

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08512

研究課題名(和文) 膵細胞への分化転換効率化に向けた試み

研究課題名(英文) A trial for efficient transdifferentiation toward pancreatic beta cells

研究代表者

松岡 孝昭 (Matsuoka, Takaaki)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10379258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Cre/loxPシステムを用いた非膵細胞へ複数の転写因子を発現誘導することでインスリン陽性細胞を作製し得るが、いまだ分化転換率は低い。分化転換に適した候補細胞を見出すため、MafA、Pdx1、Neurog3などの転写因子を組み合わせて発現誘導し、インスリン発現率や膵細胞特異的因子発現の有無などを確認した。また、内因性膵細胞をablationした後に誘導インスリン陽性細胞のグルコース応答性インスリン分泌能の有無を検討した。さらに、膵細胞分化過程での転写因子の発現パターンに倣い、Pdx1を先行発現させ、その後にNeurog3、MafAを発現し得る系の構築を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリン分泌の枯渇した糖尿病患者の根治のためには、膵細胞機能補完の必要があり、幹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、膵細胞様細胞への分化誘導が可能となっているがいまだ高率といえず、意図しない細胞への分化や未分化状態の維持なども認められる。一方、本研究のような転写因子の異所性発現によるin vivoでの膵細胞へのdirect reprogrammingは、体内環境の利用や膵細胞近縁細胞を母細胞とすることにより比較的効率的に膵細胞様細胞の作製が可能である。分子生物学的手法による膵細胞の作製という最終目標のため、さらなる効率化を目指した研究である。

研究成果の概要(英文)：It is possible to produce insulin-expressing cells in vivo by ectopic expression of transcription factors with Cre/loxP system. However, the efficiency of the reprogramming toward pancreatic β -cell is still insufficient. In order to explore the optimal cells for that direct reprogramming, we used several Cre mice to induce transcription factors in different candidate cells, and found better candidate tissue for producing β -cells which have glucose stimulated insulin secretion. Furthermore, from the point of view that there is developmentally unique timing for each transcription factors involved in β -cell differentiation, we are trying to construct the gene recombination system to shift the expression timing of transcription factors in non- β candidate cells in vivo.

研究分野：糖尿病

キーワード：膵細胞再生 インスリン転写因子

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病患者やインスリン分泌の枯渇した2型糖尿病患者の根治を可能とするためには、失われた膵β細胞機能を補うことが不可欠である。分化した体細胞から膵β細胞への分化転換を目指した研究、特に転写因子の異所性発現誘導による膵β細胞への分化転換へ向けた研究は近年急速に進歩している。Meltonらは膵腺房細胞にMafA, Pdx1, Neurogenin3(Neurog3)といった転写因子をadenovirusを用いて発現誘導することにより、膵β細胞への分化誘導に成功している(Zhou Q et al. *Nature*, 2008)。膵腺房細胞の可塑性を示した重要な結果といえるが、他組織との比較はできておらず、また、十分なインスリン分泌も認められていない。このように膵β細胞の分化に関与する転写因子を発現誘導することが、現在、非β細胞から膵β細胞化への分化転換のための最も有効な方法の一つと考えられるが、その手法を用いた場合、膵β細胞化に最も適した候補細胞はどこにあるのかは不明であり、比較もされていないのが現状である。また、それら候補細胞を用いての分化誘導において、分化転換効率のさらなる改善が可能であるかも不明である。

2. 研究の目的

我々の研究室では、強力なインスリン転写因子であるMafAをクローニングしており(Matsuoka T et al. *Mol Cell Biol*, 2003)、膵β細胞の最終的な分化段階に発現し、膵β細胞成熟化に寄与する転写因子であることを証明してきた(図1)。また、膵α細胞株にMafAをstableに発現させるとインスリン発現が認められるようになるなどの報告もしており(Matsuoka T et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004)、

