

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06660

研究課題名(和文)膵細胞再生過程におけるNeurod1発現細胞の解析

研究課題名(英文)Analysis of Neurod1-expressing cells during pancreatic beta cell regeneration

研究代表者

松田 大樹 (Matsuda, Hiroki)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：60801363

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)：膵細胞(細胞)は、血糖制御に必須な細胞である。しかしながら、我々ヒトの細胞は再生能が低く、その細胞の減少は糖尿病の原因となる。興味深いことに、同じ脊椎動物でも、ゼブラフィッシュは再生能が高く、生涯を通じ細胞を再生できる。しかしながら、再生してくる細胞の源やその再生過程の細胞機構の詳細について多くのことが不明であった。

私は、複数のゼブラフィッシュの遺伝子改変動物を用い、(1)すべての再生してくる細胞がNeurod1発現細胞から生じること、(2)ゼブラフィッシュの「機能の再生期」と「形態の再生期」という2つの期間を経て、機能も形態も完全な細胞を再生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

ヒトでは再生が難しい組織(細胞)の再生を行える高い動物の再生過程の詳細な解析を行い、この動物が細胞の再生に利用する細胞を明らかにし、これらを用いどのように再生するのかその細胞機構を解明した。本研究は、現在哺乳類で行われているiPS細胞などを用いた再生研究とは異なる潮流の研究であり、これまでにない新たな視点から哺乳類の細胞の再生を行わせるための研究提案を行うことが可能なものであった。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cells, which produce Insulin, play a central role for glucose homeostasis. Regenerative capacity of mammalian cells is limited and that loss of cells causes diabetes. In contrast, even adult zebrafish has high regenerative capacity of pancreatic islets, including cells, making them an attractive model for the study of cell regeneration. However, fundamental questions remain, such as when cell regeneration is completed and what is the cellular source of regenerating cells. Here I showed that pancreatic cell regeneration is complete 14 days after cell ablation by two-step regeneration process, first regenerating function and then regenerating morphology. In addition, I found that pancreatic cells arise from neurod1 expressing cells, which contacted with pancreatic cells directly, during cell regeneration. Altogether, my results shed light on the basic cellular mechanisms underlying cell regeneration.

研究分野：発生生物学

キーワード：膵細胞 再生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュは高い再生能を持ち、ヒトでは行えない膵細胞の再生を可能であることが知られていた。しかしながら、この再生過程の統轄的な研究は行われておらず、どの細胞を用い、どのような再生過程を経て、ゼブラフィッシュが再生するのかわかっていなかった。一方で、先行研究により、主要な再生源の可能性をもつ細胞(N1細胞)の特定に成功していた。

### 2. 研究の目的

(1)ゼブラフィッシュ細胞再生過程がどのような過程を経て、どのような細胞が関与し、いつ再生が完了するのかその詳細を明らかにする。

(2)ゼブラフィッシュの細胞再生過程におけるN1細胞の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)膵臓を構成する細胞特異的に蛍光タンパク質を発現する複数の遺伝子組み換えゼブラフィッシュ(TG)を用い、細胞破壊後の蛍光タンパク質によりラベルされた細胞の挙動を明らかにする。さらに、細胞破壊後の血糖値もしくは生体グルコース変化を解析する。

(2)N1細胞特異的にCreならびにCreERT2を発現するTGシステムを作製し、Cre/loxpならびにCreERT2/loxpシステムを利用し、N1細胞の細胞の寄与率を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) *ins:H2BGFP* TG系統の仔魚を用い、細胞破壊後の細胞数の変化を観察した。その結果、細胞破壊後2日目までに最初の細胞が再生し、その後細胞数が増加し、破壊後13日目までに細胞破壊していない仔魚と同数まで細胞数が回復することが明らかとなった。

次に、いつ機能的な細胞が再生するのか知る目的で、細胞破壊後のゼブラフィッシュ仔魚の生体グルコース量の変化を観察したところ、細胞破壊後、5日目までに回復することが明らかとなった。

