

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19694

研究課題名（和文）生体内でのダイレクト・リプログラミング法の開発

研究課題名（英文）Development of In vivo direct reprogramming

研究代表者

大石 久史（Oishi, Hisashi）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・教授

研究者番号：30375513

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病は、インスリンの絶対的・相対的不足により、生体内でグルコースが効率良く利用出来なくなることが病態の本質である。本研究では、膵細胞を再生するための新たな細胞のソースとして、肝細胞に着目し、in vivoでダイレクトにインスリン産生を誘導する方法の開発を行った。その結果、従来明らかにされていたPdx1、NeuroD、MafA遺伝子に加え、Isl1遺伝子を共発現することで、より強力にインスリン遺伝子発現を誘導することができた。また、レスベラトロール配糖体であるポリダチンが、酸化ストレスによる細胞死に対して、抑制効果を有することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、2つの学術的、社会的意義を有している。1点目は、in vivoでダイレクトにヒト肝臓細胞から細胞への転換可能性を示した点である。特に、網羅的遺伝子発現解析からIsl1遺伝子が強力な転換誘導因子として同定できたことは、高い学術的意義を有する。2点目は、レスベラトロール配糖体であるポリダチンが酸化ストレスに伴う細胞死に対して、抑制効果を持つことを明らかにした点である。ポリダチンは、単独で細胞死を抑制し、糖尿病モデルに対する血糖改善作用を示したが、今後、再生された細胞を保護する可能性を検討することで、将来の再生医療における利用可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The key pathogenesis of diabetes is that glucose cannot be used efficiently in the body due to the absolute and relative deficiency of insulin. In this study, we focused on hepatocytes as a new cell source for regenerating pancreatic cells, and developed a method for directly inducing insulin production in vivo. We are able to induce insulin gene expression more strongly by co-expressing the Isl1 gene in addition to the previously clarified Pdx1, NeuroD, and MafA genes. It is also cleared that polydatine, which is a resveratrol glycoside, has an inhibitory effect on cell death due to oxidative stress.

研究分野：実験動物学

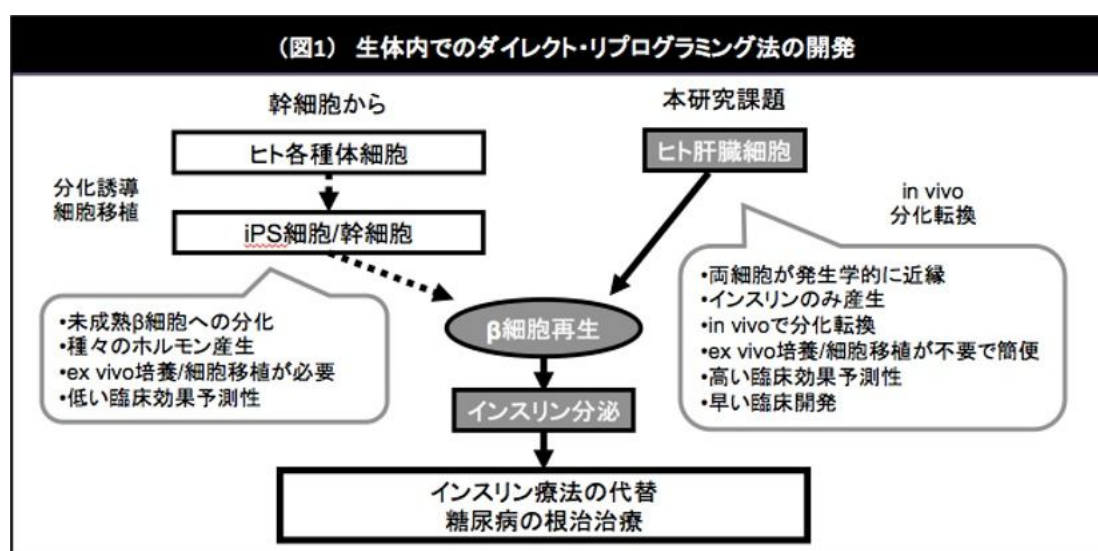
キーワード：インシュリン 糖尿病 再生医療 リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、インスリンの絶対的・相対的不足により、生体内でグルコースが効率良く利用出来なくなることが病態の本質である。平成 23 年度の国民健康・栄養調査によると、糖尿病が強く疑われる人は、全人口の男性で 15.7%、女性で 8.7%にのぼっており、2000 万人以上の国民が糖尿病を疑われる深刻な事態となっている。新たな治療戦略の構築のため、インスリン産生細胞である膵細胞の発生・分化のメカニズムや、細胞機能不全時の細胞状態を解析することは、重要な研究課題の一つであった。

