

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860757

研究課題名(和文) PPY細胞の細胞系譜の解明—新規糖尿病治療法開発に向けて

研究課題名(英文) Elucidation of PPY cell lineage for development of new diabetes treatment

研究代表者

原 朱美 (Hara, Akemi)

順天堂大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60570009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：目的：糖尿病発症機構における細胞とPPY細胞間の分化転換の可能性を示し、その生理的意義を解明する。方法：RIP-Cre;Rosa26R-GFPマウスにHF+STZ負荷し、血糖値上昇、細胞減少、PPY細胞増加が認められる2型糖尿病マウスを作製、細胞の細胞系譜を追跡した。PPY-Cre;Rosa26R-YFPマウスを作製し、PPY細胞の細胞系譜追跡を開始した。結果：持続的高血糖により、細胞ではPdx1発現が低下、PPY細胞への分化転換が誘導されることが明らかとなった。一方、正常な発生過程では、膵島内の一部のインスリン陽性細胞がPPY細胞を由来とすることを確認し、現在詳細な解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Persistent hyperglycemia with obese results in reduced pancreatic beta cell function and mass, and increased pancreatic polypeptide (PP) cells. The aim of this study was to elucidate the mechanism of the fate conversion between beta and PP cells, using lineage traceable mice, which were given high fat diet and STZ. The increased PP cells were found to originate from the pre-existing beta cells. The expression of a-beta cell specific transcription factor, Pdx1 was downregulated. By the knockdown of Pdx1 in MIN6 cells induced increment of PP mRNA expression. These results demonstrate the possibility that persistent hyperglycemia can induce beta to PP cell fate conversion in adult pancreas by the attenuation of Pdx1. Furthermore, we found evidence that Some beta cells were originated from pre-existing PP cells during development. Hence, we are investigating the mechanisms underlying the reciprocal fate conversion between PP and beta cell lineages in pathophysiological conditions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：PPY細胞 細胞 分化転換 細胞系譜 糖尿病 高血糖

1. 研究開始当初の背景

膵ランゲルハンス島 (膵島)は、 α 、 β 、 δ 、 ϵ 、PPY 細胞の 5 種類から構成される。膵島は、インスリン産生 β 細胞が球形の細胞集塊としてその大部分を占める。その他の 4 種類の細胞は、 β 細胞集塊の辺縁に少数分布する。そして、 α 、 β 、 δ 、 ϵ 細胞の分化過程などについては多くの研究がなされている。PPY 細胞の細胞系譜については、Herrera PL らが、PPY プロモーター制御下に、ジフテリア A 毒素を発現させ、強制的に PPY 遺伝子発現細胞を破壊し、PPY 遺伝子発現細胞の細胞系譜を追跡した。結果、 β 細胞と PP 細胞が消失し (1)、PPY 遺伝子を発現する細胞が β 細胞と PP 細胞の分化に必須であると結論したが、いくつかの問題点が残る。最大の問題は、マウス作製に用いた PPY 遺伝子プロモーター配列が十分に解析されていないものであり、**内因性 PPY 遺伝子の発現をどれだけ反映しているのか保証の限りではない**という点である。したがって、**PPY 細胞の細胞系譜は現在明らかではない**。しかし、本研究課題で用いた PPY-Cre ノックインマウスは、Cre 配列挿入部位が PPY 遺伝子開始コドン直後と明確であり、さらに、PPY-Cre ノックインマウスにおいては PPY の coding sequence の 5' および 3'flanking lesion を可能な限り欠損せずに保持している。したがって、PPY 細胞の細胞系譜追跡のための方法としては最も生理的である。本研究課題により得られた結果は、最も正確な PPY 細胞の細胞系譜、さらに将来的には PPY 遺伝子の機能を証明することができ、糖尿病治療法の開発という臨床応用へと結びつけることが可能である。

PPY 細胞はどのような細胞系譜をとるのか？

これまでの申請者らの解析により、2 型糖尿病モデルである高脂肪食及びストレプトゾトシンを負荷したマウス (HF+STZ) と

db/db マウスでは、随時血糖値が 400mg/dL 以上という高血糖をきたし、 β 細胞が減少する一方、PPY 細胞が増加することを認めた。db/db マウスについては同様の結果が報告されている (2)。また増加した PPY 細胞は膵島内で散在性に存在する。膵島が複数の由来をもつ細胞の集まりであるという既報 (3, 4) から、申請者は、膵島内には PPY 細胞由来の β 細胞と、非 PPY 細胞由来の β 細胞が混在しており、**発生過程で PPY 細胞から β 細胞へと分化した細胞が、ある条件下で再び PPY 細胞へと脱分化する能力を保持しているのではないか**と考えた。そして、血糖値の上昇など生理的条件の変化に応じて、分化転換制御機構が働き、 β 細胞から PPY 細胞への脱分化が起こるものと推測した。この過程において、血糖上昇のどの段階で β 細胞の減少および PPY 細胞の増加が開始されるのかを明らかにし、また PPY 欠損マウスを用いて PPY 細胞増加による生体への影響を解明することによって、糖尿病と PPY 細胞の関連性の詳細を明らかにすることができる。そこで本研究課題では、PPY 遺伝子ノックインマウスを作製し、胎生初期から成体における PPY 細胞の細胞系譜を明らかにすることとした。

β 細胞から PPY 細胞への分化転換の可能性は？

PPY 細胞が増加するマウスの共通点は、過食、高カロリー食による肥満と高血糖である。申請者は、摂食抑制や糖毒性によって生じた β 細胞障害を代償するため、 β 細胞から PPY 細胞への分化転換が起きたのではないかと推測した。しかしこれまでの申請者らの検討では、「 β 細胞の減少と PPY 細胞の増加」という最終的な膵組織変化からの推測のみで、PPY 細胞の起源、他の膵島細胞との関係性、PPY 細胞増加の生理的意義については全く明らかにされていない。申