このように、ゼブラフィッシュ仔魚細胞再生過程では細胞数の回復と機能の回復にはギャップがあることが明らかになった。これらのことは、ゼブラフィッシュ仔魚では細胞の再生過程が「機能の再生」と「形態の再生」という2つのフェーズを持つことが明らかとなった(図)。

(2) *gca:eGFP* TG系統の仔魚を用い、細胞破壊後の細胞と再生してくる細胞の関係を観察した。その結果、細胞は常に細胞と隣接する細胞から生じることが明らかとなった。

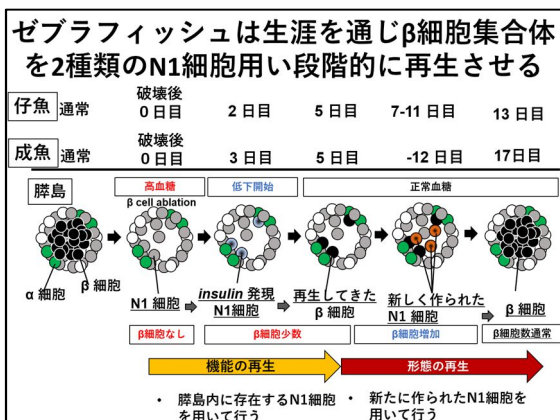
(3) 先行研究で、*Neurod1*発現細胞(N1細胞)が再生してくる細胞の主要な源である可能性を示唆していた。そこで、N1細胞で、Cre組み換え酵素を発現する*neurod1:Cre* TGシステムを新たに作製した。さらにこのTGシステムに*ins:loxp-mCherry-loxp-H2BGFP/ins:NTR* TGシステムを交配させることにより、*neurod1:Cre/ins:loxp-mCherry-loxp-H2BGFP/ins:NTR* ダブルTGシステムを作製した。このダブルTGシステムは、N1細胞から生じた細胞では、H2BGFPを発現し、N1細胞以外の細胞から生じた細胞はmCherryを発現することによりこれら細胞を区別できる。そこでこのダブルTG系統の仔魚において細胞破壊後の表現を解析したところ、再生してきたすべての細胞がH2BGFPを発現していた。このことは、再生してきたすべての細胞がN1細胞から生じることを示唆していた。

(4) 細胞破壊直後の膵臓には非常に多くのN1細胞が存在する。細胞破壊直後N1細胞が、再生してくるすべての細胞を担っているのか興味を持つようになった。*neurod1:CreERT2* TGシステムを新たに作製し、*ins:loxp-mCherry-loxp-H2BGFP/ins:NTR* TGシステムと交配させ、*neurod1:CreERT2/ins:loxp-mCherry-loxp-H2BGFP/ins:NTR* ダブルTGシステムを作製した。このダブルTG系統の細胞は、一時的にtamoxifenを含む飼育水で飼育すると、tamoxifenを含む飼育水で飼育した期間にN1細胞だった細胞から生じたときH2BGFPを発現し、それ以外の期間のN1細胞から生じたときmCherryを発現する。そこで、細胞破壊直後から1日目までの間にtamoxifenを含む飼育水で飼育した*neurod1:CreERT2/ins:loxp-mCherry-loxp-H2BGFP/ins:NTR* ダブルTG系統の仔魚を用い、細胞再生過程における表現型を解析したところ、「機能の再生期」に再生してきた細胞はすべてH2BGFPを発現するのに対し、「形態の再生期」に生じる細胞はすべてmCherryを発現することが明らかとなった。このことは、「機能の再生期」に再生してきた細胞は細胞破壊直後に膵臓に存在するN1細胞から生じたものであり、「形態の再生期」に再生してきた細胞は細胞再生過程の間に新たに分化したN1細胞から生じたものであることを示唆していた。さらに、形態の再生期の複数のタイムポイントで

