

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08090

研究課題名（和文）タイムラプスイメージングに基づく膵島形成原理の解明

研究課題名（英文）Study of pancreatic islet formation during development by long-term time-lapse imaging

研究代表者

吉田 真子（YOSHIDA, Naoko）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：40392170

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）：発生生物学的アプローチによる膵島形成原理解明を目的として、膵内分泌前駆細胞が特異的に標識されるノックインマウスの新規作製を試み、相同組換え体ES細胞の樹立に成功したものの、マウス作出には至らなかった。そこで、既存の膵前駆細胞が特異的に標識されるノックインマウスおよび多色細胞系譜マウスを用いて、発生期膵臓の生体外培養組織の長期3次元タイムラプスイメージングを実施し、原始膵管から膵島が発生する一連の過程を詳細に記録観察することに成功した他、複数の膵前駆細胞を起源として一つの膵島が発生することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹立した相同組換え体ES細胞は、膵内分泌前駆細胞を特異的に標識できるノックインマウスの新規作製のみならず、分化誘導実験に応用利用することが可能であり、有用な実験材料を得たと言える。また、複数の膵前駆細胞を起源とした内分泌細胞の集団化によって膵島が構築されることを示す直接的証拠が得られた。膵島形成機構に関するこのような知見を集積することは、将来的にiPS細胞を用いた移植再生医療への貢献に繋がるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：To investigate pancreatic islet formation during mouse development, we first attempted to produce an unique knock-in mouse which pancreatic endocrine progenitors would be labeled specifically. In spite of the achievement in obtaining several homologously recombined ES cell clones, we failed to establish an knock-in mouse. According to this, we carried out long-term 3D time-lapse imaging using a different knock-in mouse which pancreatic progenitors would be labeled specifically. Based on the multi-color lineage tracing of ex vivo cultured pancreatic buds, we found that one single islet is derived from more than three different pancreatic progenitor cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：ノックインマウス 膵臓 膵島 内分泌細胞 多色細胞系譜追跡実験 Sox9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は急増(世界で3億人以上)しており、その根本的な治療法として、膵島移植が一定の成果を示しているものの、ドナー数の絶対的不足および組織適合性による拒絶反応が大きな課題となっている。2014年 Pagliuca らによりヒト iPS 細胞からβ細胞を効率的に誘導するための培養方法が開発され、膵島移植が抱えるこれらの問題解決に向け、大きく前進した。しかしながら、安全性評価やコストなどの観点から、実際に iPS 細胞を用いた移植再生医療が、糖尿病のスタンダードな治療法として確立されるには、引き続き多くの時間を要するものと考えられる。そこで、本研究では発生生物学的アプローチにより膵島が形成される仕組みを解明し、その過程で膵臓前駆細胞から内分泌細胞への分化・増殖を制御する新たな分子メカニズムを発見することにより、再生医療分野への貢献を目指すこととした。

元来 ES 細胞や iPS 細胞からインスリン産生β細胞への人為的な分化誘導が可能となった背景には、膵臓発生研究の進歩が欠かせない。各発生段階における形態学的解析と組織片移植による組織間相互作用を検討した古典的発生学的手法に始まり、遺伝子改変マウスを用いた解析による知見の集積、さらに細胞系譜追跡実験(cell lineage tracing)が行われ、膵臓発生の分子基盤が次第に明らかとなって来た。マウスの膵臓発生では、胎生 14.5 日目(E14.5)頃に原始膵管の基幹領域に Neurogenin3(Ngn3)陽性内分泌前駆細胞が出現し、細胞上皮層から間充織に向かって個々に離層・移動・集合して膵島が形成される。bHLH 型転写因子である Ngn3 は、膵臓の内分泌前駆細胞マーカーとしてよく知られており、E14.5 頃をピークに一過性に発現し、α、β、PP、δ 細胞の順に、膵島の内分泌細胞分化を誘導するマスター制御因子である。原始膵管の基幹領域から膵管および膵島が形成される一方、先端領域からは主に腺房が形成され、出生直前の E19.5 頃には成体の膵臓と同様の組織構造が完成する。生後、新生仔期に未成熟β細胞からインスリン産生β細胞への成熟化が起こり、膵島内にβ細胞の大量増殖が起こる。