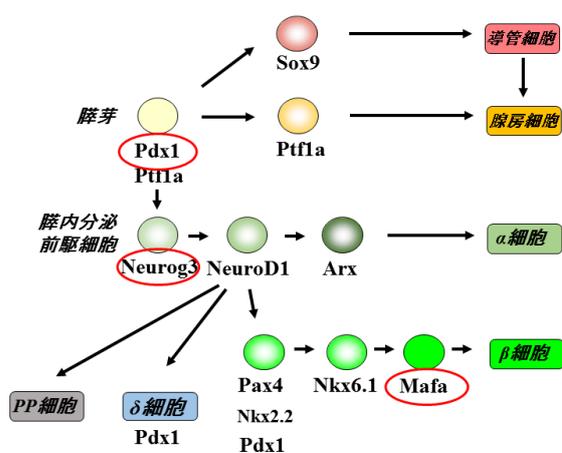


図1 膵β細胞分化における様々なkey factor

以前から同因子を用いた非β細胞の膵β細胞化を目指してきた。これまでに我々の実施してきた細胞株を用いた実験結果からは、膵β細胞化に向けた母細胞の選択や、液性因子を含めた細胞周辺環境の重要性が示唆されている(Matsuoka et al. *Mol Endocrinol*, 2007, Matsuoka T et al. *J Biol Chem*, 2005)。また、前述のようにMafA, Pdx1, Neurog3の3つの転写因子をアデノウイルスを用いて*in vivo*において膵腺房細胞へと発現させることによりインスリン産生細胞へ分化転換するという結果が発表され、膵β細胞への分化転換におけるMafAを含めた転写因子を複合的に作用させることの重要性がさらに確かなものとして認識されるようになった。しかし、これら既報ではインスリン産生細胞への分化転換効率やインスリン分泌量が低く、血糖値の正常化には不十分である。そこで本研究では、膵腺房細胞の他、膵導管細胞も標的細胞とし、遺伝子改変マウスを用いてそれぞれの細胞に転写因子の異所性発現を誘導し、膵β細胞への分化転換の可能性を探ることを目的の一つとした。また、既報でのインスリン分泌低値の一因として、生理的な膵発生では異なる時期に発現するはずの複数の転写因子を同時期に発現誘導していることも一因である可能性が考えられた。*In vitro*の系ではあるが、我々は生理的な膵発生の過程を模倣し、転写因子の導入時期や導入方法を調整することで、より効率的にインスリン陽性細胞への分化転換を誘導できることを明らかとしており(Miyashita K et al. *BBRC*, 2014)、*in vivo*において転写因子発現に時間差を作り発現誘導する系を構築し、非β細胞から膵β細胞への分化転換の量的、質的な効率化を目指した。

3. 研究の方法

A) 膵β細胞化に適した候補細胞の探求

MafA、Pdx1、NeuroD1、Neurog3 など、膵β細胞の発生・分化およびインスリン発現において必須の転写因子を、Cre-loxPシステムを用いた系により組織特異的に発現誘導し得るトランスジェニックマウス(CAG-CAT-MafA, CAG-CAT-Pdx1, CAG-CAT-NeuroD1, CAG-CAT-Neurog3)を作製した(図2)。これまでに、膵β細胞に最も近縁にある膵α細胞がβ細胞への分化転換の母細胞となる可能性を検討す

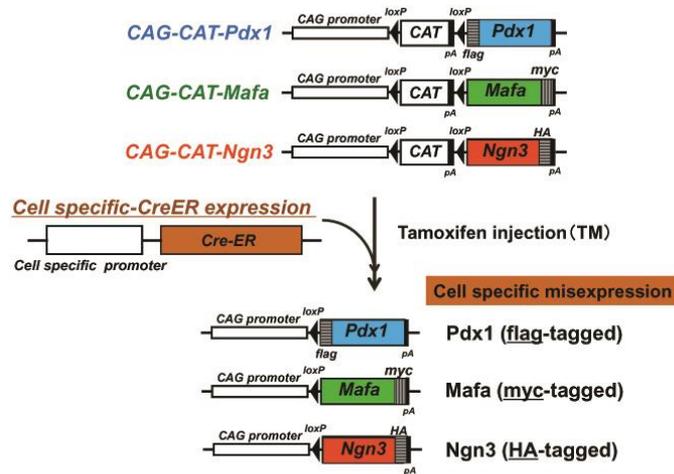


図2 Cre/loxPシステムによるTM誘導性異所性発現

ることにより、膵β細胞化が可能であることを示唆し得た結果といえる (Matsuoka et al. Diabetes 2017)。しかしながら出生後の成熟膵α細胞において同様に両因子を発現誘導しても分化転換が困難であること (未発表データ)、また膵α細胞には量的な制限もあることから、膵β細胞化の候補細胞として膵島の次に膵β細胞とは発生学的・位置的に近縁にある膵腺房細胞での検討を Elastase-CreER マウスとの交配により実施することとした。さらに、Sry (sex determining region Y)-box 9 のプロモーター下に CreER を発現するマウス(Sox9-CreER)を用いて、膵導管上皮細胞、腸管上皮細胞などへの MafA, Pdx1, Neurog3 発現マウスの作製を試みることにした。

