

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09002

研究課題名(和文) 未成熟膵 細胞株をもちいた2段階成熟過程の分子的解明

研究課題名(英文) Molecular elucidation of two-step maturation process using immature pancreatic beta cell lines

研究代表者

宮崎 早月 (Miyazaki, Satsuki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60452439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵 細胞の発生や成熟、インスリン分泌能、糖尿病の発症や進行に深く関わる転写因子Mafaを欠損させた未成熟であるが増殖能を持つ細胞株と発現を回復させたrescue細胞株をもちいて細胞の機能維持や成熟に関与すると思われる候補遺伝子や因子を探索した。候補遺伝子の過剰発現や外的刺激などの検討を行い、成熟が促進される条件を検討した。新たに樹立した機能的に成熟したMIN6細胞株からMafa欠損株とそのrescue細胞株を作製し、RNA-seqを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、未成熟Mafa欠損細胞株において、Mafa発現後にさらに成熟させるために必要な因子を探索することを目的としている。膵島から未成熟な細胞のみを単離培養することは困難であるため、この細胞株なしには、in vitro系において成熟機構を解析することは難しい。この細胞をもちいた研究により得られる知見は、iPS細胞などの幹細胞を高度に成熟したインスリン産生細胞に分化誘導する技術の実用化に応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The Mafa gene encoding a transcription factor has been implicated in the functional maturation and insulin secretory capacity of beta cells and also in the pathogenesis of diabetes. In this study, immature beta cell lines lacking the Mafa gene and Mafa-rescue beta cell lines were used to search for candidate genes and factors involved in maturation and maintenance of beta cells. Effects of overexpression of the candidate genes and exposure to various external stimuli on the functional maturation were examined in Mafa-KO beta cells. Gene expression patterns of a Mafa-deficient beta cell line isolated from the newly established functionally mature MIN6-CB4 cell line and its rescue beta cell line were analyzed by RNA sequencing.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵 細胞 転写因子 インスリン分泌 成熟機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、さまざまな原因因子が組み合わさって発症する疾患である。糖尿病の病因を解明するためには、膵β細胞機能、特に機能的に成熟したインスリン分泌制御を行うための分子のメカニズムを解明することが重要である。本研究課題では、膵β細胞の成熟と機能維持において重要な役割を果たしているとされる転写因子 MafA に着目した。これまで、未成熟であるが増殖能を持つ *Mafa* ノックアウトβ細胞株 (MIN6-Mafa-KO 細胞) を樹立し、さらに *Mafa* 発現を回復させた rescue 細胞を作製し、解析を進めてきた。MafA はβ細胞の成熟の決定因子であり、*Mafa* が発現しさえすれば自然に成熟していくと思われたが、本細胞培養系では *Mafa* を発現させ続けても高グルコース刺激に対する応答性が顕著に低いなど、十分に成熟しないことが示唆された。そのため、*Mafa* 発現はグルコース応答性を得るという1段階目の成熟に必要なであるが、更なる成熟過程が存在するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、未成熟であるが増殖能を持つ *Mafa* 欠損β細胞株と *Mafa* 発現を回復させた rescue β細胞株をもちいて、β細胞としての機能を獲得する成熟メカニズムや成熟過程に必要な因子を広く探求することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 候補遺伝子のβ細胞機能への影響

これまでの研究で、MIN6細胞と MIN6-Mafa-KO 細胞、*Mafa*-短期 rescue 細胞 (アデノウイルスベクターをもちいた短期発現)、*Mafa*-長期 rescue 細胞 (レンチウイルスベクターをもちいた薬剤選択を伴う恒常的発現) の4群間における遺伝子発現の変化を、DNA マイクロアレイや RNA-seq、ChIP-seq のデータから総合的に解析し、2種類のリストを作成した。1つ目は、MIN6-Mafa-KO 細胞に比べ *Mafa*-短期 rescue 細胞と *Mafa*-長期 rescue 細胞の両方において2倍以上強く発現し、MIN6細胞でも発現が高く維持されており、目的遺伝子のゲノム領域に MafA の結合部位があり直接的に制御している可能性の高い遺伝子群である。2つ目は、*Mafa*-短期 rescue 細胞では発現が上昇せず、*Mafa*-長期 rescue 細胞においてのみ発現が上昇し、MIN6細胞でも発現が高く維持されている遺伝子群である。これらの候補遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを作製し、MIN6-Mafa-KO 細胞に導入し、遺伝子を過剰発現させた際の機能への影響をグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) や増殖力、インスリン含量、遺伝子発現などから検討する。

