

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03463

研究課題名(和文) 2つの膵細胞系列の人為的分化制御による糖尿病発症抑制の試み

研究課題名(英文) Role for two distinct lineages of beta cells in diabetes progression

研究代表者

藤谷 与士夫 (Fujitani, Yoshio)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30433783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：Ppy-Creマウスを用いた細胞系譜追跡実験と単一細胞RNA解析を組み合わせることにより、 β 細胞は2つの系統、すなわち、Ppyを発現する細胞(Ppy系列細胞)および、発現しない非Ppy系列の細胞に二分されることが示された。Ppy系列細胞は、膵島の周辺部に位置し、グルコース応答性のCa²⁺応答性が低く、その遺伝子発現プロファイルは、PP細胞のそれに近いこと、INSのみならず、Ppy, Gcg, Somを発現する multihormonalで細胞としては未熟なことが明らかとなった。さらに糖尿病状態における細胞傷害に対して、非Ppy系列の細胞よりも抵抗性を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵ラ氏島に存在する細胞はインスリン分泌を担う体内で唯一の細胞腫であり、その機能や数の低下は、現在日本の国民病のひとつとなっている糖尿病の原因となる。今回我々の研究により、他の膵内分泌細胞であるPP細胞が発現するPpy遺伝子をマーカーとして用いることにより、細胞が大きく2種類に大別されることが明らかとなった。Ppyと関係のある細胞は、関係のない細胞に比べて、機能的に未熟であり、血糖に反応してインスリンを分泌する能力は弱い、傷害に強い細胞であることが明らかになった。このような細胞の新しい多様性の発見は、糖尿病の病態の理解や新たな治療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：By combining cell lineage tracing experiments using Ppy-Cre mice with single-cell RNA analysis, it was shown that β -cells can be categorized into two lineages: Ppy-lineage β -cells and non-Ppy-lineage β -cells. Ppy-lineage β -cells are located at the periphery of the islets, are less glucose- and Ca²⁺-responsive, have a gene expression profile similar to that of PP cells. Ppy-lineage β -cells are immature as multihormonal β -cells that express not only INS but also Ppy, Gcg, and Som. Furthermore, they were more resistant to β -cell injury in diabetic conditions than non-Ppy lineage β -cells.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：膵細胞 PP細胞 膵ラ氏島 シングルセルRNA解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) PP 細胞は膵ラ氏島を構成する細胞腫の中ではマウスにおいては、もっとも頻度の少ない細胞であり、pancreatic polypeptide (PP) を分泌する。中枢に働いて摂食抑制に関わることが示唆されているが、膵内分泌細胞の中では最も解析が進んでいない細胞腫である。これまで解析を難しくしていた一因として、peptide YY (PYY) や neuropeptide Y (NPY) と高い相同性を示し、ファミリーを形成しているが、その受容体は Y1, Y2, Y4, Y5, y6 の 5 つのサブタイプが存在し、これらを共用しているため、機能的な重複性を示す可能性がある。抗体も特異的なものが存在せず、我々は本研究を進めるにあたり、信頼性の高い特異的 PP 抗体 23-2D3 を独自に樹立した。

(2) 膵細胞において、*raptor* や *Abcc8* 遺伝子などを欠損させることにより膵細胞が機能不全に陥ると、グルカゴン陽性細胞 (α 細胞) や PP 細胞へと運命を変えることが報告された。我々も *rat insulin promoter (RIP)-Cre* を用いて膵細胞をラベルしたのち、少量のストレプトゾトシンと高脂肪食を負荷して肥満を伴う糖尿病を誘発すると元細胞が PP 細胞へと運命転換することを観察した(未発表データ)。我々は、このような膵細胞との関係性において、PP 細胞に興味を持つようになった。