B) Pdx1 先行発現誘導による膵β細胞化効率の増大への試み

我々のこれまでの *in vitro* における研究結果からは、Pdx1 を先行して発現させ生理的な膵発生の過程を模倣することによって、より効率的にインスリン陽性細胞への分化転換が誘導でき、インスリン発現量の増大も図れることが明らかとなっている。上記 A) に記載した膵β細胞化に適した候補細胞の探求の新たな展開として、*in vivo* での Pdx1 発現先行モデルを作製し、より効率的なインスリン陽性細胞化と、インスリン発現量の増大も含めた、より膵β細胞に近い細胞への分化誘導を目指して、次の実験を予定している。これまでに用いてきた Cre/loxP システムに加え、Dre/Rox システムを併用することにより Cre/loxP とは独立した系において Pdx1 を組織特異的に先行発現する。発現時期を任意に選択するために、さらに Tet-On システムを併用する。つまり、図3に示すように、ある組織(ここでは Sox9 陽性細胞)でのみ Dre recombinase を発現するマウスと、Rox に挟まれた CAT 遺伝子を取り除かれた時にのみ doxycyclin 反応性に Pdx1 を発現するマウス(Rox-TetOne-Pdx1-CreER^{T2} mouse)を交配することにより、doxycyclin 注射により目的細胞へ Pdx1 を発現誘導することが可能となる。また、Pdx1 と同時に CreER を発現させることにより、その後時期をずらして、MafA、Neurog3 発現をタモキシフェン投与により誘導することも可能となる。Pdx1 先行発現による膵β細胞への分化転換効率の評価に関しては、同システムを用いて MafA、Pdx1、Neurog3 の3因子を同時発現するマウスとの比較を行う予定としている。

べく、Gcg-Cre マウスとの交配により MafA, Pdx1 をα細胞へとそれぞれ発現誘導したが、単独発現では、成熟期に至るまで分化転換は認められなかった。一方、MafA 及び Pdx1 を同時に発現させた系においては、多数のα細胞がインスリン陽性細胞となり、それら細胞ではグルカゴン発現の消失も認められた。これらは、グルカゴン陽性となったばかりの胎生期膵α細胞へ膵β細胞内発現転写因子を導入す

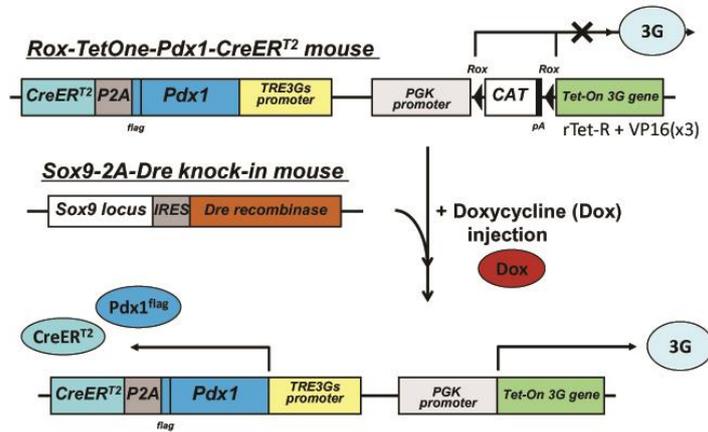


図3 Doxycycline投与によるPdx1先行発現&CreERT²発現

in vivo transdifferentiation の臨床応用には多くの障壁が存在するが、これら結果により膵β細胞への分化効率化が示されれば、有用な知見となり得ると考える。

4. 研究成果

A) 膵β細胞化に適した候補細胞の探求

in vivo における膵β細胞への分化転換に適した候補細胞を見出すため、MafA、Pdx1、NeuroD1、Neurog3 などの転写因子を、Cre-loxP システムにより組織特異的に、任意の時期に発現誘導し得るトランスジェニックマウスを作製した。膵島内細胞に次いで膵β細胞とは発生学的に近縁にあり、十分な細胞量を有する膵外分泌細胞を標的として膵β細胞化の可能性を探るべく、Sox9-CreER と Ela-CreER とを用いて、それぞれ膵導管上皮細胞および膵腺房細胞へ tamoxifen 誘導性に主要インスリン転写因子である MafA、Pdx1、NeuroD1 の3因子を同時に発現誘導したところ、インスリン陽性細胞は認めるものの、いずれの組織においても転写因子誘導細胞数あたりのインスリン陽性細胞数は少なく、非効率的であると判断した。

