

平成30年6月7日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15490

研究課題名(和文) 糖尿病の病態解明に向けた膵細胞新生・成熟機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of pancreatic alpha cell neogenesis and maturation

研究代表者

綿田 裕孝 (Watada, Hirotaka)

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の対策には、その病態解明が不可欠である。以前から、糖尿病は膵細胞不全がその病態の根本の一つであるが、近年グルカゴン産生膵細胞の質的、量的異常もその病態に深く関わる事が明らかとなっている。しかし、膵細胞研究に比し、膵細胞の研究は大きく後れを取っており、今後膵細胞生物学を発展させる必要がある。本研究はその第一段階として、膵細胞新生を観察し、新生膵細胞の単離を可能とするGlucagon-Timerマウスを作製した。そして、実際に、新生膵細胞を観察できること。その細胞を単離し遺伝子発現プロファイルを解析することに成功した。今後の膵細胞生物学発展に貢献する成果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The number of patients with diabetes is still increasing. Therefore, we should establish strategies to solve diabetes-related problems. In addition to pancreatic beta cell abnormality, recently, the abnormality of glucagon producing- alpha cell quality and quantity are also involved in the central pathophysiology of diabetes mellitus, however, there have been less studies regarding alpha cell abnormality compared with beta cell abnormality. As a first step to promote alpha cell biology, here, we tried to establish Glucagon-Timer mice in which a protein, DsRed-E5 (Fluorescent Timer), bound with glucagon promoter shifts its fluorescence spectrum over time. In this mouse, we could observe newly generated alpha cells and isolate those cells and analyzed the gene expression profiles in newly generated alpha cells and mature alpha cells. This mouse will contribute to find the new strategy for diabetes mellitus by revealing alpha cell biology and pathophysiology in future.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病 膵島 グルカゴン 膵細胞 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

糖尿病はインスリン作用不足に基づく代謝疾患であり、全世界で4億2千万人が罹患しており、年間600万人が糖尿病で死亡していることが知られている。その対策には、糖尿病の病態解明とそれに基づく新規治療法の開発が不可欠である。以前から、糖尿病では、膵細胞の質的、量的異常に基づく膵細胞不全がその病態の根本の一つであることが知られていたが、近年のGLP-1関連製剤の登場にも助けられ、グルカゴン産生膵細胞の質的、量的異常もその病態に深く関わる事が明らかとなってきた。しかし、膵細胞研究に比し、膵細胞の研究は大きく後れを取っており、今後膵細胞生物学の発展が望まれる。

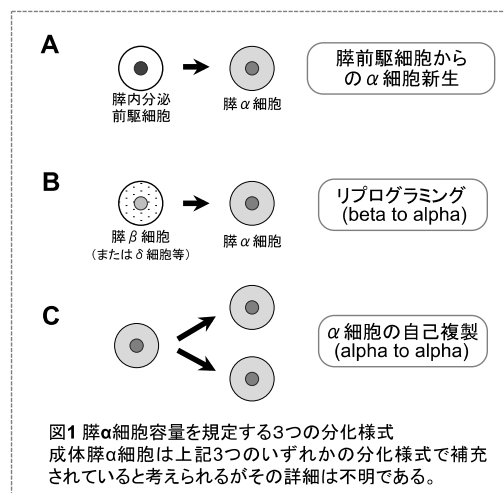
そのようななか、膵細胞の運命という点から、概念の変革が起きつつある。以前は、膵細胞は、胎生期に存在する膵内分泌前駆細胞から分化し、ホルモン産生細胞として終末分化を遂げた後は分化転換しないと考えられてきた。しかし、最近になり、糖尿病をはじめとする代謝ストレス下においては、膵細胞の脱分化と、それに続く細胞へのリプログラミングが細胞容積低下の主因であることが報告された(Talchai C et al. Cell. 2012;150:1223)。さらには、細胞はある種の条件下で、細胞へと分化転換することも明らかにされている(Thorel F et al. Nature 2010;464:1149)。**これらの知見は、膵内分泌細胞が以前考えられていた以上に可塑性のある細胞集団であることを示している。よって膵内分泌細胞の reprogramming 動態およびその分子機構を解明し、細胞、細胞の容積制御機構への関与を明らかにすることができれば、糖尿病の病態解明、そして新たな治療戦略に繋がる可能性がある。**

