

令和元年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08622

研究課題名(和文) Mafa欠損MIN6細胞をもちいた膵細胞の成熟機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the pancreatic beta cell maturation using Mafa-knockout MIN6 cells.

研究代表者

宮崎 早月 (Miyazaki, Satsuki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60452439

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)：糖尿病の病因を解明するためには、成熟した膵β細胞の持つインスリン分泌制御メカニズムをより深く解析する必要がある。本研究では、膵β細胞の分化や成熟、インスリン分泌能、糖尿病の発症や進行に深く関わるMafa遺伝子を欠損した膵β細胞株を樹立し、さらにこの細胞にMafaを発現させた細胞株を作製した。そしてこれらの細胞を用いて、β細胞分化や成熟の過程、インスリン分泌能などを詳細に検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵島から未成熟な段階のβ細胞のみを単離培養することは困難であり、β細胞の分化・成熟機構を解析するための実験系の確立が求められていた。本研究により独自に樹立したMafa欠損β細胞株を用いることにより、in vitroにおいて分化・成熟機構の解析を行うことが初めて可能になった。この細胞を用いた研究により得られる知見は、将来的にiPS細胞などの幹細胞を高度に成熟したインスリン産生細胞に分化誘導する技術の実用化にも応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the cause of diabetes, it is important to deeply analyze the function of beta cells, especially the regulatory mechanisms of insulin secretion. In this study, I established beta cell lines deficient in the Mafa gene, which has been implicated in the differentiation and maturation of beta cells, insulin secretory mechanisms, and pathogenesis of diabetes. I also established Mafa-rescued cell lines and analyzed the mechanisms of beta cell differentiation and maturation using both of these Mafa-knockout and -rescued cell lines.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵β細胞 転写因子 インスリン分泌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病の患者数は年々増加しており、創薬や膵島移植、再生医療などさまざまな治療が試みられている。これまで申請者は、ES 細胞や膵外分泌腺などの細胞からの膵β細胞の分化誘導・分化転換を中心に研究を行ってきた。その過程で、β細胞の機能維持や成熟メカニズムの解明が重要であると考えられるようになった。中でも、転写因子 Mafa はβ細胞の成熟と分化機能の維持において重要な役割を持つと考えられ、注目を集めている。しかしながら、Mafa のターゲット遺伝子やそれらを介した Mafa 機能、分化成熟過程における役割の解明は進んでいない。

### 2. 研究の目的

糖尿病の病因を解明するためには、膵β細胞の持つインスリン分泌制御メカニズムをより深く解析する必要がある。本研究では、膵β細胞の分化や成熟、インスリン分泌能、糖尿病の発症や進行に深く関わる転写因子 Mafa を膵β細胞特異的に欠損させ、この遺伝子がβ細胞の分化成熟の過程や機能維持においてどのような役割を果たしているかを詳細に検討する。具体的には、未成熟であるが増殖能を持つ Mafa ノックアウトβ細胞株を樹立し、さらに Mafa-rescue 細胞を作製し、比較解析を行うことでβ細胞としての分化機能、特にグルコース応答性インスリン分泌能を獲得するメカニズムを明らかにすることを目的とする。

本研究により得られる知見は、耐糖能低下状態におけるβ細胞機能の改善や、iPS 細胞を用いたβ細胞再生研究にも役立つと期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) Mafa 欠損インスリノーマ細胞株の作製

Mafa 欠損インスリノーマ細胞株 (MIN6-Mafa-KO 細胞) を作製するために、インスリンプロモーター下で SV40 の T 抗原を発現するカセットを導入したトランスジェニックマウス IT-6 と Mafa ヘテロノックアウトマウス (筑波大学 高橋 智教授より分与) を掛け合わせていき、Mafa<sup>+/+</sup>/IT-6 マウスを得た。IT-6 のトランスジーンをもつマウスでは、7 週齢を過ぎると、膵島にインスリノーマが発生し、低血糖を起こす。比較的低血糖になったマウスから膵臓を摘出し、インスリノーマを単離培養し、MIN6-Mafa-KO 細胞を十数株樹立した。この中から、コロニー形態の均一性などをもとに 2 株を選択し、その後の実験に用いた。

#### (2) Mafa 発現 rescue 細胞の作製と解析

MIN6-Mafa-KO 細胞にアデノウイルスベクター (AdV) やレンチウイルスベクター (LentiV) をもちいて Mafa を発現させ rescue 細胞 (MIN6-AdV-Mafa 細胞と MIN6-LentiV-Mafa 細胞) を作製した。LentiV-Mafa を感染させた rescue 細胞は、puromycin で薬剤選択を行った (約 3 週間)。これらの細胞について、グルコースなどに対する応答性インスリン分泌能、増殖力やアポトーシスの割合、インスリン含量を測定した。さらに、電子顕微鏡にてインスリン分泌顆粒の状態を観察した。