2. 研究の目的

(1) 以上の背景より、PP 細胞は α 細胞の未分化な細胞にあたるのではないかと、この仮説を立て、その目的にむけて PP 細胞の細胞系譜追跡を行うことにした。

(2) PP 細胞の特徴づけを行うために、その遺伝子プロファイルを明らかにすることにした。

(3) α 細胞には PP をコードする *Ppy* 遺伝子を発現するサブポピュレーションが存在することが明らかになった。そこで *Ppy* 遺伝子を発現する細胞 (*Ppy-lineage* 細胞) もの、発現しないもの (*non-Ppy-lineage* 細胞) の間で細胞機能にどのような差があるのかを明らかにすることを目的の一つとした。

3. 研究の方法

(1) *Ppy-Cre* ノックインマウスと *ROSA26-stop-YFP* マウスを交配して細胞系譜実験を行い、*Ppy* 発現細胞の細胞系譜追跡実験を行うことにより、PP 細胞と各内分泌細胞との関連性を明らかにすることにした。

(2) PP 細胞、 α 細胞を含む各内分泌細胞の遺伝子発現プロファイルを明らかにするために、野生型 B6 膵島を用いて網羅的な 1 分子 RNA 解析を行った。

(3) *Ppy* 遺伝子を発現する細胞 (*Ppy-lineage* 細胞) 発現しない細胞 (*non-Ppy-lineage* 細胞) の間でその機能にどのような差があるのかを同じシャーレの上でグルコース応答性の Ca^{2+} 応答を比較することにより明らかにすることとした。

4. 研究成果

(1) *Ppy-Cre* マウスと *ROSA26-stop-YFP* マウスを交配して細胞系譜実験を行ったところ、膵島の周辺部に存在する α 細胞の一部 (約 15%) が YFP によってラベルされることが明らかとなった。さらに詳細に解析を進めると、 α 細胞の約 50%、 β 細胞も約 50% が YFP 陽性であり、*Ppy* 遺伝子は PP 細胞以外の内分泌細胞においても過去に (あるいは現在も) 発現していたことが明らかとなった。

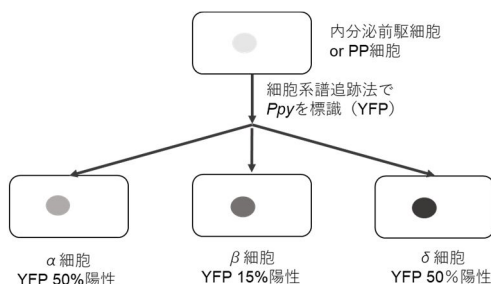


図1 PP発現細胞の細胞系譜追跡結果

(2) さらに興味深いことに、先述の PP に対する特異的抗体を用いると、一部の α 細胞では PP 蛋白質も陽性であり、過去の遺伝子発現のみならず今現在も、膵内分泌細胞の一部では PP を含む 2 種類以上のホルモンを同時産生していることが示された (図 1)。また、*Ppy* 遺伝子プロモーター制御下においてジフテリア毒素を発現するマウスモデル (*Ppy-dTA* ノックインマウス) では、PP 細胞が欠失するだけでなく、 α 細胞や β 細胞が 70-80%、 δ 細胞が 20% 減少することが示された。

(3) これまでに、膵細胞の一部は *Ppy* 遺伝子を成熟期においても発現することが報告されていたため¹⁾、その理由によっても細胞系譜実験の結果を説明できる可能性があった。そこで、

細胞での遺伝子発現プロファイルを1細胞レベルで明らかにすべく、8週令の野生型B6マウスの単離膵島を用いてシングルセルRNA発現解析を行った。その結果、膵島に存在する細胞は免疫系の細胞や血管内皮細胞なども含めて全部で16個のクラスターに分類された(図2)²⁾。この解析によりPP細胞の遺伝子プロファイルが明らかとなり、*Ppy*, *Pyy*, *TSPAN8*, *Folr1*等がPP細胞のID遺伝子として同定された。