もう1度 tamoxifen を含む水で飼育する実験を行うことにより、細胞破壊後7日目から11日目までの間に新たに生じた N1 細胞が、「形態の再生期」に再生してくる細胞の源であることも明らかにした(図)。

(5) 以上の研究は仔魚を用いて行ってきた。ゼブラフィッシュの成魚の細胞の再生も仔魚と同じ様式を使っているのか確認を行った。その結果、ゼブラフィッシュ成魚の細胞も、機能と形態を段階的に再生し、成魚の「機能の再生期」は細胞破壊後5日目までに完了させ、「形態の再生期」は破壊後17日目までに完了することが明らかとなった。また、成魚の再生してきた細胞もすべて N1 細胞から生じることも明らかとなった。さらに成魚の「機能の再生期」に再生してくる細胞も、細胞破壊前から膵臓に存在する N1 細胞から生じること、一方、「形態の再生期」に再生してくる細胞は、細胞破壊後12日目までに新たに生じた N1 細胞から生じることが明らかにした(図)。

これ卵の結果はゼブラフィッシュの細胞は仔魚、成魚を含め生涯を通じ、異なる細胞系譜の N1 細胞を源に機能と形態を段階的に再生することを示唆していた(図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Matsuda Hiroki, Kubota Yukihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Zebrafish pancreatic cell clusters undergo stepwise regeneration using Neurod1-expressing cells from different cell lineages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Research Square	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.rs-1311427/v1	査読の有無 無
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 Blitz Einat, Matsuda Hiroki, Guenther Stefan, Morikawa Takuto, Kubota Yukihiro, Zada David, Lerer-Goldshtein Tali, Stainier Didier Y R, Appelbaum Lior	4. 巻 162
2. 論文標題 Thyroid Hormones Regulate Goblet Cell Differentiation and Fgf19-Fgfr4 Signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab047	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 松田大樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ成魚における膵 細胞集合体の再生
3. 学会等名 第8回ゼブラフィッシュメダカ創薬研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田大樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュは異なる細胞系譜のNeurod1発現細胞を用い膵 細胞集合体を段階的に再生する
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Matsuda
2. 発表標題 Zebrafish pancreatic cell clusters undergo stepwise regeneration using Neurod1-expressing cells from different cell lineages
3. 学会等名 第28回小型魚類研究会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Matsuda
2. 発表標題 Zebrafish pancreatic cell clusters undergo stepwise regeneration using Neurod1-expressing cells from different cell lineages
3. 学会等名 第55回日本発生物学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田大樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ膵 細胞集合体は細胞系譜が異なるNeurod1発現細胞を用い機能と形態を再生する
3. 学会等名 日本動物学会近畿支部研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Matsuda
2. 発表標題 Zebrafish pancreatic cells regenerate function and morphology in a stepwise manner using Neurod1-expressing cells from different cell lineage
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田大樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの膵 細胞集合体は異なる細胞系譜のNeurod1発現細胞を用い機能と形態を段階的に再生させる
3. 学会等名 第7回ゼブラフィッシュ創薬研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田大樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュはNeurod1発現細胞を源に膵 細胞を再生する
3. 学会等名 日本動物学会第92回オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Matsuda
2. 発表標題 Neurod1 expressing cells are a major source for the regenerating pancreatic cell in zebrafish
3. 学会等名 第54回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Matsuda
2. 発表標題 Analysis of cell behaviors in the pancreatic islets during pancreatic cell regeneration in zebrafish
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田大樹、萬年太郎、久保田幸彦
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ 細胞再生過程における腓島構成細胞の解析
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平田普三、酒井則良、飯田敦夫、亀井宏泰、伊藤素行、武藤 彩、宮坂信彦、川上浩一、川原敦雄、東島眞一、木村有希子、浅川和秀、鑓迫典久、松田大樹、横井勇人、岡本仁、日比正彦、清水貴史、橋本寿史、井原邦夫	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 148
3. 書名 ゼブラフィッシュ実験ガイド	

〔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			
イスラエル	Bar-Illran University			
ドイツ	Max Planck Institute			