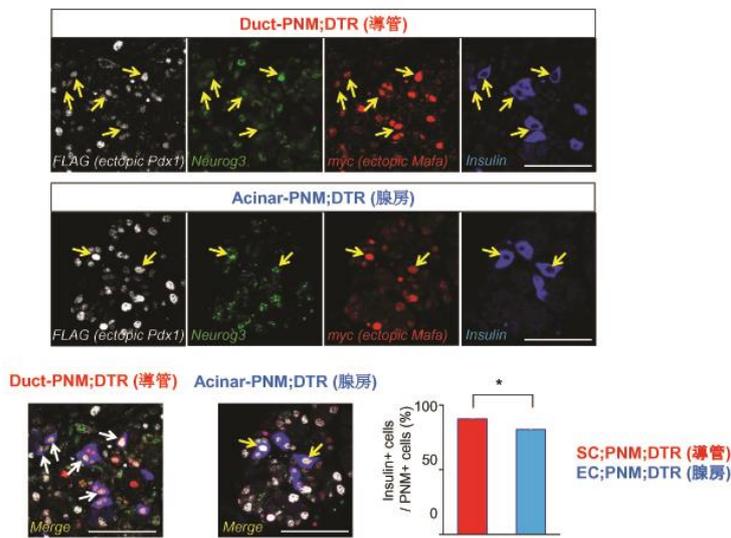


図4 インスリン陽性化比率の比較(導管細胞 v.s.腺房細胞)

次に、MafA、Pdx1,に加えて、膵内分泌細胞分化誘導因子である Neurog3 を同時に発現するマウスを作製した。膵導管細胞へこれら転写因子を発現させた場合、これら3因子が発現した細胞の90%程度がインスリン陽性細胞化することが確認された。同様に膵腺房細胞へ MafA、Pdx1、Neurog3 を発現誘導した場合には、膵導管細胞の場合に比し、インスリン陽性化率は有意に低値であった(図4)。

実際に誘導された膵臓内インスリン含量を、膵β細胞特異的 DTR 発現マウスを用いて 99%以上の内因性β細胞を ablation したマウスにおいて比較したところ、膵導管からインスリン陽性化を誘導した場合には有意差をもって wild マウスよりも多量のインスリン含量を有しており、外分泌細胞からのものと比べても多い傾向を有していた(図5)。次に、膵β細胞特異的 DTR 発現マウスを用いて内因性膵β細胞を欠失させたマウスでの膵導管由来インスリン陽性細胞のグルコース応答性インスリン分泌の有無を確認したところ、wild マウスに比べ、弱いながらグルコース応答性インスリン分泌も認められ、Glut2、Nkx6.1 などの発現

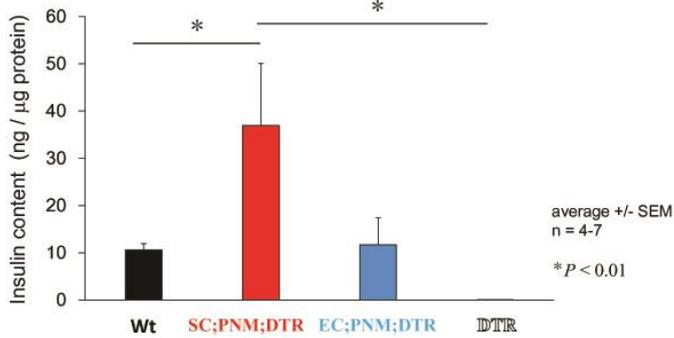


図5 膵内インスリン含量の比較

も数割程度のインスリン陽性細胞に確認された。膵導管由来インスリン陽性細胞は、膵腺房細胞由来インスリン陽性細胞に比べ、グルコース応答性インスリン分泌においても僅かに大きい傾向を示したが未だ検査数が少なく、2 群間の比較は今後の検討が必要である (図 6)。胎生膵とは違い、今回の実験に用いた成体マウスでは、Sox9 陽性細胞や elastase 陽性細胞から膵β細胞を含めた膵島内分泌細胞への