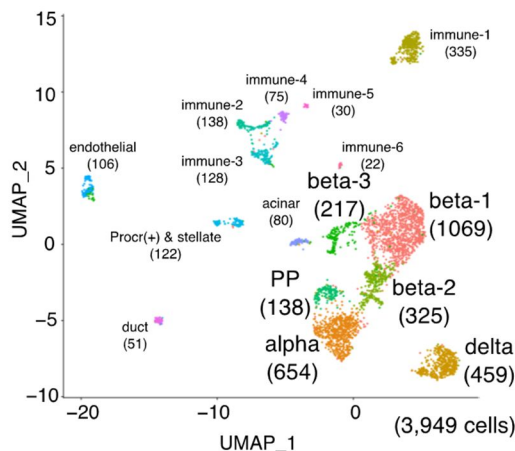


図2 シングルセルRNA解析によるB6マウス膵島の解析

(4) シングルセルRNA発現解析により、膵細胞は少なくとも3つのサブクラスターに分類されたが、このうちの一つの細胞クラスターには *ins2* と *iapp* が特徴的遺伝子として含まれており、これまでよく知られた細胞と考えられた。一方で、残りの2つの細胞クラスターには *glucagon* や *ppy* が特徴的遺伝子として含まれており、これらは細胞でもその他の複数の膵島ホルモン遺伝子を発現する、これまであまりよく知られていない特殊な細胞集団と考えられた。さらに、細胞のみを抽出して再度クラスタリングを行ったところ、細胞は7つのサブクラスターに分類されることが示された(図2)。これらは各々特徴的な遺伝子発現プロファイルを有しているため、少しずつ異なる機能を持つ細胞集団である可能性が考えられた²⁾。

(5) 以上の様に、1分子RNA解析により、細胞は7つのクラスターにより構成されることが明らかとなったが、細胞は2つの系統、すなわち、*Ppy* 遺伝子を発現する細胞 (*Ppy*-lineage(系列)細胞)と発現しない細胞 (*non-Ppy*-lineage/非*Ppy*系列細胞)に大きく分類されることが示された。Gene Ontology解析からは、*Ppy* 系列細胞では、インスリン分泌や peptide 分泌などの項目が低下していたため、この細胞集団はインスリン分泌能が低下してい