膵細胞の再生に関して、図 1 に、iPS 細胞を始めとする幹細胞からの細胞誘導の問題点と、本研究提案である生体内で肝臓細胞から直接細胞を誘導する利点についてまとめた(図 1)。幹細胞から機能的に成熟した細胞への分化させるためには、非常に長い培養時間を必要とし、またインスリンのみならず他のホルモンも同時に産生してしまうことが多いことが明らかとなっていた。

以上のことから、膵細胞を再生するための新たな細胞のソースが求められており、さまざまな分化細胞からのインスリン産生を直接に誘導する方法が提案されていた。



2. 研究の目的

本研究では、MafA 遺伝子を始めとする細胞関連転写因子群をマウスに発現させることにより、*in vivo* で肝臓細胞にダイレクト・リプログラミング(直接変換)を誘導することを目的とした。さらに、転換因子の網羅的スクリーニングを行って、不可逆的かつ効果的なダイレクト・リプログラミングのプロトコルを作製し、肝臓由来の細胞が、本来の細胞と同じく、高血糖に反応してインスリンを適切に分泌することを明らかにした(グルコース応答性)。さらに、マウスに加え、ヒト細胞においても、生体内でのダイレクト・リプログラムの有効性を明らかにし、糖尿病の新たな治療方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

平成 29 年度からの 4 年間に、次の 4 項目を実施した。(1) インスリン転写を体外から非侵襲的にモニター可能なスクリーニング系の確立(2) スクリーニング系を応用した細胞変換因子の網羅的解析、さらに(3) ヒト臨床への橋渡しとして、マウス内にヒト肝臓細胞が生着したキメラマウスを使って、ヒト細胞のダイレクト・リプログラミング(4) レスベラトロール配糖体であるポリダチンの酸化ストレスによる細胞死に対する抑制効果検証の 4 点である。

(1) インスリン転写を体外から非侵襲的にモニター可能なスクリーニング系の確立

生体発光を用いて非侵襲的に繰り返し検出し、定量可能なスクリーニング系として、マウスインスリン遺伝子座を含む人工大腸菌染色体(BAC)のインスリン遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置換したレポーターマウスを作製した。このマウスに細胞関連転写因子である Pdx1、NeuroD、Ngn3、MafA、MafB の 5 つの遺伝子を、様々な組み合わせで遺伝子導入を行って、*in vivo* イメージングを行なって、スクリーニングできるか検討を行なった。

(2) スクリーニング系を応用した細胞変換因子の網羅的解析

簡易スクリーニングでは、Pdx1、NeuroD、MafA の 3 遺伝子の導入が、最も効果的にインスリン発現の誘導が可能であったが、このインスリン発現は一過性で、誘導後数週間で元の肝臓細胞に戻ってしまう。また、糖尿病治療に応用するためには、グルコース応答性と呼ばれる、高血糖に反応してインスリン分泌を行う必要があるものの、このグルコース応答性を認めない。この 2 つの問題点を克服し、更なる効率的なダイレクト・リプログラミングを誘導するために、細胞変換因子の網羅的解析を行った。すなわち、インスリンプロモーター下で GFP を発現するトランスジェニックマウス (MIP-GFP マウス) に対して、上記 3 遺伝子を導入し、GFP の発現を指標にして、本来の膵臓細胞と、肝内インスリン発現細胞を別々に単離し、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。さらに、両細胞の発現遺伝子の比較を行って、両者の違いを規定している遺伝子を同定した。

(3) ヒト肝臓細胞からのダイレクト・リプログラミング

マウス肝臓細胞をアポトーシス誘導後に、ヒト肝臓細胞を脾内注射することによって、マウス内にヒトの肝臓細胞が生着したキメラマウスを作製した。このキメラマウスに対して、Pdx1、NeuroD、MafA 転写因子を遺伝子導入し、ヒトインスリン遺伝子の発現誘導が可能か検討を行なった。

(4) ポリダチンの酸化ストレスによる細胞死に対する抑制効果検証

糖尿病糖尿病とその合併症の進行に関して、酸化ストレスが重要な役割を有することが報告されている。天然の植物化学物質であるポリダチンは、抗酸化ストレス作用を含む幅広い薬理作用を持っているが、膵臓に対する効果は明らかにされておらず、本実験では、ポリダチンの細胞死への抑制効果検証を行なった。特に、インビボおよびインビトロのモデルを使用して、膵β細胞の酸化ストレスに対するポリダチンの保護効果の検討を行った。

