

令和元年6月19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09392

研究課題名(和文) 膵β細胞における発生および成熟過程のエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of development and maturation processes in pancreatic beta cells

研究代表者

勝田 仁 (KATSUTA, HITOSHI)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：50333240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 発生の各段階のマウス膵細胞において、膵細胞発生・成熟過程のエピジェネティック制御機構を統合的に解明することを計画した。本研究では、高純度かつバイアビリティが高い膵細胞を回収し、高品質のRNAを抽出してエピジェネティック解析に用いることが、信頼性の高いデータを得るために極めて重要である。

マウス胎児膵組織をコラゲナーゼで単細胞にした後フローサイトメーターにて膵細胞をソーティングした。その結果、回収できる細胞数が少なく、バイアビリティが低いことが判明した。そこで、ソーティングの方法や単細胞化処理の条件を様々に検討し、エピジェネティック解析に十分な品質の細胞が得られるよう検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、発生の各段階のマウス膵細胞において、膵細胞発生・成熟過程のエピジェネティック制御機構を時系列的に統合的に解析する。このデータは、iPS細胞などから作出した代替膵細胞の成熟度の評価基準とすることが期待できる。さらに、作製したインスリン産生細胞を、より機能的な細胞へ成熟させるための“道標”となる情報が得られると期待され、これまで手探りで進められていた代替膵細胞の開発を促進できることが期待される。さらに、将来、ある細胞のエピジェネティック修飾パターンを別の細胞へ“複写”する技術が開発されれば、本研究の成果が、エピジェネティック医療の開発に向けた重要な基盤となると期待される。

研究成果の概要(英文)： We planned to comprehensively elucidate the epigenetic regulation mechanism of pancreatic cell development and maturation process in mouse pancreatic cells at each developmental stage. In this study, it is extremely important to recover high purity and highly viable pancreatic cells, extract high quality RNA and use it for epigenetic analysis, in order to obtain reliable data.

Mouse fetal pancreatic tissue was made into single cells with collagenase and then pancreatic cells were sorted by a flow cytometer. As a result, it was found that the number of recoverable cells was small and the viability was low. Therefore, we are investigating various sorting methods and conditions for unicellularization, and are working to obtain cells of sufficient quality for epigenetic analysis.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵β細胞再生

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 1型糖尿病の再生研究の現状と課題

1型糖尿病は、自己免疫反応などによりインスリン産生細胞である膵β細胞が破壊され、インスリンが絶対的欠乏となり発症する代謝疾患である。多くの場合小児期に発症し、生命を維持するために一生インスリン注射を続けなければならない。また、生命は維持できたとしても、長期にわたって厳格に血糖をコントロールすることは困難で、失明、腎不全による血液透析導入、脳梗塞・心筋梗塞などの重篤な合併症を引き起こすことが多いため、糖尿病の根本的治療法の早期確立が望まれている。

研究代表者は、1型糖尿病の根治を目指し、各種組織細胞、さらにはヒトiPS細胞(1. Weir GCら, *Science*, 2008)から、膵β細胞の再生を誘導するシステムの開発に取り組んでいる。既に、膵管上皮細胞(2. 菊川、勝田ら, *Diabetologia*, 2009)や、胆管上皮細胞(3. 長屋、勝田ら, *J Endocrinol*, 2009)から、インスリン産生細胞を分化誘導することに成功し、論文として公表している。これらの細胞は、糖尿病マウスに移植すると血糖値を改善させうるが、生体内の膵β細胞のように血糖値に応じてインスリン分泌量を微細に調整するような、臨床応用に十分な機能を有するには至っていない。

世界的にも我々と同様で、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞をはじめとして種々の細胞から膵β細胞を再生する研究が進められているが、臨床応用に十分なインスリン分泌能とグルコース応答性を有する機能的な細胞の作出には成功していない。

このように、1型糖尿病の再生医療の確立に向けた代替膵β細胞作製の大きな課題は、種々の細胞から作製したインスリン産生細胞を、如何にして臨床応用可能なレベルの機能的な細胞へ成熟させるかであり、本研究では、これらの課題に挑戦する。

