{vessel} cells は膵内分泌前駆細胞から細胞へと分化して間もなく、成熟化を遂げる可能性が示唆された。



以上まとめると、これまでの研究により膵臓は内胚葉由来上皮細胞のうち、中腸と前腸の境界部に位置する細胞に由来し、この細胞が、周囲からのシグナルを受容し、膵幹細胞へと分化するが、この分化にはPDX-1やPtf1aという転写因子の発現が関与することが明らかになっている。また、その後、この細胞が膵内分泌細胞、外分泌細胞、膵管細胞へと分化するが、内分泌前駆細胞の分化にはNgn3という転写因子の発現が重要な役割を有している。このように、現在までに、膵幹細胞および内分泌前駆細胞に発現する転写因子の細胞分化における役割が解明されてきている(Watada H et al. Endocrine J 2004; 51; 255-264)。

内分泌前駆細胞へと分化した細胞は、グルカゴンを産生する膵細胞やソマトスタチンを産生する膵細胞などの細胞に分化するが、その中で最も重要は細胞が、インスリンを産生する膵細胞である。この細胞が成人においては唯一の血糖降下作用を有するホルモンであるインスリンを分泌して全身の代謝状態をコントロールすることになるのであるが、この、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かった。

今回の検討の結果、膵管近傍で生まれたNeurog3陽性内分泌前駆細胞は膵細胞へと分化するが、その細胞の特徴として、膵管近傍に留まりながらインスリン陽性細胞へと分化する経路と、いったん膵管から離れ、前駆細胞のまま血管に近接した領域まで移動してからインスリン陽性細胞へと分化する経路の2つのパターンがあることが示唆され、膵細胞分化過程の一端を明らかにすることができた(図4)。



Mafa は膵細胞特異的転写因子の1つであり、膵細胞分化を制御する転写因子のhierarchyの中でも最も下流に位置する。この中で、この経路の細胞はこの経路の細胞

とくらべて、Mafa 陽性率が高く、成熟膵細胞の分化にはこの経路が重要と考えられた

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計2件)

1. 宮塚 健, 綿田裕孝 「膵内分泌細胞の可塑性」 実験医学, 2015; 33(6): 887-891 (査読無し)
2. Miyatsuka T. Uncovering the mechanisms of beta-cell neogenesis and maturation toward development of a regenerative therapy for diabetes. Diabetology International 2015, Vol.6, 261-267 (査読無し)

(学会発表)(計3件)

1. 佐々木周伍, 宮塚 健, 松岡孝昭, 綿田裕孝, 下村伊一郎 「膵細胞新生には2つの異なる分化様式が存在する」 第59回日本糖尿病学会年次集会・京都市・2016年5月19日
2. 三浦正樹, 宮塚 健, 綿田裕孝 「Stat3シグナルの活性化は膵腺細胞から膵細胞へのリプログラミングを制御する」 Advans 研究会・千代田区・2015年12月13日
3. 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・下関市・2015年5月21日

(図書)(計0件)

(産業財産権)

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綿田 裕孝 (Watada, Hiroataka)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号:60343480

(2) 研究分担者

宮塚 健 (Miyatsuka, Takeshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 60622363