我々は以前より、膵細胞分化、増殖、細胞死の制御機構の解明を目的として、研究を続けてきた(Shigihara N et al. J Clin Invest. 2014. Kim H. et al. Nat Med. 2010. Ebato C et al. Cell Metab. 2008. Ogiwara T. et al. J Biol Chem. 2003. etc.)。その一環として、“Timer-reporter マウス”を作製し、膵内分泌細胞の新生・成熟過程を時間軸に沿って解析する実験系の確立に成功した(Miyatsuka T et al. Diabetes 2009)。

Timer とは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)” のことを指す。Fluorescent Timer 蛋白は時間経過とともにその蛍光波長を変化させ (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. PNAS 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、新生細胞が内分泌前駆細胞様の特性を持つことを見出している。最近では、さらに、細胞新生機構の解明に応用することにより従来では知り得なかったいくつかの新知見を得ることができている (Miyatsuka T, Watada H et al. Diabetes 2014, Sasaki S, Miyatsuka T, Watada H et al. Diabetologia 2015)。

2. 研究の目的

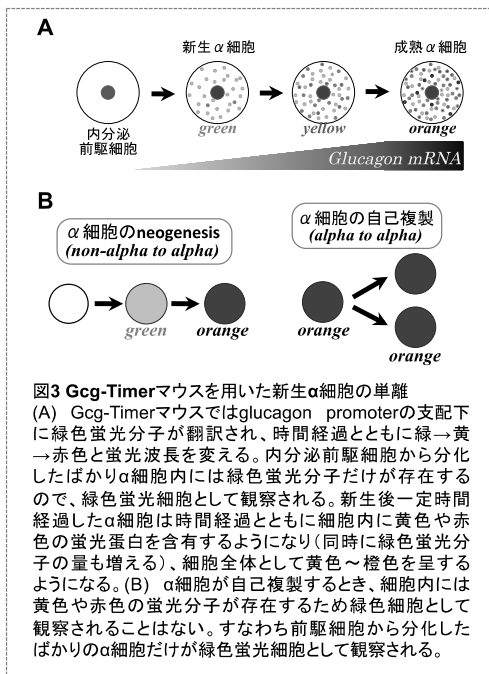
以上の背景を鑑み、本研究では膵細胞に Timer 蛋白を発現するマウスを作製し、内分泌前駆細胞からの細胞新生(図 1A)や、細胞、細胞からの細胞への分化転換(図 1B)を細胞の自己複製(図 1C)と明確に区別し、それぞれの動態を解明する。また、新生膵細胞を単離し、その発現遺伝子プロファイルを調べ、膵細胞新生の分子機構の解明に迫ることを目的とした。



3. 研究の方法

Gcg-eGFP-IRES-mRFP ノックインマウスの作製

eGFP-IRES-mRFP のコンストラクトを作製、これを CRISPR-Cas9 システムを用いて Glucagon 遺伝子座に挿入し、Gcg-eGFP-IRES-mRFP ノックインマウスを作製した。本マウスが新生膵細胞と成熟細胞を鑑別できる原理に関して、図3に示している。本図が示す通り、この遺伝子が思った通りの細胞に発現すれば、マウスの膵臓で、緑色蛍光を示す細胞は新生膵細胞であり、緑色と赤色蛍光を示す細胞は成熟細胞と考えられる。



Flow cytometry を用いた新生細胞数の定量化

Gcg-Timer マウスの胎仔、新生仔および成体より膵臓を摘出し、BD FACSVerser™ flow cytometer を用いて緑色蛍光細胞数 (= 新生細胞数) および黄色～橙色蛍光細胞数 (より分化した細胞の数) を定量化する。本法により、胎生期のどの段階で、膵細胞の新生が起きているのか、また、成体膵で膵細胞新生が起きているのか、その動態が明らかになる。