(2) *Mafa* 発現以降の成熟過程の解析

Mafa 長期発現のみでは十分な成熟が起こらないと考えられることから、以下の方法でさらなる成熟を試みる。

分化増殖因子存在下での培養による成熟誘導を行う。上記の候補遺伝子群の中には、興味深いことに、さまざまなレセプターも含まれていたことから、各レセプターに対するアゴニストを培養液に加え、適切な外的刺激を加えて培養することによる成熟を GSIS や *Ucn3* の発現変化を指標に検討する。

培養方法の工夫による成熟誘導について検討する。培養時の培養液中のグルコース濃度を

変化させることで、GSIS が改善することがあることから、至的な培養条件を検討する。また、偽膵島を作製すると、GSIS が増強するという報告があることから、3次元培養を取り入れた成熟を試みる。

In vivo 移植による成熟誘導を行う。ES 細胞や iPS 細胞から分化誘導したインスリン産生細胞は、マウスに移植すると体内で、より成熟することが報告されている。そこで、まず Mafa-長期 rescue 細胞と、コントロールとして MIN6 細胞と MIN6-Mafa-KO 細胞をそれぞれマウスの精巢上体脂肪パッドあるいは腎皮膜下に移植し、さらなる成熟を試みた後、各細胞株を取り出し再度培養し、GSIS を ELISA にて検討し、RNA-seq にて遺伝子発現を検討する。

(3) 成熟した β 細胞の Mafa 遺伝子欠損株の樹立

成熟した性質を有する MIN6 細胞 (MIN6-CB4) の Mafa 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトし、両アレルともノックアウトされた株を樹立し、RNA-seq を行う。MIN6-Mafa-KO 細胞や Mafa-rescue 細胞との発現パターンの違いを比較検討する。

4. 研究成果

(1) さまざまな候補遺伝子を MIN6-Mafa-KO 細胞に導入し、遺伝子を過剰発現させた。GSIS を ELISA により測定した。その結果、低グルコース下におけるインスリン分泌を抑制する機能がある遺伝子が見つかった。

(2) 候補遺伝子の中に、さまざまなレセプターも含まれていたことから、各レセプターに対するアゴニストや成長因子などを培養液に加えた。培養液に加える因子の濃度を変えたり、添加するタイミングや培養期間を変えたり、2~3種類の因子を組み合わせるなどの検討を重ねた。その結果、ある条件下において、GSIS の改善が示唆され、成熟マーカーとして知られる *Ucn3* の発現がコントロールと比較して増加した。また、ある因子の場合、Mafa-長期 rescue 細胞に因子を加えて長期培養後 GSIS を行うとインスリン分泌能は低下するが、GSIS の直前にのみ数時間因子を働かせた場合、逆に GSIS の改善が見られた。グルコース濃度を変えて培養した場合、低グルコースで一定期間培養した条件では、高グルコース下におけるインスリン分泌が増強した。偽膵島作製実験では、浮遊培養は接着培養と比較して *Ucn3* の発現に差は見られなかった。*In vivo* 移植による成熟誘導に関しては、動物実験施設の改修工事のため行うことができなかったが、今後行いたいと考えている。

(3) *Ucn3* の発現が高く、成熟した性質を有する細胞株 MIN6-CB4 を新たに樹立し、その機能を解析し、報告した。成熟した状態から Mafa を欠損した場合の遺伝子発現を調べるため、MIN6-CB4 の Mafa 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトした。単離培養を行い、両アレルともノックアウトされているクローンを4クローン得た。各クローンについて GSIS やインスリン含量、増殖力、遺伝子発現パターンなどを解析した。その中の3クローンについて rescue 細胞を作製し、機能の解析を行った。総合的な解析から最終的に1クローンを選び、Mafa ノックアウトとその rescue 細胞について、RNA-seq を行った。そして、遺伝子発現について MIN6-CB4 細胞や MIN6-Mafa-KO 細胞、Mafa-rescue 細胞と比較検討を行った。その結果、MIN6 細胞、MIN6-Mafa-KO 細胞、Mafa-rescue 細胞の群のみで比較して得られた候補遺伝子・因子以外にも、 β 細胞の成熟に関与すると思われる遺伝子・因子が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Miyazaki Satsuki, Tashiro Fumi, Tsuchiya Takashi, Sasaki Kazuki, Miyazaki Jun-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishment of a long-term stable β -cell line and its application to analyze the effect of Gcg expression on insulin secretion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79992-7	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 Nagai Yasuki, Matsuoka Taka-aki, Shimo Naoki, Miyatsuka Takeshi, Miyazaki Satsuki, Tashiro Fumi, Miyazaki Jun-ichi, Katakami Naoto, Shimomura Iichiro	4. 巻 556
2. 論文標題 Glucotoxicity-induced suppression of Cox6a2 expression provokes β -cell dysfunction via augmented ROS production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 134 ~ 141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.148	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 -

〔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 宮崎 早月、田代 文、倭 英司、宮崎 純一
2. 発表標題 未成熟 β 細胞株を用いた成熟機構の解析
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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