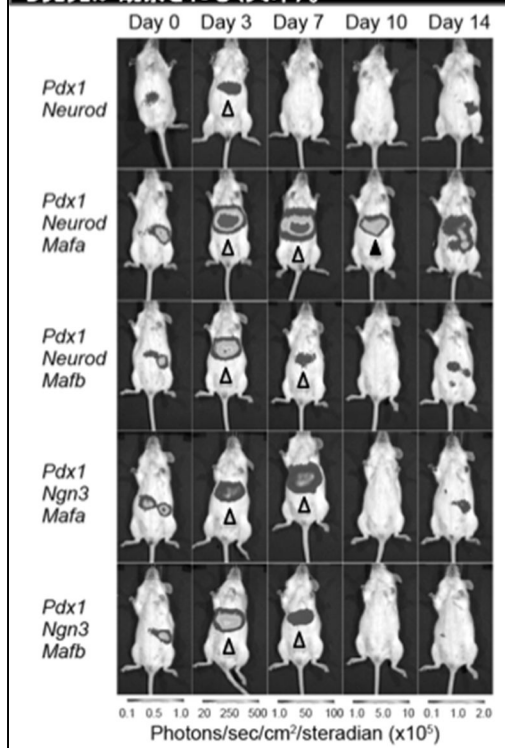
4. 研究成果

(1) インスリン転写を体外から非侵襲的にモニター可能なスクリーニング系を確立した。

生体発光を用いて非侵襲的に繰り返し検出し、定量可能なスクリーニング系として、マウスインスリン遺伝子座を含む人工大腸菌染色体 (BAC) のインスリン遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置換したレポーターマウス (MIP-Luc-BAC マウス) を作製した。実際に、このマウスに細胞関連転写因子である Pdx1、NeuroD、Ngn3、MafA、MafB の 5 つの遺伝子を、様々な組み合わせで遺伝子導入を行って、in vivo イメージングを行ったところ、いずれの組み合わせでも、マウス肝臓領域からの発光が観察され、体外から非侵襲で観察可能となった (図 2)。特に、Pdx1、NeuroD、MafA の 3 遺伝子の導入によって、強力にシグナルが観察され (2 段目)、実際、この 3 遺伝子による遺伝子導入が、最も強力にインスリン転写を誘導可能なことを確認し、スクリーニング系を確立した。