蛍光顕微鏡を用いた新生細胞の spatio-temporal pattern 解析

Gcg-Timer マウスの胎仔、新生仔および成体より膵臓を摘出し、PFA 固定後、凍結切片を作製する。その検体を蛍光顕微鏡で観察し新生細胞が局在する場所を同定する。

細胞系譜における経時的トランスクリプトーム解析

膵細胞数が加速度的に増加する胎生後期の Gcg-Timer マウス胎仔より膵臓を摘出し、FACS により新生細胞 (緑色蛍光細胞) および成熟細胞 (黄色～橙色蛍光細胞) を単離する (図3)。各細胞分画より RNA を抽出し、cDNA を合成する。FACS 後に回収される細胞数は少ないことが予想されるので、数匹の embryos を一つにまとめ、さらに Nugen 社の RNA amplification kit を用いて RNA を増幅した後に cDNA を合成する。この RNA 増幅法を用いることで膵内分泌細胞中の RNA を linear amplification 可能であることを以前確認している (Miyatsuka T, Watada H et al. Diabetes 2014)。その後 TaqMan RT-PCR array および microarray を用いて膵臓特異的遺伝子の発現量を定量することにより、胎生期膵臓における細胞新生・成熟過程を規定する遺伝子群を抽出することを目指した。

4. 研究成果

Gcg-eGFP-IRES-mRFP ノックインマウスの作製

作製したマウスが我々が想定したように新生細胞をラベルできるかどうかに関してまず検討を行った。まず、胎生 (e)13.5, 15.5, 17.5 日目の Gcg-Timer マウスから膵臓を単離し、緑色陽性の細胞、緑色、赤色両陽性の細胞を観察した。その結果、下記の図4に示すように e13.5～e17.5 にかけて、赤色蛍光を呈さない緑色蛍光を呈する細胞がいくつか認められた。この結果から、目的通り、新生細胞を検出できるマウスが作製できていることが示唆された。

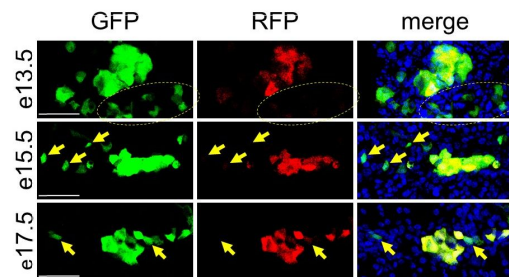


図4 Gcg-Timer マウスにおける胎生膵の蛍光観察

矢印で示した細胞は緑色蛍光単独陽性であり新生膵細胞と考えられる。緑色、赤色両陽性細胞は成熟細胞と考えられる。

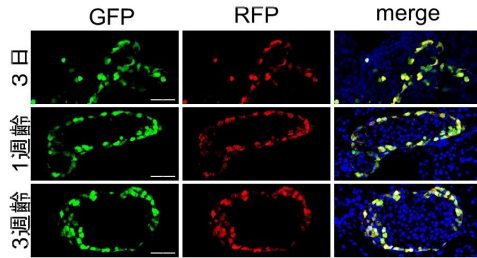


図5 Gcg-Timer マウスにおける生後膵の蛍光観察

緑色蛍光単独陽性は認められず、すべての蛍光陽性細胞は緑色、赤色両陽性細胞は成熟細胞と考えられる。

そこで、次に出生後のマウスから膵臓を単離して蛍光陽性の細胞を観察した。その結果、図5に示す通り、生後の膵には緑色単独陽性の細胞の存在は認められなかった。

Flow cytometry を用いた新生細胞数の定量化

Gcg-Timer マウスに胎生膵において緑色蛍光のみを呈する細胞を認めため、次に、その細胞数を FACS を用いて定量評価することとした。その結果、図6に示すように緑色単独陽性細胞は膵細胞と異なり出生直後が最も高い値となることが分かり、膵細胞と膵細胞で新生の peak となる時期が完全に異なることが明らかとなった。