これまでに Ngn3-Cre トランスジェニックマウスおよび Rosa26-GR/RG(緑および赤の2蛍光色を発現する)レポーターマウスを用いた細胞系譜追跡実験によって Ngn3 陽性内分泌前駆細胞は一對一にしか分化しない(unipotent)ことが報告されており、少なくとも原始膵管の基幹領域から離層した4個以上の細胞が集合し、膵島が形成されると推察されるが、直接的な証明は行われていない。この Ngn3 陽性内分泌前駆細胞の離層・移動・集合のメカニズムに関しては、未だ不明な点が多く、血管を足場として集積する可能性も示唆されたが、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現量を低下させた場合においても膵島形成が認められたことから、順序的として先に膵島が発生した後、膵島内に血管新生が起こり、続いて神経支配が起こると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、発生生物学的アプローチを用いて膵島形成原理の解明による再生医療分野への貢献を試みた。具体的には、原始膵管の基幹領域から内分泌前駆細胞がどのような仕組みで離層・移動・集合・分化・増殖し、膵島が構築されるのか解明するため、新たに Ngn3 ノックインマウスを作製し、Rosa26-rainbow 多色細胞系譜マウス(inducible multicolor mosaic mouse)との組み合わせにより、単一細胞レベルでの詳細な長期 3 次元タイムラプスイメージング解析を実施した。トランスジェニックマウスでは、目的遺伝子がランダムな位置に挿入されるのに対し、ノックインマウスでは、ゲノムとの相同組換えによって目的遺伝子を挿入するため、Ngn3 の遺伝子発現を最も忠実に再現することが可能である。さらに、新規作製した Ngn3 ノックインマウスを利用して、Ngn3 陽性内分泌前駆細胞をはじめ、派生した分化細胞を細胞選別により分取した後、シングルセル遺伝子解析を実施することにより、膵島発生を制御するターゲット分子を同定し、膵島形成機構の全容解明を目指した。

3. 研究の方法

(1)Ngn3 ノックインマウス作製実験

Ngn3 陽性内分泌前駆細胞が、特異的に黄色蛍光(Venus)を標識されると共にタモキシフェン誘導によって Cre リコンビナーゼを発現する Ngn3-Venus-CreERT2 ノックインマウスに加え、ドキシサイクリン誘導性 Tet-On-Cre システムを利用するため、Ngn3-IRES-rtTA ノックインマウスの作製を試みた。それぞれのターゲティングベクターを材料としてエレクトロポレーション法により ES 細胞への遺伝子導入を実施し、相同組換えを起こした ES 細胞クローンの樹立を行った。相同組換え体のスクリーニングは、まず PCR 法を用いて行い、Southern Blot 法により確認した。続いて、相同組換え体 ES 細胞を材料としてキメラマウスを作製した後、C57BL/6J 野生型マウスとの交配により F1 マウス取得を試みた。

(2)膵臓の生体外組織培養実験(ex vivo culture)

1% ペニシリン/ストレプトマイシン、1% GlutaMax および 50 μg/ml ゲンタマイシンを添加した BME 培地(Basal Medium Eagle)を用いて、実体顕微鏡下にて胎生 12.5 日目(E12.5)のマウス胎仔より背側膵芽(膵臓原基)を切除した後、予めフィブロネクチンをコートしたガラスボトムディッシュに組織全体を静置し、上記に加えてさらに 10% 血清(FBS)を添加した BME 培地 150 μl を用いて、37 °C、5% CO₂ 条件下にて数時間培養した。膵臓原基がディッシュ底面に接着していることを確認した後、10%血清入り BME 培地を 1.5~2 ml 静かに添加し、同様に培養を続けた。

(3)長期 3 次元タイムラプスイメージング実験

E12.5 から E14.5 の膵臓組織を 40 ng/ml ないし 100 ng/ml タモキシフェン添加培地にて 16 時間培養した後、PBS で洗浄し、通常培地にて培養を継続した E14.5 から E18.5 の膵臓組織をサンプルとして用いた。顕微鏡システムは、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700(キーエンス社)にステージトッピンキュベーター INU(東海ヒット社)を付属した装置を使用した。撮影条件は、20 倍の対物レンズを用いて、30 分ないし 1 時間毎に 96 時間に渡り、各撮影ポイントで Z 軸方向に 10~20 枚の連続画像取得を行った。蛍光フィルターは、CFP(青色)、GFP(緑色)、mCherry(赤色)、mOrange(橙色)のセクショニング画像観察に最適化したものを使用した。画像取得および解析は、顕微鏡システムに付属のソフトウェアを用いて行った。