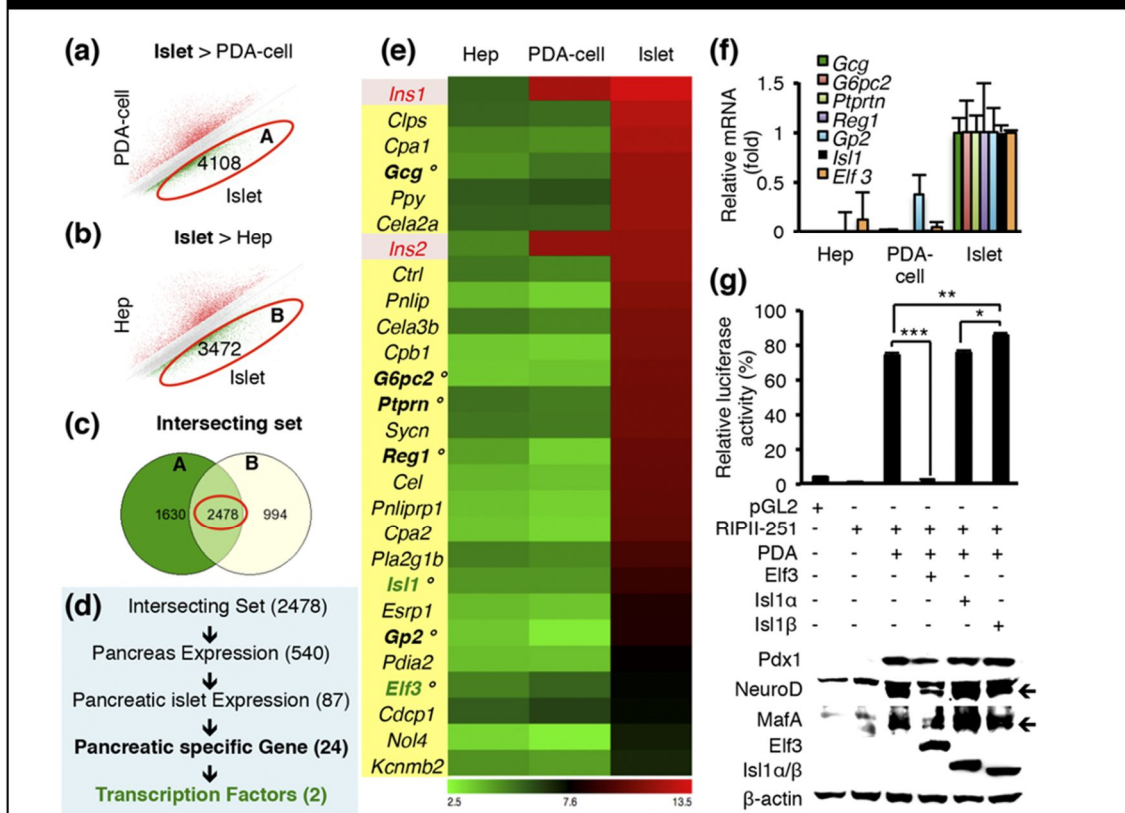
(2) スクリーニング系を応用した細胞変換因子の網羅的解析

(図2) 生物発光を用いた肝内インスリン転写のスクリーニング。遺伝子導入後、肝領域から発光が観察される(矢印)。

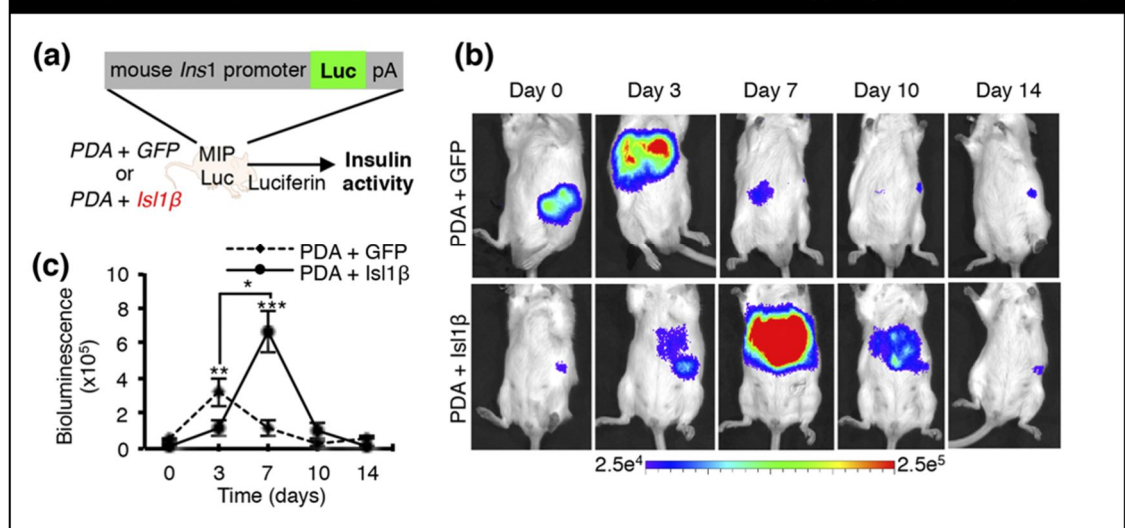


前述の簡易スクリーニングによって、Pdx1、NeuroD、MafA の 3 遺伝子の導入が、最も効果的に細胞誘導可能であったため、MIP-GFP マウスに対して、上記 3 遺伝子を導入し、GFP 陽性細胞群 (PDA-cell) と膵内分泌細胞、肝細胞の網羅的遺伝子発現比較を行なって、より効率的に細胞誘導可能な新規遺伝子として 2 つの転写因子を同定した。さらに、インスリンプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイによって、Isl1 が強力にインスリン転写を促進することを明らかにした (図 3)。さらに、Isl1 遺伝子を Pdx1、NeuroD、MafA の 3 遺伝子とともに、マウス個体に導入したところ、3 遺伝子のみと比較して、有意にインスリン発現量の増加が認められた

