

令和元年6月16日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09766

研究課題名(和文) 周辺環境による膵細胞新生誘導機構の解明

研究課題名(英文) Uncovering beta-cell neogenesis induced by its surrounding niche

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵内分泌前駆細胞から分化したばかりの新生細胞を標識するためのレポーターマウス“new Insulin-Timer”を用いて、細胞が生まれる仕組みを解析した。胎生期膵臓を顕微鏡で観察した結果、新生細胞は膵管近傍で生まれる“duct細胞”と、血管近傍で生まれる“vessel細胞”の2つに分類され、遺伝子発現パターンも異なることが明らかとなった。

次に新生細胞の遺伝子発現プロファイルを1細胞レベルで解析した結果(scRNA-seq)、新生細胞は5つのクラスターに細分化されることが示された。

これらの知見が糖尿病根治を目指した細胞再生医療に応用されることを期待したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たに開発したレポーターマウスを用いて生まれたばかり細胞を標識しながら蛍光イメージングを行った結果、従来から考えられてきた膵管近傍で生まれる“duct細胞”以外に、血管近傍で生まれる“vessel細胞”が存在し、遺伝子発現パターンも異なることが明らかとなった。さらに新生細胞の遺伝子発現プロファイルを1細胞レベルで解析した結果、新生細胞は5つのクラスターに細分化されることが示された。

これらの知見が糖尿病根治を目指した細胞再生医療に応用されることを期待したい。

研究成果の概要(英文)： We developed the novel mouse model “Ins1-eGFP; Timer” that provides spatiotemporal information of newly generated cells.

Fluorescent imaging revealed that some newborn cells are detected close to the pancreatic ducts (duct cells), and unexpectedly, all the other newborn cells were observed away from the ductal structures and were adjacent to blood vessels (vessel cells) and pre-existing islets. More duct cells expressed Mafk, whereas more vessel cells expressed Mafg, showing distinct characteristics of two cell types of newborn cells. Furthermore, single-cell RNA sequencing also confirmed transcriptional heterogeneity of newborn cells.

Collectively, both histological imaging and single-cell transcriptome analysis demonstrated spatial and transcriptional heterogeneity of β -cell neogenesis during development, which will lead to a better understanding of β -cell neogenesis for future cell therapy.

研究分野：糖尿病再生医療

キーワード：細胞 シングルセルトランスクリプトーム解析 トランスクリプトーム解析 蛍光イメージング 糖尿病再生医療

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

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は膵細胞からのインスリン分泌が低下あるいは枯渇することに起因する慢性の高血糖を本態とする代謝疾患である。よって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り、iPS細胞や組織幹細胞等の非膵細胞から膵細胞への分化誘導を促す再生医療が注目されている。我々を含むいくつかのグループは、非膵細胞からインスリン産生細胞を作製することに成功しているが、内在する膵細胞と同程度のブドウ糖応答性インスリン分泌能を安定して再現することは困難であり、また細胞誘導効率も不十分である。これらの課題を解決するためには生体内で膵臓が形成され細胞が分化する過程をより詳細に解析し、「膵細胞がいつ、どのような環境の下で形成されるのか?」という根源的な問題をより深く理解することが必要と考えられる。

我々は胎生膵から成体膵細胞に至るまでの発生・分化過程に焦点を当てて研究を行う中で、内分泌前駆細胞の特性を解析するとともに(Miyatsuka T et al. Proc Natl Acad Sci USA 108: 185-190, 2011)、膵内分泌細胞分化の最終局面である膵細胞の新生・成熟機構を時間軸に沿って解析するための“*Insulin(Ins1)-Timer* マウス(第1世代)”を作製した(Miyatsuka T et al. Diabetes 63: 3388-3393, 2014)。

上記 *Ins1-Timer* マウスは高い時間分解能で新生膵細胞を単離するのに適した実験モデルではあるが、*Timer* 蛍光蛋白質(DsRed-E5)の緑色蛍光の intensity は弱いため、蛍光顕微鏡下に緑色蛍光細胞 = 新生膵細胞を観察することができず、「新生膵細胞がどこで生まれ、どのように移動して膵島を形作るのか?」を知るための位置情報を得ることができなかった。