(4)免疫組織染色実験

E18.5 の膵臓組織を 4% パラホルムアルデヒド溶液を用いて室温で 20~30 分間固定した後、下記の抗体を用いて免疫染色を施し、FV3000 共焦点レーザー顕微鏡システム(オリンパス社)を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。一次抗体として、anti-insulin 抗体、anti-glucagon 抗体および anti-somatostatin 抗体、二次抗体として、anti-rabbit IgG Alexa647 標識抗体ないし anti-mouse IgG Alexa405 標識抗体を使用した。

4. 研究成果

(1)Ngn3 ノックインマウス作製実験

ノックインマウス作製のための基本材料として、当初 R1 ES 細胞株を用いて誕生した Ngn3-Venus-CreERT2 および Ngn3-IRES-rtTA の各キメラマウスと C57BL/6J マウスとの交配を繰り返し実施したが、F1 マウスの取得には至らなかった。そのため、新たに入手した TT2 ES 細胞株を用いて Ngn3-Venus-CreERT2 ベクターの遺伝子導入を実施し、相同組換え体 ES 細胞を樹立した。この段階で「産前産後の休暇および育児休業の取得」により本研究課題を一時中断した。復職後、研究の遅れに伴う研究計画の見直しを実施し、本研究課題における新規 Ngn3 ノックインマウスの作製を中止することとした。

これまでに目的遺伝子がランダムな位置に挿入された Ngn3-Cre トランスジェニックマウスが作製され、当該マウスを用いた研究報告はあるものの、ゲノムとの相同組換えによって目的遺伝子を挿入した ES 細胞を材料として作製される Ngn3 ノックインマウスに関しては、未だ報告が認められない。このことから、本研究で新たに樹立した Ngn3-Venus-CreERT2 TT2 ES 細胞クローンは、今後、Ngn3 の遺伝子発現を最も忠実に再現することが可能な世界初のノックインマウス作製に直結する材料として、極めて重要な研究試料と言える。

また、残念ながら、生殖系列細胞への分化が確認できなかった Ngn3-Venus-CreERT2 R1 ES 細胞クローンおよび Ngn3-IRES-rtTA R1 ES 細胞クローンに関しても、*in vitro* 細胞培養および分化誘導実験等に利用することが可能であり、研究試料として有用であると考ええる。

(2)長期 3 次元タイムラプスイメージング法を用いた発生期膵臓の細胞系譜追跡実験

Ngn3 に代わり、膵島の内分泌前駆細胞を標識するため、Sox9-CreERT2 ノックインマウスを用いることとした。Sox9 は、膵臓発生初期段階では、未分化な膵前駆細胞に発現することが知られており、その後、Ngn3 陽性となった内分泌前駆細胞では、その発現量が低下することが既に報告されている。そのため、Ngn3 をマーカーとして利用した場合と異なり、Sox9-CreERT2 マウスでは、膵臓の膵島を構成する内分泌細胞だけでなく、腺房を構成する外分泌細胞並びに膵管も標識されることが予想された。また、内分泌細胞への分化過程において Sox9 の発現量は低下する一方、Sox9 の発現量が維持された細胞は、膵管細胞分化に傾倒することが知られている。

以上を踏まえ、Sox9-CreERT2; Rosa26-rainbow マウスを用いて、多色細胞系譜追跡実験を実施した。当該マウスでは、タモキシフェン投与により誘導的に Cre-loxP システムが働き、元来緑色蛍光を呈していた Sox9 陽性細胞が、青・橙・赤色のいずれかの蛍光色に特異的に標識される。本特徴を利用して、E12.5 膵臓原基の *ex vivo* 培養において、Sox9 陽性膵前駆細胞を標識するため、培地中に添加するタモキシフェンの濃度および誘導開始時期に関する条件検討を行った。通常では、タモキシフェン投与 24 時間後に目的細胞が標識されと考えられている。これを受け、内分泌前駆細胞が原始膵管から離層を開始するタイミングが E15.5 頃と報告されていることから、その 24 時間以上前の E13.5 ないし E14.5 の発生段階において、培地中に 40 ng/ml タモキシフェンを 16 時間添加した結果、高頻度で腺房細胞が多色にて標識されることを確認した。その一方で、膵島形成に寄与する細胞への標識頻度は低い傾向が認められた。そこで、Sox9 陽性膵前駆細胞を効率的に標識するため、より早期の E10.5 および E12.5 の発生段階におけるタモキシフェン誘導実験を試みることにした。