分化は通常認められないことから、MafA、Pdx1、Ngn3 の3 因子の異所性発現誘導により、膵外分泌細胞はインスリン陽性細胞への分化誘導は可能であると考えられた。また、これら3 因子の異所性発現においては、グルカゴン、ソマトチン、PP など、他膵内分泌ホルモンの産生は認められず、膵β細胞へ向けた特異的な分化誘導が可能であることも確認できた。

これら結果からは、インスリン陽性細胞化の効率において、膵導管細胞が膵腺房細胞に比し有意に高率であり、膵導管細胞は、*in vivo*における転写因子の異所性発現誘導による膵β細胞化に適した候補細胞と考えている。しかしながら、これらインスリン陽性となった細胞の内、膵β細胞特異的遺伝子の発現する細胞の割合が低いことも明らかであった。上記実験結果は比較的短期 (1 週~10 日) での評価である。

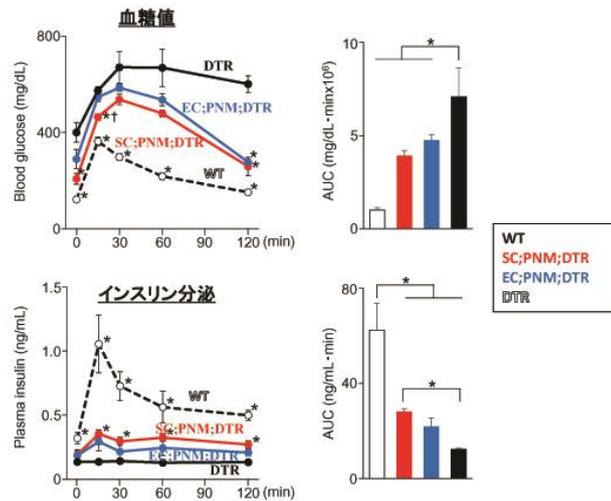


図6 グルコース応答性インスリン分泌の比較(導管細胞 v.s.腺房細胞)

特に Elastase-CreER での異所性転写因子発現誘導時には、マウスが短期に衰弱死することから、分化転換後長期の評価が不可能であったことから実験計画が制約されたこともあり、より選択的な転写因子発現誘導を期待し、新たな遺伝子改変マウスを作製し解析を続けている。

B) Pdx1 先行発現誘導による膵β細胞化効率の増大への試み

さらに効率的に膵β細胞化へ誘導することを目指し、これまでのように同時に複数の転写因子を発現させるのではなく、実際の胎生期膵β細胞分化過程で見られるような Pdx1 の先行発現と、それに続く Neurog3、MafA の発現を、上記の結果をふまえて膵導管細胞において再現することを計画した。Dre/Rox システムを用い、Cre/loxP と連動させた系により、Pdx1 を組織特異的に先行発現誘導し得るマウスモデルの構築を目指す。まずは作製したコンストラクトがデザイン通りに機能するのかを *in vitro* で検討した。293 細胞へ Rox-TetOne-Pdx1-CreER プラスミドと Dre 発現プラスミドとを co-transfection し、Dox 負荷時のみ Pdx1 および CreER が発現することを確認できており、同コンストラクトを遺伝子導入したマウスを現在作製中である。

これら結果から、*in vivo*における膵β細胞への direct reprogramming の可能性が見出されることを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miura M, Miyatsuka T, Katahira T, Sasaki S, Suzuki L, Himuro M, Nishida Y, Fujitani Y, Matsuoka TA, Watada H.	4. 巻 36
2. 論文標題 Suppression of STAT3 signaling promotes cellular reprogramming into insulin-producing cells induced by defined transcription factors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine.	6. 最初と最後の頁 358-366.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2018.09.035.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takaaki Matsuoka
2. 発表標題 Symposium: Transcriptional Control of alpha-Cell Fate
3. 学会等名 American Diabetes Association, 78th Scientific Sessions 2018. 6. 22-26, Orlando, USA（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡孝昭
2. 発表標題 膵 細胞におけるMafAの役割について
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム「膵 細胞の発生、分化と量の調節機構」（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔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
研究 分 担 者	片上 直人 (Katakami Naoto) (10403049)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	河盛 段 (Kawamori Dan) (50622362)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

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