最近我々は *Ins1-Timer* マウスの空間分解能を改善するため、eGFP 由来の緑色蛍光蛋白質と *Timer* 蛍光蛋白質(DsRed-E5)の蛍光特性の違いを利用することを着想し、*Ins1-GFP; Ins1-Timer* double transgenic mouse を作製した(以後 *Ins1-GFP; Timer* マウスと呼ぶ)。このマウスでは内分泌前駆細胞から生まれたばかりの膵細胞を eGFP 由来の明るい緑色蛍光で標識することにより、蛍光顕微鏡下で新生膵細胞を観察することができる(即ち新生膵細胞の位置情報を得ることができる)。予備実験の結果、膵細胞の中には膵管に近接して生まれる“duct細胞”と、血管に近接して生まれる“vessel細胞”の2種類が存在することが示唆された。本研究では予備実験の再現性を確認しながら、「内分泌前駆細胞が膵細胞へと分化する場所はどこか?(どのような niche が影響を与えるのか?)」を明らかにするとともに、新生膵細胞の heterogeneity を1細胞レベルで解析することにより、膵細胞新生の背景にある遺伝子発現プロファイルの dynamics を明らかにする。

2. 研究の目的

上記 *Ins1-GFP; Timer* マウスを用いて新生膵細胞を高時間分解能で標識し、周辺組織との位置関係を解析することにより、duct細胞と vessel細胞が生まれる niche の特徴に迫る。また single-cell RNA-sequencing を通して、新生膵細胞間の heterogeneity を1細胞レベルで unbiased に解析することにより、duct細胞と vessel細胞間の類似性および相違性を明らかにする。さらに成体マウスにおいて膵細胞新生を誘導し、胎生期膵臓で起こる生理的な膵細胞分化と誘導性膵細胞新生との類似性・相違性を解析する。

上記解析により得られた知見を糖尿病再生医療に応用することにより、機能的な膵細胞を高い効率で作製する方法を開発することにつなげたい。

3. 研究の方法

3-(1) 新生膵細胞の位置情報

Ins1-GFP マウスと *Ins1-Timer* マウスとを交配することにより、*Ins1-GFP; Ins1-Timer* double transgenic マウス (*Ins1-GFP; Timer* マウス) を作製した。胎生 14.5 日から生後 0 日の *Ins1-GFP; Timer* マウスより膵臓を摘出、凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて新生膵細胞(緑色蛍光細胞)と周辺環境(膵管・血管他)との相対的位置関係を解析した。膵管、血管系を標識するために、それぞれ DBA-lectin、抗 PECAM-1 抗体を用いて免疫組織染色を行った。膵内分泌ホルモン (Insulin, Glucagon, Somatostatin 等) および膵臓特異的転写因子 (Pdx1, Mafa, Mafb, Neurog3 等) に対する免疫組織染色を行い、duct細胞と vessel細胞の類似性と相違性を解析した。

3-(2) single-cell RNA sequencing による新生膵細胞の heterogeneity

胎生 16.5 日の *Ins1-GFP; Timer* マウスより膵臓を摘出し、トリプシン処理後に FACS を行い、緑色蛍光優位な“新生膵細胞”と緑色蛍光・赤色蛍光共陽性の“より分化した膵細胞”を区別しながら単離した。Chromium システム (OX Genomics 社) を用いて FACS 後サンプルの cDNA ライブラリを1細胞レベルで作製し、HiSeq システム (イルミナ社) を用いて single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) を行った。得られた scRNA-seq データをもとに t-SNE プロットを作成することにより、新生膵細胞間の heterogeneity を1細胞レベルで解析した。さらに pseudotime 解析を行い、擬似的に設定した時間軸を用いて新生膵細胞の遺伝子発現プロファイルの経時的变化を1細胞レベルで解析した。scRNA-seq で同定された新規遺伝子の時空間的発現パターンを観察するため、胎生期、新生児期および成体マウス膵臓より作製した組織切片を用いて標的遺伝子に対する免疫組織染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

