

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860213

研究課題名(和文)膵腺房細胞から 細胞への分化転換の研究

研究課題名(英文)Transdifferentiation of pancreatic exocrine cells to beta cells

## 研究代表者

宮崎 早月 (Miyazaki, Satsuki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60452439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腺房細胞特異的にPdx1およびIsl1を発現制御できるマウスを樹立し、成体になってからPdx1とIsl1を同時に腺房細胞において過剰発現させると、膵島に腺房細胞由来のEGFP陽性インスリン産生細胞が出現した。一方、EGFP陽性腺房細胞を、FACSを用いてソーティングし、in vitroにおいて分化転換に必要と思われる因子を、レンチウイルスを用いて導入発現させると、腺房細胞由来のインスリン産生細胞が出現した。さらなる検討が必要であるが、腺房細胞から 細胞へin vitro分化転換できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：I established a transgenic mouse line in which Pdx1 and Isl1 could be inducibly expressed in the acinar cells. My results showed that acinar-derived EGFP-positive insulin producing cells appear by induction of both Pdx1 and Isl1 in adult exocrine cells. Overexpression of the factors necessary for transdifferentiation using lentiviral vectors in sorted EGFP-positive acinar cells induced acinar-to-beta cell transdifferentiation. Although further study is required, my result provides a promise for the in vitro transdifferentiation of exocrine cells to beta cells.

研究分野：再生医学

キーワード：転写因子 腺房細胞 インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者数は年々増加している。重度の患者に対し、膵臓移植や膵島移植が抜本的な治療法であるがドナーは絶対的に不足している。そのため、膵細胞を *in vivo* あるいは *in vitro* で再生する研究に期待が寄せられている。これまで様々な細胞から膵細胞への分化誘導が研究されてきたが、腺房細胞からインスリン産生細胞への分化転換については、必ずしも一致した見解は得られていない。Desai らは、腺房細胞をマーキングした lineage tracing 実験を行ったが、腺房細胞が膵細胞に分化転換することはなかったと報告した (Desai BM et al, *J Clin Invest*. 117:971-977, 2007)。一方、Zhou らは、3つの転写因子 (Ngn3+Pdx1+MafA) を導入すると、成体マウスの腺房細胞をリプログラミングして、膵細胞によく似た細胞に直接変えることができたことを報告した (Zhou Q et al, *Nature* 455:627-632, 2008)。

申請者は、膵発生に必要な不可欠な転写因子である Pdx1 に着目して研究を進めてきた。これまでに Pdx1 を膵臓で過剰発現させた報告は3つある。Elastase プロモーター下で Pdx1 を過剰発現させた報告では、胎生期 18 日目で amylase/insulin 共陽性細胞が見られ、生後 4 週齢になるとインスリン陽性のシングル細胞が多く観察されたことから、腺房細胞から細胞へ発生過程で変化したことが示唆された (Heller RS et al, *Diabetes* 50:1553-1561, 2001)。Ptfla 陽性細胞特異的に CAG プロモーター下で Pdx1 を発現させた報告では、腺房細胞から導管細胞 (acino-ductal) への分化転換が見られた (Miyatsuka T et al, *Genes Dev* 20:1435-1440, 2006)。さらに Ngn3 プロモーター下で Pdx1 を強制発現した報告では、細胞が細胞へリプログラミングしたという (Yang YP et al, *Genes Dev* 25:1680-1685, 2011)。これらの報告では、膵臓の発生過程を含めて Pdx1 遺伝子が発現しており、成熟した膵細胞における効果を見たものではなかった。

## 2. 研究の目的

申請者は、腺房細胞において Pdx1 過剰発現下で Isl1 を導入発現させると、再生の場である tubular complex が広範囲に出現することを以前報告した。この結果から Pdx1/Isl1 が膵再生を促進する役割を果たしていると推測される。さらにその後の研究で、Pdx1 を単独で長期過剰発現させると腺房細胞がインスリン産生細胞へリプログラミングされることが分かってきた。本研究では Pdx1/Isl1 共発現下における膵再生メカニズムを解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) 腺房細胞特異的に Cre を発現する Elastase-Cre トランスジェニックマウスと

Pdx1 発現制御カセット (ROSA26-loxP-neo<sup>r</sup>-loxP-tTA-insulator-Tet0-Pdx1-IRES-EGFP) がノックインされたマウス、そして Isl1 発現制御カセット (ROSA26-loxP-neo<sup>r</sup>-loxP-tTA-insulator-Tet0-Isl1-IRES-EGFP) がノックインされたマウスを交配し、3つのトランスジーンを持ったマウス (Elastase-Cre/Pdx1/Isl1) を得た。このマウスは、腺房細胞特異的に Cre が発現すると、loxP で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子が切り取られるため、Tet-Off の系により Pdx1/Isl1 の発現制御が可能となる。飲用水にあらかじめ加えておいた Dox を 4 週齢から抜き (Pdx1/Isl1 の過剰発現) 経時的に膵組織を摘出して切片を作製した。作製した切片を膵関連抗体 (Insulin, Glucagon, Somatostatin, PP, Pdx1, Isl1, MafA, Pax6, Amylase, HNF1, CK19, Ngn3, Nkx2.2, Nkx6.1 など) をもちいて免疫染色を行った。