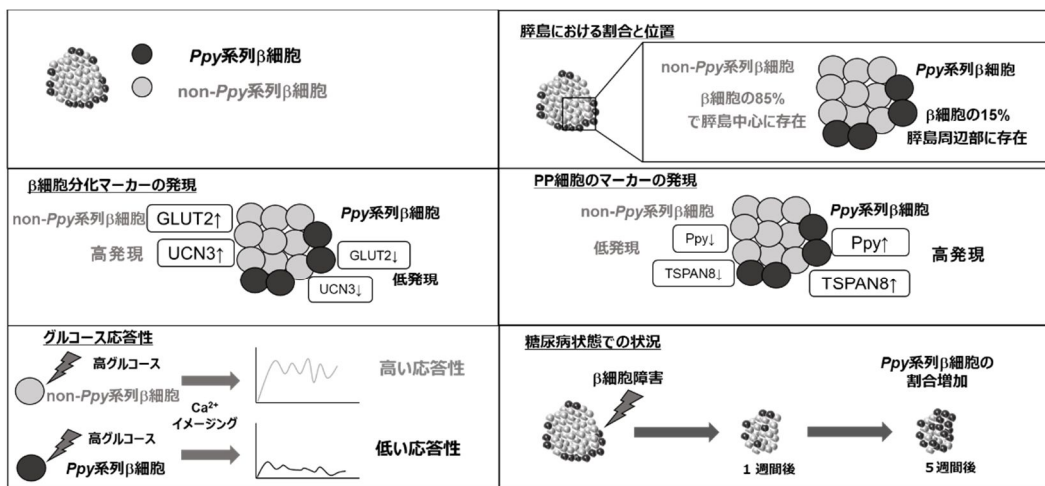


図3 膵β細胞の2つの系列の機能の違い

る可能性が示唆された。

(6) そこで、*Insulin-promoter;Ppy-Cre;Rosa26-stop-tdTomato* マウスを作製し、膵島を単離した後に1細胞まで分離して、*Ppy* 系列細胞と非*Ppy* 系列細胞を1プレートの上で区別しながら高グルコース応答性のCa²⁺の濃度上昇についてFra2をindicatorとして観察する実験を施行した。そうしたところ、*Ppy* 系列細胞の方が、高グルコースに対するCa²⁺の反応性がより低下していることが明らかになった。

(7) 以上の様に *Ppy* 系列細胞は、その膵島における位置、機能性および遺伝子発現プロファイルに関して明確な特徴を示す。すなわち、*Ppy* 系列の細胞は、膵島の周辺部に位置し、グルコース応答性のCa²⁺反応が低く、その遺伝子プロファイルはPP細胞のそれに近いこと、すなわち、*Ins2*のみならず *Ppy*, *Gcg*, *Som* 遺伝子を合わせて発現し、*Glut2* や *Ucn3* などの細胞の成熟マーカーの発現が低下していることが明らかになった(図3)。さらにストレプトゾトシン誘導性の糖尿病やジフテリア毒素誘導性の糖尿病モデルにおいて、時間経過とともに、*Ppy* 系列の細胞が残存膵島において dominant になることから、この細胞サブセットは糖尿病状態における細胞傷害に抵抗性を示すことが示唆された。膵島の傷害発生時には、グルコース

応答性のインスリン分泌をある程度犠牲にしても、細胞を生き残らせるための仕組みが備わっているのではないかと我々は考えている(図3)。

(8) 一方、P. Herrera らのグループも、彼ら独自のシングルセル RNA シーケンシング解析と我々の供与した 23-2D3 抗体を用いた細胞系譜追跡実験を行い、*Ppy* 遺伝子は PP 細胞に加えて残りの 3 種類の全ての内分泌細胞腫の subpopulation において発現することを示している³⁾。さらに興味深いことに、彼らは細胞をほぼ完全に ablation した場合には、*Ppy* 発現細胞がインスリン陽性となって細胞の再生に関与している可能性を示唆した。細胞の供給源として、これまで主に細胞の可塑性について多くの論文が報告されてきたが、PP 細胞も相応に可塑性の高い細胞であることが考えられた。

< 引用文献 >

1) Katsuta H, Akashi T, Katsuta R, Nagaya M, Kim D, Arinobu Y, Hara M, Bonner-Weir S, Sharma AJ, Akashi K, Weir GC. Single pancreatic beta cells co-express multiple islet hormone genes in mice. *Diabetologia* 53: 128-138, 2010

2) Fukaishi T, Nakagawa Y, Fukunaka A, Sato T, Hara A, Nakao K, Saito M, Kohno K, Miyatsuka T, Tamaki M, Matsuhisa M, Matsuoka T, Yamada T, Watada H, Fujitani Y. Characterisation of *Ppy*-lineage cells clarifies the functional heterogeneity of pancreatic beta cells in mice. *Diabetologia* 64: 2803-2816, 2021