Ins1-GFP; Timer マウスにおいて緑色蛍光・赤色蛍光共陽性の“より分化した細胞”に関しても scRNA-seq を行い、t-SNE プロットを作成することにより細胞分化・成熟過程における heterogeneity を 1 細胞レベルで解析した。さらに pseudotime 解析を行うことにより、細胞分化・成熟過程における遺伝子発現プロファイルの経時的変化を unbiased に解析した。

3-(3) 成体マウスにおける細胞新生過程の観察

成体 *Ins1-GFP; Timer* マウスに GLP-1 受容体作動薬およびガストリンを投与することにより細胞新生を誘導し (Sasaki S, Miyatsuka T et al. Diabetologia 2015)、2 週間経過後膵切片を作製した。DBA-lectin、抗 PECAM-1 抗体を用いた免疫組織染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて周辺組織との位置関係を解析することにより、新生細胞がどのような niche の下で生まれるのか観察した。

4. 研究成果

4-(1) 新生細胞の位置情報

Ins1-GFP; Timer マウス胎生期膵臓(胎生 14 日~18 日)を摘出、凍結切片を作製し、抗 Mafa 抗体、抗 Mafb 抗体を用いた免疫染色を行った結果、80% 以上の vessel 細胞が Mafa 陽性であるのに対して、duct 細胞の Mafa 陽性率は 20% 以下であった。一方、Mafb 陽性の細胞数は duct 細胞で 90% 以上、vessel 細胞で 20% 以下であり、duct 細胞には Mafb 陽性細胞が、vessel 細胞には Mafa 陽性細胞が多く含まれることが明らかとなった。以上の結果は膵管近傍で生まれる vessel 細胞と血管近傍で生まれる vessel 細胞の間には膵臓特異的転写因子の発現パターンが大きく異なることを示している。

4-(2) single-cell RNA sequencing による新生細胞の heterogeneity

胎生 16.5 日の *Ins1-GFP; Timer* マウス胎生期膵臓より新生細胞を FACS により単離し、scRNA-seq を行った結果、1 細胞あたり 3603 遺伝子の mRNA 発現が同定されたが、この中に Mafa は含まれていなかった。一方、real-time PCR では新生細胞における Mafa mRNAs の発現が検出されていることから、この相違は scRNA-seq の検出感度によるものと考えられた。次に t-SNE プロットを用いて遺伝子プロファイルの差異を俯瞰した結果、新生細胞は高発現する遺伝子の特徴から、

Neurog3, Pax4 を高発現する“*Neurog3* 細胞”

somatomostatin (Sst) を高発現する“*Sst* 細胞”

glucagon (Gcg) を高発現する“*Gcg* 細胞”

Pdx1, Mafb を高発現する“*Pdx1* 細胞”

Ins2, Ins1 を高発現する“*Ins2* 細胞”

の 5 つに再分類され、そのうちの 1 つ *Pdx1* 細胞が Mafb を高発現しており、イメージング解析における duct 細胞に相当する可能性が示唆された。

さらに pseudotime 解析において擬似的に設定した時間軸に沿って、上記 5 つの細胞集団を unbiased に解析した結果、*Neurog3* 細胞から *Sst* 細胞へと分化した後、細胞系譜の特徴を有する *Gcg* 細胞と、*Pdx1, Ins2* といった細胞特異的遺伝子を高発現する *Pdx1* 細胞・*Ins2* 細胞へと別れて分化する可能性が示唆された。

次に“より分化した細胞”と新生細胞とを合わせて pseudotime 解析を行った結果、2 つの細胞は擬似的な時間軸に沿って 2 つの細胞集団に分けて展開された。このことは *Ins1-GFP; Timer* マウス胎生期膵臓より FACS で単離された新生細胞が、unbiased な pseudotime 解析においてもより未分化な細胞集団として同定されることを示しており、GFP と Timer 蛋白の蛍光特性の差を利用した本実験系の妥当性を異なる角度から示す結果となった。