### (2) 臨床応用可能な膵β細胞の作出に向けた研究戦略

・膵β細胞発生・成熟過程のエピジェネティック制御機構の解明:

エピジェネティクスは、「DNA配列の変化を伴わず、後天的なゲノムの修飾により遺伝子発現が制御され維持される仕組み」と定義され、修飾を受けたゲノムは「エピゲノム」と呼ばれている。代表的なエピゲノム修飾としては、①DNA修飾(メチル化)、②ヒストン修飾(メチル化、アセチル化)が挙げられる。また、エピゲノム制御因子として③micro-RNA等のSmall RNAが重要な役割を果たしている(図1)。

細胞固有のエピゲノム修飾パターン(即ち、全ゲノムに渡るDNA修飾(メチル化)、ヒストン修飾(メチル化、アセチル化)の分布)は、細胞分裂後も継承されるため、細胞の組織特異的遺伝子発現プロファイルの記憶装置として働き、各細胞の性質を決定づける基盤となっている。従って、膵β細胞の発生・成熟過程におけるエピゲノム修飾パターンの時系列的解析は、膵β細胞の細胞特性および分化・成熟制御機構を理解するうえで不可欠である。

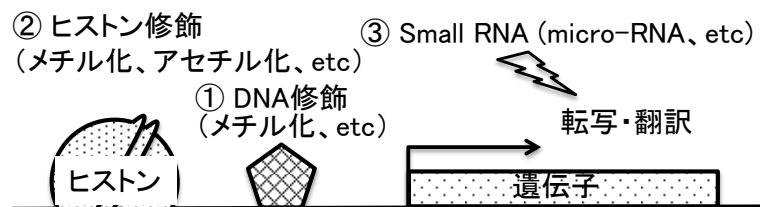


図1. 代表的なエピゲノム修飾

## 2. 研究の目的

### (1) 膵β細胞分化・成熟過程のエピジェネティック制御機構の解明

我々は、マウス膵β細胞が、分化・成熟過程において、出生前後および離乳前後(生後4週頃)に、機能的に劇的に成熟することを明らかにしている(図2, 4. 勝田ら, *Endocrinology*, 2012)。

これには、栄養の摂取形態の変化、即ち出生前の胎盤を介した栄養摂取から母乳への変化、母乳から固形飼料への変化が、それぞれ膵β細胞成熟の誘因となっていると考えられる。この膵β細胞の成熟機構を明らかにすれば、我々の目指す機能的な膵β細胞の作出に重要な情報が得られると期待される。本研究では、膵β細胞発

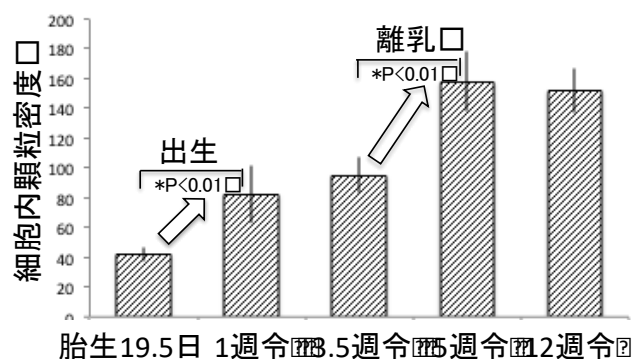


図2. 膵β細胞成熟度の推移

生・成熟過程の各段階（インスリン発現直後（胎生 11.5 日）、出生前・後、離乳前・後、成体の計 6 時点）において膵β細胞の①エピゲノム修飾パターン（即ち、全ゲノムに渡る DNA 修飾（メチル化）、ヒストン修飾（メチル化、アセチル化）の分布）と②エピゲノム制御因子である micro-RNA の発現および③エピジェネティック制御の結果である遺伝子発現プロファイルを、次世代シーケンサーにて時系列的に解析する。この解析をもとに、膵β細胞の発生・成熟に伴って「エピゲノム修飾が変化したゲノム領域に存在する遺伝子」および「発現量が変化した micro-RNA の標的遺伝子」を特定し、これらの遺伝子のうち、遺伝子発現プロファイル解析（RNA-Seq）のデータと照合して、膵β細胞の分化・成熟に伴って実際に遺伝子発現量に変化が認められた遺伝子を、「膵β細胞の分化・成熟に重要と想定される候補遺伝子群」として選定する。さらに、この候補遺伝子を、実際に未熟膵β細胞で、高発現またはノックダウンさせ、当該遺伝子が、膵β細胞の発生・成熟に重要であるかを検証し確定する。以上により、膵β細胞発生・成熟過程のエピジェネティック制御機構を統合的に解明する。

