

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04060

研究課題名(和文) 擬絶食療法による 細胞新生の効率化とその分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Optimization of beta-cell reprogramming driven by fasting-mimicking diet

研究代表者

宮塚 健 (Miyatsuka, Takeshi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：60622363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,200,000円

研究成果の概要(和文)：Ins1-CreER;ROSA26-mTmGマウス(細胞特異的にCre酵素を発現し、Cre酵素存在下でmTomatoからmGFPへと蛍光タンパク質の発現をスイッチするマウス)を導入し、アロキサンを用いて高血糖を誘導した後、擬絶食療法(50%カロリー制限食を1日間・カロリー制限食を4日間・通常食を7日間給餌するサイクルを5回繰り返す)を行ったところ、膵島内に赤色蛍光・緑色蛍光共陽性の新生細胞を観察した。免疫組織染色において、Neurog3陽性細胞は検出されなかったことから、「新生細胞の起源はNeurog3陽性前駆細胞由来である」という既報の結果とは異なる結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、絶食に近い食事を間欠的に繰り返す“擬絶食療法”が細胞新生を誘導することが報告され(Chen C et al. Cell 168: 775-788, 2017)、糖尿病の新たな治療戦略として注目されている。今回我々は細胞新生を可視化できるIns1-CreER;ROSA-mTmG (Ins1-neoTimer) マウスを作製し、既報とほぼ同様の擬絶食療法が細胞新生を誘導することを明らかにした。ただし、細胞新生量は十分ではなかった。高血糖は正を可能とする新生細胞数を誘導するためには、さらなる実験条件の最適化が必要である。

研究成果の概要(英文)：To monitor newly-generated beta cells, we generated Ins1-CreER;ROSA-mTmG (Ins1-neoTimer) mice, in which only newly-generated beta cells were labeled as green/red double-fluorescent cells. The Ins1-neoTimer mice were fed "fast-mimicking diet (FMD)", that is 50% of the standard daily calorie intake on day 1, 10% of normal daily calorie intake on days 2 to 4, and then normal chow for 1 week. Five cycles of FMD induced green/red double-fluorescent newborn beta cells in the islets of Ins1-neoTimer mice. As the newly generated beta cells were negative for Neurog3, which was not consistent with the previous finding that newly generated beta cells were derived from Neurog3-expressing endocrine progenitors.

研究分野：細胞再生医療

キーワード：細胞新生 再生医療 擬絶食療法 Neurog3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全ての糖尿病患者ではインスリン分泌細胞である膵細胞の容量が低下、あるいは廃絶している。よって、糖尿病根治を実現するためには失われた細胞を補充する必要がある。近年、膵細胞の再生を目的として、iPS細胞やES細胞といった多能性幹細胞からの分化誘導、細胞以外の膵細胞からのリプログラミングといった方法が開発されているが、有効性、安全性、そしてコスト面に関して多くの課題が残る。最近、絶食に近い食事を繰り返す“擬絶食療法 fast mimicking diet”が非膵細胞からの膵細胞新生を促すことが報告され(Chen C et al. Cell 168: 775-788, 2017)、糖尿病の新たな治療戦略として注目されている。しかし、その背景にある分子機構の詳細は未解明であり、また糖尿病再生医療を実現するためには、より効率的な膵細胞新生誘導法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では膵細胞新生を組織学的に可視化するレポーターマウスを作製し、擬絶食療法で誘導される膵細胞新生の背景にある分子メカニズムを解明するとともに、より効率的な膵細胞新生誘導法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 擬絶食条件下における膵細胞新生の観察

前駆細胞から分化したばかりの新生膵細胞を観察するため、*Insulin 1(Ins1)* promoter 支配下に、かつタモキシフェン誘導性に Cre-mediated recombination を誘導する *Ins1-CreER* マウスを、*ROSA26-mTomato-mGFP (mTmG)* マウスと交配することにより、*Ins1-CreER; ROSA-mTmG (Ins1-neoTimer)* マウスを作製した。*Ins1-neoTimer* マウスでは前駆細胞から膵細胞へと分化する際、すなわち *Insulin 1* を発現しはじめた時点で Cre-mediated recombination が誘導され、赤色蛍光 (mTomato) が徐々に消失し、緑色蛍光 (mGFP) を発現するようになる。この特性を利用し、新生膵細胞を赤色蛍光陽性・緑色蛍光陽性細胞として標識し、分化した膵細胞を緑色蛍光陽性細胞として識別することができる。

Ins1-neoTimer マウスに Fast-mimicking diet (50% カロリー制限食を1日間・カロリー制限食を4日間・通常食を7日間給餌するサイクルを5回繰り返す) を給餌した後、凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡で新生膵細胞を観察した。

(2) 膵細胞新生の起源解明に向けた組織学的解析

新生膵細胞の起源を観察するため、擬絶食療法後 *Ins1-neoTimer* マウス膵切片を作成し、Neurog3 抗体を用いた免疫組織染色を行なった。また Neurog3 遺伝子座に eGFP を挿入した *Neurog3-eGFP* ノックインマウスに擬絶食療法を行なった後、凍結切片を作成し eGFP 発現の有無を観察した。

4. 研究成果

(1) 擬絶食条件下における膵細胞新生の観察

擬絶食療法 (Fast-mimicking diet : 50% カロリー制限食を1日間・カロリー制限食を4日間・通常食を7日間給餌するサイクルを5回繰り返す) 後の *Ins1-neoTimer* マウスの膵島内に緑色蛍光・赤色蛍光共陽性、かつインスリン陽性の細胞を認めたことから、擬絶食療法が前駆細胞から膵細胞への分化 (膵細胞新生) を誘導することが示唆された。新生膵細胞数は膵島2~3個の1細胞程度であり、十分量の膵細胞新生を誘導するためには条件の至適化が必要であると考えられた。

(2) 細胞新生の起源解明に向けた組織学的解析

擬絶食療法後の *Ins1-neoTimer* マウス膵切片を用いて抗 Neurog3 抗体に対する免疫組織染色を行なったところ、観察範囲内に Neurog3 陽性細胞は観察されなかった。Neurog3 陽性細胞を追跡するためのレポーターマウス”*Neurog3-eGFP* マウス”に擬絶食療法を行った後、膵切片を作成、eGFP の発現を観察したが、緑色陽性細胞は認められなかった。以上の結果から、擬絶食療法に誘導される新生細胞の起源が Neurog3 陽性内分泌前駆細胞であることを示唆する結果は得られなかった。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki Shugo, Lee Michelle Y. Y., Wakabayashi Yuka, Suzuki Luka, Winata Helena, Himuro Miwa, Matsuoka Taka-aki, Shimomura Iichiro, Watada Hirotaka, Lynn Francis C., Miyatsuka Takeshi	4. 巻 65
2. 論文標題 Spatial and transcriptional heterogeneity of pancreatic beta cell neogenesis revealed by a time-resolved reporter system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 811 ~ 828
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00125-022-05662-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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 宮塚 健
2. 発表標題 Modulating Cellular Plasticity within the Pancreas for Curing Diabetes
3. 学会等名 3rd International Forum on Medical Innovation of Cell & Bio Therapy（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮塚 健
2. 発表標題 Diabetes Cureに向けた 細胞新生誘導
3. 学会等名 第54回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2020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	綿田 裕孝 (Watada Hirotaka) (60343480)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (32620)	

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