4-(3) 成体マウスにおける細胞新生過程の観察

成体 *Ins1-GFP; Timer* マウスに GLP-1 受容体作動薬(exendin-4)およびガストリンを投与し、2 週間後に同マウスより膵臓を摘出、膵切片を作製、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、緑色蛍光優位な新生細胞が観察された。対照マウス(Vehicle 投与マウス)では新生細胞は全く検出されなかった。新生細胞は膵管近傍に観察されたことから、exendin-4 + ガストリンで誘導される新生細胞は胎生期 duct 細胞と同様に、膵管近傍の niche と何らかの相互作用がある可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Miura M, Miyatsuka T, Katahira T, Sasaki S, Suzuki L, Himuro M, Nishida Y, Fujitani Y, Matsuoka TA, Watada H: Suppression of STAT3 signaling promotes cellular reprogramming into insulin-producing cells induced by defined transcription factors. *EBioMedicine* 2018, 36: 358-366
Cigliola V, Ghila L, Thorel F, van Gurp L, Baronnier D, Oropeza D, Gupta S, Miyatsuka T, Kaneto H, Magnuson MA, Osipovich AB, Sander M, Wright CV, Thomas MK, Furuyama K, Chera S, Herrera PL: Pancreatic islet-autonomous insulin and smoothed-mediated signalling modulate identity changes of glucagon+ α -cells. *Nat Cell Biol* 2018, 20: 1267-1277

Matsuoka TA, Kawashima S, Miyatsuka T, Sasaki S, Shimo N, Katakami N, Kawamori D, Takebe S, Herrera PL, Kaneto H, Stein R, Shimomura I: Mafa enables Pdx1 to effectively convert pancreatic islet progenitors and committed islet α -cells into β -cells in vivo. *Diabetes* 2017, 66: 1293-1300

Fukunaka A, Fukada T, Bhin J, Suzuki L, Tsuzuki T, Takamine Y, Bin BH, Yoshihara T, Ichinoseki-Sekine N, Naito H, Miyatsuka T, Takamiya S, Sasaki T, Inagaki T, Kitamura T, Kajimura S, Watada H, Fujitani Y: Zinc transporter ZIP13 suppresses beige adipocyte biogenesis and energy expenditure by regulating C/EBP-beta expression. *PLoS Genet* 13: e1006950, 2017

Yamaguchi H, Arakawa S, Kanaseki T, Miyatsuka T, Fujitani Y, Watada H, Tsujimoto Y, Shimizu S: Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals. *EMBO J* 35: 1991-2007, 2016

[学会発表](計15件)

Miyatsuka T: Deciphering the heterogeneity of pancreatic beta cells during development.

Asia Islet Biology and Incretin Symposium (AIBIS) 2018, Seoul, 2018

Sasaki S, Miyatsuka T, Matsuoka T, Fujitani Y, Watada H, Shimomura I: Novel spatiotemporal imaging reveals two distinct pathways of β -cell neogenesis.

American Diabetes Association's 77th Scientific Sessions, San Diego, 2017

Miura M, Miyatsuka T, Matsuoka T, Sasaki S, Fujitani Y, Watada H: Inhibition of Stat3 signal promotes acinar-to-beta reprogramming.

American Diabetes Association's 76th Scientific Sessions, New Orleans, 2016

[図書](計9件)

宮塚 健, 佐々木周伍: 膵 細胞再生研究の最前線. *糖尿病* 61: 474-476, 2018

佐々木周伍, 宮塚 健: 膵外分泌細胞から膵 細胞への transdifferentiation. *内分泌・糖尿病・代謝内科* 44: 148-152, 2017

宮塚 健: 膵 細胞の発生・分化機構. *日本臨牀* 74: 51-56, 2016

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 佐々木周伍

ローマ字氏名: SASAKI, shugo

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。