(2) 8 週齢の Elastase-Cre/Pdx1/Isl1 マウスの飲用水から Dox を除いて、さらに 4-5 週間後に腺房細胞を回収した。まず、Elastase-Cre/Pdx1/Isl1 マウスの総胆管からコラゲナーゼを導入した膵臓を摘出し、ジチゾンにより膵島を染色し、ハンドピックにより膵島や膵管を取り除き、腺房細胞のみ残した。さらに alloxan 処理を行い、完全に細胞を除いた。申請者らの系では、Pdx1/Isl1 を発現する腺房細胞は、EGFP でマーキングされるため、FACS により EGFP 陽性腺房細胞を単離することも可能である。得られた Pdx1/Isl1 発現腺房細胞を EGF や LIF、nicotinamide、notch シグナル阻害剤などを添加して培養し、Dox 存在下あるいは Dox 非存在下におけるインスリン産生細胞の出現効率や増殖能の有無を、免疫染色などをもちいて検討した。

(3) ほぼすべての腺房細胞において Pdx1/Isl1 が過剰発現するため、腺房細胞のリプログラミングが効率よく起こると期待されるものの、それだけでは不十分である可能性があるため、その他の膵発生・再生関連因子を腺房細胞に導入した。まず、MafA や Ngn3 などの膵細胞の再生に効果があると考えられる遺伝子やリプログラミング効率を上げると考えられる shMbd3 を発現するレンチウイルスベクターを作製し、Elastase-Cre/Pdx1 マウス由来の腺房細胞や Elastase-Cre/Pdx1/Isl1 マウス由来の腺房細胞に導入し、Pdx1 や Isl1 発現下におけるインスリン産生細胞へのリプログラミング効率を免疫染色にて検討した。

## 4. 研究成果

(1) Elastase-Cre/pdx1/Isl1 マウスを3種類の系統をかけ合わせて作製した。経時的に膵組織を摘出して切片を作製し、膵関連抗体をもちいて免疫染色を行った。成体マウス

では、一般的に Pdx1 は膵島においてのみ発現しているため、Dox 存在下では膵島のみが Pdx1 陽性になり膵組織像も正常である。一方、Dox を除いて腺房細胞において Pdx1 を過剰発現させて約 5 週間経過すると、EGFP/CK19(導管細胞のマーカー) 共陽性細胞が増加し、acino-ductal 分化転換が起こっていることが観察された。またその頃から膵島中の細胞の一部に EGFP 陽性細胞が観察されるようになり、腺房細胞からインスリン産生細胞へのリプログラミングが示唆された。Elastase-Cre/Pdx1/Is11 マウスにおいては、このような変化は Elastase-Cre/Pdx1 マウスよりも早く起きている可能性が示唆された。

(2) Pdx1/Is11 を過剰発現させた腺房細胞の単離培養を行ったが、それだけではインスリン産生細胞への分化転換はほとんど起こらなかった。そこで、Pdx1/MafA/Ngn3 を発現するレンチウイルスベクターと shMbd3 を発現するレンチウイルスベクターを作製した。そして Elastase-Cre/Pdx1 マウス由来の腺房細胞や Elastase-Cre/Pdx1/Is11 マウス由来の腺房細胞を FACS により単離し、レンチウイルスベクターを組み合わせて導入し、Pdx1 や Is11 発現下におけるインスリン産生細胞へのリプログラミング効率を免疫染色にて検討した。その結果、insulin と MafA、あるいは insulin と ngn3 を発現する GFP 陽性細胞(腺房細胞由来)が出現した。まだ分化転換効率は低いものの、本実験系が有効であることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

宮崎早月, 宮崎純一: エレクトロポレーションによる生体への遺伝子導入. *Surgery Frontier* 21(4): 62-66, 2014 査読無

Lee J, Sugiyama T, Liu Y, Wang J, Gu X, Lei J, Markmann JF, Miyazaki S, Miyazaki J, Szot GL, Bottino R, Kim SK. Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. *Elife* 2: e00940, 2013 査読有

Miyazaki T, Miyazaki S, Ashida M,

Tanaka T, Tashiro F, Miyazaki J. Functional analysis of Tc11 using Tc11-deficient mouse embryonic stem cells. *PLoS One* 8: e71645, 2013 査読有

[学会発表](計4件)

松浦 巧, 宮崎 竜志, 宮崎 早月, 田代 文, 宮崎 純一: Ces1 遺伝子欠損マウス胎仔におけるヒストン H3K9 及び DNA メチル化レベルの亢進と胎生致死・成長遅延および始原生殖細胞の分化異常. 日本分子生物学会, パシフィコ横浜(横浜) 2014.11.25-27 (ポスター発表)

小林 正樹, 倭 英司, 田辺 光志, 田代 文, 宮崎 早月, 宮崎 純一: 膵ベータ細胞株 MIN6 においてグルコース応答性インスリン分泌(GSIS)に関わる新規候補遺伝子の機能解析. 第57回日本糖尿病学会, 大阪国際会議場(大阪) 2014.5.22-24 (ポスター発表)

宮崎 早月, 田代 文, 倭 英司, 宮崎 純一: Foxo1 欠損膵ベータ細胞株の解析. 第56回日本糖尿病学会, 熊本市現代美術館(熊本) 2013.5.16-18 (ポスター発表)

倭 英司, 田代 文, 田辺 光志, 宮崎 早月, 宮崎 純一: MafA 欠損膵ベータ細胞株を用いた MafA 制御遺伝子とその機能解析. 第56回日本糖尿病学会, 熊本市現代美術館(熊本) 2013.5.16-18 (ポスター発表)

[図書](計1件)

宮崎早月, 宮崎純一: 第10章 再生「医学のための生命科学」. 南山堂, 2014 査読無

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 早月 (MIYAZAKI SATSUKI)  
大阪大学大学院・医学系研究科・助教  
研究者番号：60452439