(図3) 新規のβリプログラミング因子としてIsl1遺伝子を同定した。



(図4) Isl1遺伝子は、肝臓からのインスリン発現誘導を促進する。

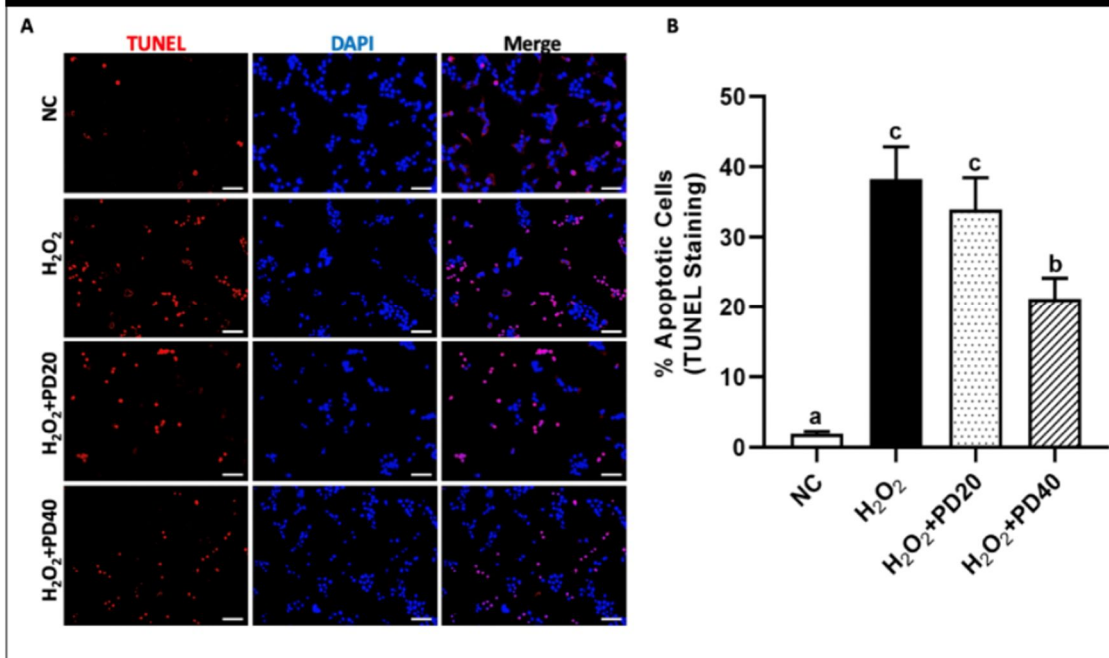


(3) ヒト肝臓細胞を持つキメラマウス 5 匹に対して、Pdx1、NeuroD、MafA の 3 遺伝子を導入したところ、1 匹でヒトインスリン遺伝子発現を認め、ヒト肝臓細胞でも、同様のストラテジーで糖尿病治療への応用可能性があることを見出した。

(4) ストレプトゾトシンによる糖尿病モデルラットに対して、ポリダチンを 28 日間経口投与したところ、投与群では、耐糖能異常、インスリン分泌、および脂質代謝が有意に改善した。ま

た、ポリダチンの存在下または非存在下で、インスリン産生 RINm5F 細胞を過酸化水素に曝露して、酸化ストレスを誘発したところ、ポリダチン添加により、細胞生存率の維持、ROS の蓄積減少、抗酸化抗アポトーシス作用の増強が認められた(図5)。これらの結果は、ポリダチンが、その抗酸化特性を通じて、酸化ストレスを軽減させベータ細胞機能を維持する可能性があることを示しており、ポリダチンは糖尿病患者のための新たな治療薬となる可能性が考えられた。

(図5)ポリダチンは、酸化ストレスによるβ細胞死を抑制する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Xiafukaiti G, Maimaiti S, Ogata K, Kuno A, Kudo T, Shawki HH, Oishi H, Takahashi S.	4. 巻 39
2. 論文標題 MafB Is Important for Pancreatic -Cell Maintenance under a MafA-Deficient Condition.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00080-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00080-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kato Megumi C., Jung Yunshin, Ugboma Chioma M., Shimbo Miki, Kuno Akihiro, Basha Walaa A., Kudo Takashi, Oishi Hisashi, Takahashi Satoru	4. 巻 38
2. 論文標題 MafB Is Critical for Glucagon Production and Secretion in Mouse Pancreatic Cells In Vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00504-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00504-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Jung Yunshin, Zhou Ruyi, Kato Toshiki, Usui Jeffrey K, Muratani Masafumi, Oishi Hisashi, Heck Margarete M S, Takahashi Satoru	4. 巻 159
2. 論文標題 Isl1 Overexpression With Key Cell Transcription Factors Enhances Glucose-Responsive Hepatic Insulin Production and Secretion	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 869 ~ 882
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2017-00663	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yousef Ahmed I., Shawki Hossam H., El-Shahawy Ahmed A., El-Twab Sanaa M. Abd, Abdel-Moneim Adel, Oishi Hisashi	4. 巻 133
2. 論文標題 Polydatin mitigates pancreatic -cell damage through its antioxidant activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111027 ~ 111027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2020.111027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大石久史、Yousef Ahmed I., Shawki Hossam H.
2. 発表標題 ポリダチンは抗酸化作用を介して膵β細胞障害を軽減させる
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋市立大学大学院医学研究科病態モデル医学 http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/animal.dir/dcem/index4.html

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
イギリス	エジンバラ大学			
エジプト	ベニ・スエズ大学			