### 3. 研究の方法

- (1) 発生・成熟各段階のマウス膵β細胞の高純度調製：  
精度の高いエピジェネティック解析を行うためには、試料となる細胞の純度が重要となる。本研究では、膵β細胞特異的に緑色蛍光蛋白を発現するトランスジェニックマウス（MIP-GFP マウス）より、発生・成熟各段階の膵β細胞を回収する。本研究ではこの高純度の膵β細胞を用いることにより、精度の高いエピジェネティック解析を行う。
  - (2) エピジェネティック解析： 発生・成熟過程の各段階（インスリン発現直後（胎生 11.5 日）、出生前・後、離乳前・後、成体の計 6 時点）の膵β細胞において、① エピゲノム修飾パターン（全ゲノムに渡る DNA 修飾（メチル化）、ヒストン修飾（メチル化、アセチル化）の分布）、②エピゲノム制御因子である micro-RNA の発現、③エピジェネティック制御の結果である遺伝子発現プロファイルを解析する。
  - (3) 候補遺伝子群の選定： (2)の解析で、①膵β細胞の発生・成熟に伴ってエピゲノム修飾が変化したゲノム領域に存在する遺伝子および②発生・成熟に伴って発現量が変化した micro-RNA が結合しうる標的遺伝子を特定する。さらに、これらの遺伝子について、(2)で行った遺伝子発現プロファイル解析（RNA-Seq）のデータと照合して、膵β細胞の分化・成熟に伴って実際に遺伝子発現量に変化が認められた遺伝子を、「膵β細胞の分化・成熟に重要と想定される候補遺伝子群」として選定する。
  - (4) 膵β細胞の分化・成熟に重要な遺伝子の検証と確定： (3)で選定した候補遺伝子を、未熟膵β細胞で、高発現またはノックダウンさせ、当該遺伝子が膵β細胞の発生・成熟に重要であるかを検証する。
- 以上により、膵β細胞発生・成熟過程のエピジェネティック制御機構を統合的に解明する。

### 4. 研究成果

本研究では、発生各段階での膵β細胞を単離するため、膵β細胞が特異的に緑色蛍光を発するトランスジェニックマウス Mouse Insulin Promoter - Green Fluorescent Protein (MIP-GFP) マウスを用いた。マウス胎児膵組織をコラゲナーゼで単細胞に処理した後、fluorescence activated cell sorting (FACS) にて緑色蛍光を発する膵β細胞をソーティングした（図 3、4）。その結果、回収できる細胞数が少なく、バイアビリティが低いことが判明した。そこで、ソーティングの方法や、膵β細胞の単細胞化処理の条件を様々に検討し、エピジェネティック解析に十分な品質の細胞が得られるよう検討を進めている。

これまで、膵β細胞を単離し解析した論文では、膵島として回収するなど、膵β細胞の純度が高くはない。本研究では、高純度かつバイアビリティの高い膵β細胞で解析することが重要であり、今後さらに膵β細胞の回収方法の検討を進めていく予定である。具体的な検討課題としては、膵β細胞の単細胞化処理にコラゲナーゼを用いたが、膵β細胞を単細胞化し高純度の細胞を回収するためコラゲナーゼの処理時間を長くすると回収した膵β細胞のバイアビリティが低下し、短くすると単細胞化が不十分で純度が低くなった。膵β細胞の単細胞化にはコラゲナーゼ以外の酵素を検討する必要がある。また、ソーティングにより細胞に物理的ダメージが加わることも判明した。膵β細胞特異的細胞表面マーカーに対するマグネティックビーズ結合抗体を用いて細胞を回収するなどダメージを低減する方法の検討が必要である。高純度でバイアビリティの高い膵β細胞を単離する技術の確立は、本研究ばかりでなく、膵β細胞の解析において有用性の高い技術である。この技術は、世界でも確立した方法はなく、極めて重要な技術であり今後も確立を目指す予定である。