#### (3) MIN6-Mafa-KO 細胞と rescue 細胞の間での DNA マイクロアレイ解析

MIN6-Mafa-KO 細胞と rescue 細胞 (MIN6-AdV-Mafa 細胞と MIN6-LentiV-Mafa 細胞) の間で、DNA マイクロアレイ解析を行った。それぞれの 2 群において共通に変動している遺伝子群や一方のみで変動している遺伝子群をそれぞれ抽出した。MIN6-AdV-Mafa 細胞と MIN6-LentiV-Mafa 細胞の 2 群において共通に 2 倍以上発現が増加している遺伝子群の中で、新規に作成した成熟β細胞株 MIN6 CB4 細胞でも発現が高い遺伝子を RNA seq のデータをもとに絞り込んだ。さらに、Mafa ChIP sequence のデータから、目的遺伝子のゲノム領域に結合部位がある遺伝子を絞り込んだ。その中から、インスリン分泌制御に関わる可能性のある候補遺伝子をクローニングし、レンチウイルスベクターに組み込んで、MIN6-Mafa-KO 細胞に導入した。それらの細胞について、グルコースや KCl 応答性インスリン分泌、インスリン含量を測定し、β細胞機能がどの程度改善するか検討した。

### 4. 研究成果

(1) MIN6-Mafa-KO 細胞は、MIN6 細胞や MIN6-LentiV-Mafa 細胞と比較し、コンパクトに盛り上がったコロニー形態を示し、個々の細胞の大きさも小さい傾向にあった。電子顕微鏡にてインスリン分泌顆粒を観察したところ、MIN6-Mafa-KO 細胞ではインスリン分泌顆粒の電子密度が低下していたが、MIN6-LentiV-Mafa 細胞では回復していた (図 1)。

(2) MIN6-LentiV-Mafa 細胞は、MIN6-Mafa-KO 細胞と比較し、インスリン含量の増加、アポトーシスの割合の減少、増殖力の増加が認められた。また、グルコース応答性インスリン分泌や、KCl 刺激に対する応答性は改善していたが、MIN6 細胞と比較するとインスリン分泌量は十分には回復しなかった。

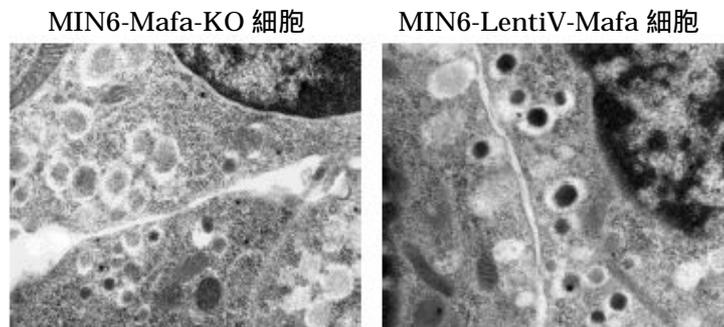


図1 電子顕微鏡像：インスリン分泌顆粒

(3) インスリン分泌制御に関わる可能性のある候補遺伝子をいくつかクローニングし、レンチウイルスベクターにて MIN6-Mafa-KO 細胞に発現させたところ、MaoB を発現させた場合に、グルコース応答性インスリン分泌の部分的な改善がみられた。

(4) MIN6-LentiV-Mafa 細胞は、インスリン分泌顆粒の密度やグルコース応答性インスリン分泌が改善していたが、成熟ベータ細胞のマーカーである Ucn3 の発現が軽度の増加にとどまったことから、rescue 細胞はまだ未成熟な状態にあり、さらなる成熟化が必要であると考えられた。

今後は、インスリン分泌制御やベータ細胞成熟に関わる可能性のある候補遺伝子を探求するとともに、分化増殖因子存在下での MIN6-LentiV-Mafa 細胞の培養による成熟誘導などを行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

宮崎早月、宮崎純一：膵 細胞の再生医療の現状と今後、*医薬ジャーナル* 53: 1691-1698, 2017. 査読無

<https://www.molcom.jp/products/detail/115723/>

Miyazaki S, Tashiro F, Miyazaki J: Transgenic expression of a single transcription factor Pdx1 induces transdifferentiation of pancreatic acinar cells to endocrine cells in adult mice. *PLoS One* 11: e0161190, 2016. 査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0161190

Kobayashi M, Yamato E, Tanabe K, Tashiro F, Miyazaki S, Miyazaki J: Functional analysis of novel candidate regulators of insulin secretion in the MIN6 mouse pancreatic  $\beta$  cell line. *PLoS One* 11: e0151927, 2016. 査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0151927

〔学会発表〕(計5件)

田代 文、小林正樹、宮崎早月、宮崎純一：グルコース応答性インスリン分泌に関与する新規候補遺伝子 Tmem59l の解析 第41回日本分子生物学会年会 2018

宮崎純一、田代 文、佐々木一樹、宮崎早月：長期に安定した分化形質を維持する新規膵ベータ細胞株 MIN6-CB4 の開発とその解析 第41回日本分子生物学会年会 2018

宮崎純一、田代 文、宮崎早月：長期に安定した分化形質を維持する新規膵 細胞株 MIN6-CB4 の開発とその解析 第61回日本糖尿病学会年次学術集会 2018

上田裕紀、宮崎早月、田代 文、宮崎純一：新生児一過性糖尿病：原因遺伝子欠損 MIN6 膵 細胞株の樹立と解析 第54回日本糖尿病学会近畿地方会 2017

〔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：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。