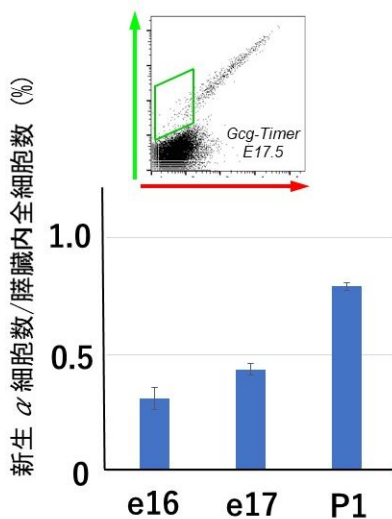


図6 各週齢における新生膵細胞の割合

蛍光顕微鏡を用いた新生細胞の spatio-temporal pattern 解析

Gcg-Timer マウスの胎仔、新生仔および成体より膵臓を摘出し、PFA 固定後、凍結切片を作製する。その検体を蛍光顕微鏡で観察したが、膵内の特別な領域に新生細胞が認められるというような傾向は認められなかった。

細胞系譜における経時的トランスクリプトーム解析

e17.5 の膵臓を単離して、FACS にて緑色単独陽性細胞と緑色、赤色両陽性細胞とに分けてそれぞれの細胞における遺伝子発現を比較した。図7に緑色細胞、緑色、赤色両陽性細胞の発現遺伝子量に関する heat map を示す。この図に示されるように、緑色細胞と緑色赤色両陽性細胞では発現遺伝子が類似している部分もあるが、明らかに異なる部分もあり、これらの細胞が類似しながらも異なる細胞であることが分かり、また、この結果は新生細胞から成熟細胞へ分子している過程を観察しているという作業仮説に合うことが明らかとなった。

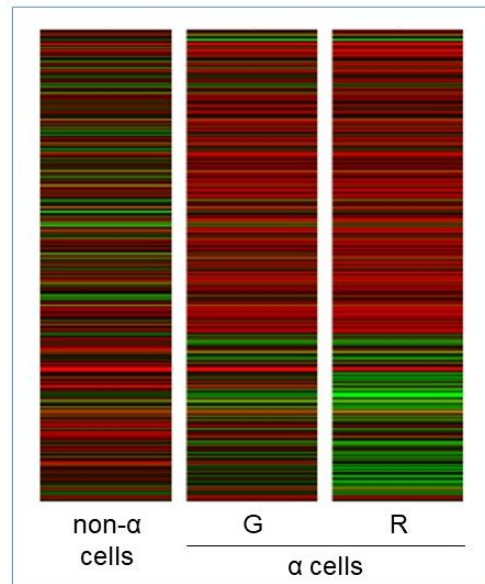


図7 e17.5 の膵臓から細胞を単離し、緑色単独陽性 (G), 緑色、赤色両陽性細胞 (G), 蛍光 (-) 細胞に分け、それぞれの細胞における遺伝子発現量を heatmap で表示した。

次に、それぞれの細胞に発現している遺伝子に関して Gene Ontology 解析を行った。その結果、新生細胞においては cell adhesion, multicellular organism development,

positive regulation of cell migration, negative regulation of cell proliferation に関する遺伝子発現の増加を認めた。また、成熟細胞においては exocytosis, response to insulin に関する遺伝子発現の増加を認めた。これらのデータは新生細胞が成熟細胞へと分化している過程の遺伝子発現が観察できていることと矛盾しないデータであった。

今後、これらの遺伝子解析をすすめ、新生細胞がどのようなシグナルで成熟化していくのかに関して検討を進めるとともに、今回作製したマウスは明らかに新生細胞をモニターできていると考えられるので、糖尿病状態における分化転換の過程における新生細胞の単離を目指し、糖尿病の病態の解明に貢献したいと考えている。

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)

[学会発表](計 1 件)

1) 氷室美和, 宮塚健, 鈴木路可, 三浦正樹, 片平雄大, 高橋雅也, 大島茂, 岡本隆一, 綿田裕孝「糖尿病の病態解明に向けた膵細胞新生・成熟機構の解明」第 32 回日本糖尿病学会・肥満動物学会, 愛知県(日本), 2018.2.23-24(2018.2.23), 口演

[その他]

ホームページ等

https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/taisya_naibunpitsu/

6. 研究組織

(1)研究代表者

綿田裕孝 (WATADA, Hirotaka)
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