エピジェネティック解析は重要であり、この技術が確立できれば、得られる情報の重要性は大きい。本研究の学術的特色は、単に膵β細胞の発生・成熟に伴ってエピゲノム修飾が変化するゲノム領域を特定するだけでなく、遺伝子発現プロファイル解析（RNA-Seq）のデータと照

合することにより、実際にエピジェネティック制御を受けている遺伝子を特定することを可能にする点にある。更に、この特定した遺伝子を、実際に未熟膵β細胞で、高発現またはノックダウンさせれば、当該遺伝子が、膵β細胞の発生・成熟に重要であるかを実証することも可能となる。このように、本研究は、構成的アプローチによる検証を経て、高い信頼性のもとで、膵β細胞発生・成熟過程のエピジェネティック制御機構を統合的に解明するという意義を有するものである。

また、これまで、糖尿病における高血糖状態での膵β細胞のエピジェネティック解析は行われているが、本研究のように膵β細胞の発生・成熟過程におけるエピゲノム修飾パターンを時系列的且つ多面的に解析した報告はなく、膵β細胞分化・成熟のエピジェネティック制御機構の解明に向けて基盤となるデータが得られることが期待される。具体的には、各種細胞より作製された膵β細胞の成熟度の定量的な評価基準とすることができ、種々の細胞から作出した代替膵β細胞の成熟度評価や規格化の基盤となることが期待できる。

さらに、作製したインスリン産生細胞を、より機能的な細胞へ成熟させるための“道標”となる情報が得られると期待され、これまで手探りで進められていた代替膵β細胞の開発を促進できることが期待される。また、将来、ある細胞のエピジェネティック修飾パターンを別の細胞へ“複写”する技術が開発されれば、本研究の成果が、エピジェネティック医療の開発に向けた重要な基盤となると期待され、今後も継続して推進していく予定である。