3) Perez-Frances M, Gulp LV, Abate MV, Cigliola V, Furuyama K, Bru-Tari E, Oropeza D, Carreaux T, Fujitani Y, Thorel F, Herrera PL. Pancreatic *Ppy*-expressing γ -cells display mixed phenotypic traits and the adaptive plasticity to engage insulin production. *Nat Commun* 12: 4458, 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fukaishi T, Nakagawa Y, Fukunaka A, Takashi Sato, Hara A, Nakao K, Saito M, Kohno K, Miyatsuka T, Tamaki M, Matsuhisa M, Matsuoka TA, Yamada T, Watada H, Fujitani Y.	4. 巻 64
2. 論文標題 Characterisation of Ppy-lineage cells clarifies the functional heterogeneity of pancreatic beta cells in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 2803-2816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00125-021-05560-x.	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 Saito D, Nakagawa Y, Sato T, Fukunaka A, Pereye OB, Maruyama N, Watada H, Fujitani Y	4. 巻 17
2. 論文標題 Establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay for mouse pancreatic polypeptide clarifies the regulatory mechanism of its secretion from pancreatic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0269958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0269958.	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 Perez-Frances M, van Gurp L, Abate MV, Cigliola V, Furuyama K, Bru-Tari E, Oropeza D, Carreaux T, Fujitani Y, Thorel F, Herrera PL.	4. 巻 12
2. 論文標題 Pancreatic islet Ppy-expressing gamma-cells display mixed phenotypic traits and have the adaptive plasticity to engage insulin production.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24788-0.	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 Perez-Frances M, Abate MV, Baronnier D, Scherer PE, Fujitani Y, Thorel F, Herrera PL	4. 巻 38
2. 論文標題 Adult pancreatic islet endocrine cells emerge as fetal hormone-expressing cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110377.	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 Tatsuoka H, Sakamoto S, Yabe D, Kabai R, Kato U, Okumura T, Botagarova A, Tokumoto S, Usui R, Ogura M, Nagashima K, Mukai E, Fujitani Y, Watanabe A, Inagaki N	4. 巻 23
2. 論文標題 Single-Cell Transcriptome Analysis Dissects the Replicating Process of Pancreatic Beta Cells in Partial Pancreatectomy Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101774.	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11件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 PP細胞から切り拓く膵島研究の新展開
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 PP細胞研究が解き明かす膵 細胞の多様性
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 膵ラ氏島の残されたフロンティア PP細胞の生物学
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会年次学術集会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 Ppy遺伝子の活性化が規定する膵 細胞の機能的多様性
3. 学会等名 The14th Diabetes Leading-edge Conference (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 PP細胞から切り拓く膵島研究の新展開
3. 学会等名 Islet E-quality Meeting 9th (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 PP細胞から切り拓く膵島研究の新展開
3. 学会等名 徳島大学先端酵素学研究所 2021年度 共同利用・共同研究拠点 成果報告会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深石貴大, 佐藤隆史, 中川祐子, 福中彩子, 松岡孝昭, 原朱美, 宮塚健, 綿田裕孝, 藤谷与士夫
2. 発表標題 内分泌前駆細胞としてのPpy lineage cellの解析
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukaishi T, Fukunaka A, Nakagawa Y, Sato T, Matsuoka TA, Hara A, Miyatsuka T, Watada H, and Fujitani Y
2. 発表標題 Ppy-lineage beta cells as a minor subpopulation from different origin
3. 学会等名 The 15th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences The 6th IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ofejiro P, Sato T, Nakagawa Y, Ayako Fukunaka A, Fujitani Y
2. 発表標題 A trial for the establishment of pancreatic endocrine cell lines using a new transgenic-mouse model
3. 学会等名 第67回北関東医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 糖尿病発症予防にかかわる 膵 細胞恒常性維持機構の基礎知識
3. 学会等名 第54回糖尿病学の進歩 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤谷与士夫
2. 発表標題 PP細胞の可塑性
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 藤谷与士夫	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 5
3. 書名 朝倉内科学 第12版 代謝栄養系の異常 1) 生体のホメオスタシスと代謝調節	

1. 著者名 福中彩子、藤谷与士夫	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 糖尿病・内分泌代謝科 [モデル動物を用いた糖尿病・肥満症研究による病態解明と治療法開発] ページ脂肪細胞の発生起源(解説/特集)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所 分子糖代謝制御分野 https://tou-taisha.imcr.gunma-u.ac.jp/

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