E10.5 で標識する場合、妊娠中の母体マウス体重 40 mg あたり 3 ないし 6 mg/ml タモキシフェンを腹腔内投与した後、同様に E12.5 膵臓原基の *ex vivo* 培養を実施した。その結果、膵臓組織全体において高頻度での標識が認められた。しかしながら、タモキシフェンは妊娠継続に悪影響を及ぼすことが知られており、正常発生したマウス胎仔サンプルを安定的に準備することが困難なため、再現性に乏しかった。そこで、E12.5 膵臓原基の *ex vivo* 培養開始当日に 40 ないし 100 ng/ml タモキシフェンを 16 時間添加したところ、E18.5 の発生段階の膵島において適度に標識された細胞の存在が確認できた。

本研究では、Sox9-CreERT2; Rosa26-rainbow マウス由来 E12.5 膵臓原基の *ex vivo* 培養細胞を材料として用い、Sox9 陽性膵前駆細胞を多色にて標識した後、膵島が形成される過程を E14.5 から E18.5 までの 4 日間 (96 時間) という長期間の 3 次元タイムラプスイメージングを実施した。これにより、Sox9 陽性膵前駆細胞の細胞系譜 (増殖・分裂・移動・分化・集合といった生命現象) をリアルタイムで撮影し、追跡することに成功した。長期 3 次元タイムラプスイメージング法は、生体サンプルへの露光時間が非常に長くなるため、一般的には細胞毒性および蛍光褪色等の問題点が懸念され、技術的に困難とされて来た実験手法である。しかしながら、本研究課題では、rainbow マウス由来サンプルを効率的に観察するために最適化した高感度共焦点顕微鏡システムを使用し、緻密に条件検討を重ねることにより、これらの問題の克服に成功し、長期 3 次元タイムラプスイメージングを実施しながらも、*in vitro* において膵臓発生および膵島形成を忠実に再現し、良好な結果を得ることができた。以上のことから、本研究によって得られた実験データは貴重かつ有用であり、現在、細胞の遷移様式に関して詳細な解析が進行中であることから、今後の展望として新たな知見が得られる可能性が高いものと考ええる。

(3) 免疫組織染色による膵臓の内分泌細胞への分化確認実験

Sox9-CreERT2; Rosa26-rainbow マウス由来 E12.5 膵臓原基の *ex vivo* 培養細胞の長期 3 次元タイムラプスイメージング終了後、E18.5 の発生段階における膵島への発生状態を確認するため、各種抗体を用いて免疫組織染色を施した後、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。その結果、E18.5 膵臓組織において、グルカゴン陽性 α 細胞、インスリン陽性 β 細胞およびソマトスタチン陽性 δ 細胞の少なくとも 3 種類の内分泌細胞の存在が認められことから、良好な細胞分化が確認できた。成体組織に比べ膵島形成が未発達な段階であることから、これらの内分泌細胞が集合した小型の膵島が認められた他、分散ないし集合過程の細胞塊が認められた。さらに、膵島が青・赤・橙色の多色で構成され、それらがグルカゴン陽性 α 細胞ないしインスリン陽性 β 細胞であることを確認した。また、同一膵島内に異なる色で標識された β 細胞が認められた。これらのことから、複数の Sox9 陽性膵前駆細胞が移動および分化することによって、膵島形成に寄与したことが示唆された。一方、ソマトスタチン陽性 δ 細胞に関しては、内分泌細胞分化において後期に出現する細胞であることと相関して、 α 細胞および β 細胞と比較して、非常に細胞数が少なかった。

本研究により、少なくとも 3 個以上の Sox9 陽性膵前駆細胞を起源として、膵島が形成されることが直接的に示された。今後、長期 3 次元タイムラプスイメージングによって取得した画像データと照合し、Sox9 陽性膵前駆細胞の詳細な動態解析を行うことで、原始膵管から個々の細胞がどのように増殖・移動・分化して膵島が形成されるのか、その分子機構を解明するための有用な手掛かりが得られるものと考ええる。

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〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----