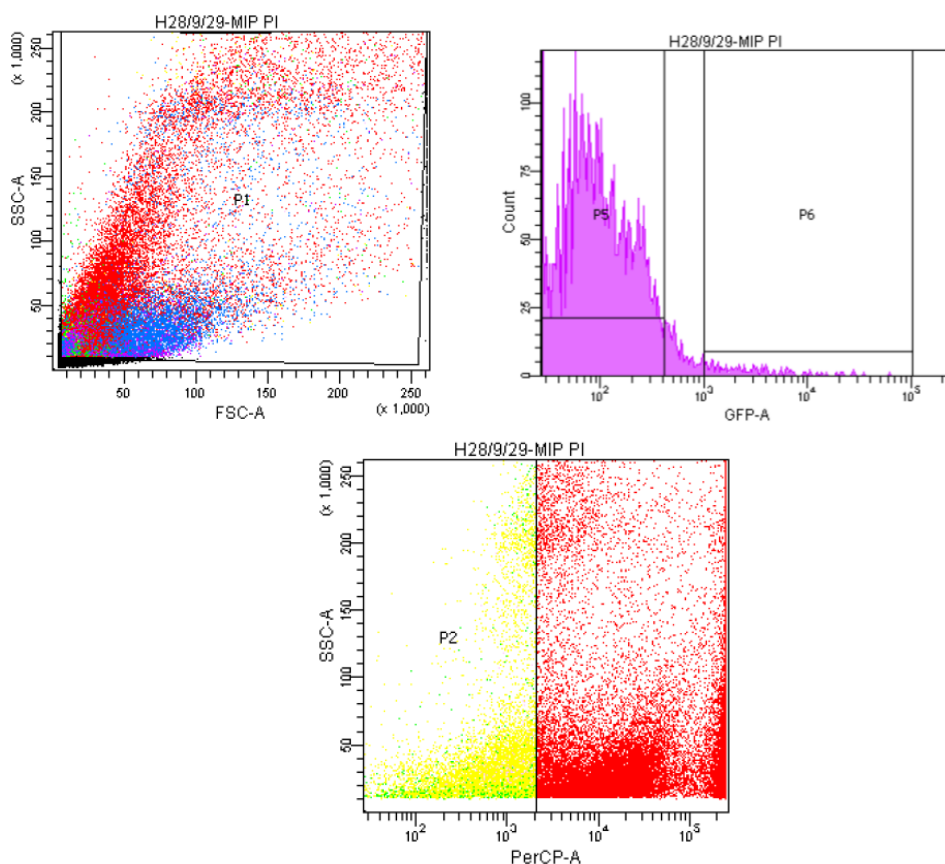


図3 FACS Aria 解析結果(MIP-GFP 新生仔マウス膵細胞)

左上：細胞の FSC-SSC 分布 (赤：死細胞 青：生細胞)

右上：細胞の蛍光分布(P5:非蛍光細胞 P6:蛍光細胞)

下：PI 染色 (黄：生細胞 赤：死細胞)

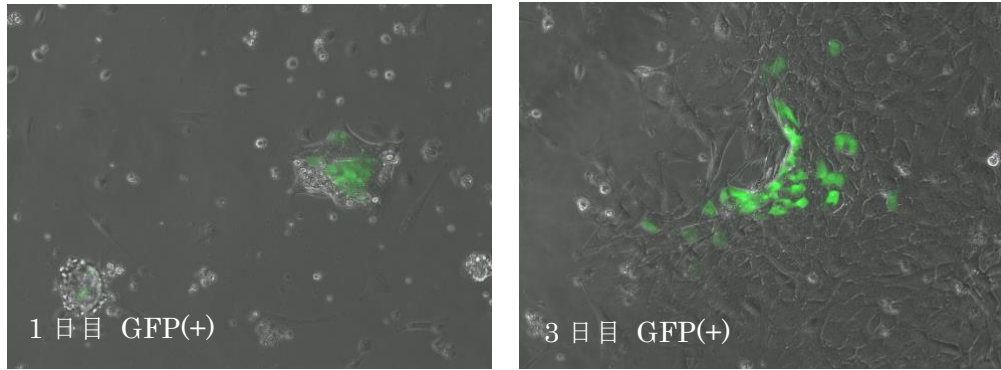


図4 MIP-GFP 新生仔マウス膵細胞（ソート後培養）

<引用文献>

1. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K.,  
Induced pluripotent stem cells generated without viral integration.,  
Science., 322(5903), 2008, 945-9.
2. Kikugawa R, Katsuta H, Akashi T, Yatoh S, Weir GC, Sharma A, Bonner-Weir S.  
Differentiation of COPAS-sorted non-endocrine pancreatic cells into insulin-positive  
cells in the mouse.  
Diabetologia., 52(4), 2009, 645-52.
3. Nagaya M, Katsuta H, Kaneto H, Bonner-Weir S, Weir GC.  
Adult mouse intrahepatic biliary epithelial cells induced in vitro to become  
insulin-producing cells.  
J Endocrinol., 201(1), 2009, 37-47.
4. Katsuta H, Aguayo-Mazzucato C, Katsuta R, Akashi T, Hollister-Lock J, Sharma AJ,  
Bonner-Weir S, Weir GC.  
Subpopulations of GFP-marked mouse pancreatic  $\beta$ -cells differ in size, granularity,  
and insulin secretion.  
Endocrinology., 153(11), 2012, 5180-7.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等： 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：永淵 正法

ローマ字氏名： Seiho Nagafuchi

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：特任教授

研究者番号（8桁）：00150441

研究分担者氏名：梅村 創

ローマ字氏名： Tsukuru Umemura

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：臨床医学研究センター

職名：教授

研究者番号（8桁）：90136432

※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。