請者は、正常状態では少数しか存在しない PPY 細胞が生理的变化によって増加することから、PPY 細胞には特別な機能があるのではないかと推測した。そこで、PPY 細胞の細胞系譜を解明した後、**なぜ特定の条件下で PPY 細胞が増加したのか**を、β細胞から PPY 細胞への分化転換の可能性を踏まえて解析する。

2 . 研究の目的

Pancreatic polypeptide (PPY)細胞は、膵島辺縁領域に少数存在する膵内分泌細胞であり、内分泌ホルモンである PPY を産生する。一部の 2 型糖尿病モデルマウスでは、血糖値上昇に伴い、β細胞が減少し、PPY 細胞が増加するが、生理的条件下での PPY 細胞の細胞系譜は明らかになっていない。本研究課題の目的は、**β細胞から PPY 細胞、PPY 細胞からβ細胞など他の膵島細胞への分化転換の可能性を示し、糖尿病発症機構における生理的意義を解明すること**である。ノックインマウスを使用し、発生と疾患における PPY の細胞系譜の追跡により、PPY 細胞とβ細胞間の分化転換機構とその生理的意義が解明され、PPY 細胞が新たなβ細胞の起源となる可能性を示すことが期待できる。

3 . 研究の方法

1. 細胞から PPY 細胞への分化転換の可能性の解明

(1) インスリン分泌が低下する 2 型糖尿病モデルマウスの作製

4 週齢より高脂肪食 (HF)の持続的負荷を開始し、7 週齢時に STZ を腹腔内投与した。高血糖に至るまでの血糖値を測定し、21 週齢にて膵臓を摘出、主に免疫組織化学的解析を行い、高血糖となり、PPY 細胞が増加する STZ 負荷量を 133mg/kg に決定した。

(2) 細胞から PPY 細胞への分化転換の可能性の解明

インスリン遺伝子を発現する細胞を追跡するため、Rat InsulinII promoter-driven Cre マウス (RIP-Cre) と Rosa26 promoter-driven eGFP マウス (Rosa26R-GFP)を交配し、両者のトランスジェーンを有する個体 (RIP-Cre; Rosa26R-GFP)を作出した。RIP-GFP を用いて、(1)のプロトコールで 2 型糖尿病マウスを作製した。21 週齢にて膵臓を摘出、免疫組織化学的解析により、GFP 陽性細胞における PPY 細胞の割合を評価した。β細胞から PPY 細胞への分化転換が確認できたことから、β細胞から PPY 細胞までの分化転換の過程を明らかにするため、転写因子などの発現を主に免疫組織化学的手法、分子細胞生物学的手法を用いて解析した。

2. 生理的条件下における PPY 細胞の細胞系譜の解明

(1) PPY ノックインマウスの作製

PPY 細胞の細胞系譜を追跡するため、PPY 遺伝子を一度でも活性化すれば、細胞で GFP が発現するマウス (PPY-Cre; Rosa26R-GFP) を作製した。PPY-Cre; Rosa26R-GFP 作製には、PPY promoter-driven NLS-Cre ノックインマウス (PPY-Cre)と Rosa26 promoter-driven GFP マウス (Rosa26R-GFP)の 2 種類のマウスを必要とする。本研究課題では、PPY 遺伝子の開始コドン直後に Cre リコンビナーゼ (Cre)配列を挿入した、PPY-Cre ノックインマウス (PPY-Cre)を作製した。PPY-Cre では、PPY 遺伝子の開始コドンが翻訳されると、内因性 PPY 遺伝子のかわりに Cre 遺伝子が翻訳される。Rosa26R-GFP は既存の個体を用いた。

(2) 発生過程における PPY 細胞の追跡

PPY-Cre; Rosa26R-GFP を用いて、胎生初期から膵発生が完了するステージにおける PPY 遺伝子発現細胞の細胞系譜を免疫組織化学的に追跡する。本研究課題では、まず

成体の膵島内 細胞の中に PPY 細胞を由来とする細胞の有無を確認した。

4. 研究成果

1. 細胞から PPY 細胞への分化転換の可能性の解明

「高血糖で増加した PPY 細胞は 細胞を由来とする」

HF 負荷および STZ 133mg/kg 腹腔内投与により、持続的高血糖、細胞の減少、PPY 細胞の増加等の条件を満たしたことから、本研究課題の遂行に適切な 2 型糖尿病モデルとして解析に用いた。さらに、持続的な高血糖で減少する 細胞の細胞系譜を追跡するため、一度でもインスリン遺伝子を発現した細胞では GFP が発現し、細胞の細胞系譜を追跡できる Rat InsulinII promoter-driven Cre; Rosa26R promoter-driven eGFP (RIP-Cre; Rosa26R-GFP) マウスで、前述した 2 型糖尿病モデルを作製し、組織学的解析を行った。解析の結果、膵島内のインスリン陽性細胞数は有意に低下し、PPY 陽性細胞数が増加した。細胞の細胞系譜を解析した結果、膵島内では多くの GFP 陽性インスリン陰性細胞が認められた。これらの GFP 陽性細胞の中には GFP 陽性 PPY 陽性細胞が観察された。グルカゴン、ソマトスタチン陽性細胞も増加したが、これらは全て GFP 陰性であった。細胞では、Pdx1 と Nkx6.1 の発現が低下し、多くの Pdx1 陰性 Nkx6.1 陰性 GFP 陽性細胞が認められた。これらの変化は HF 負荷のみでは認められなかった。さらに MIN6 細胞において Pdx1 をノックダウンすると PPY 細胞が出現した。以上の結果、持続的高血糖は膵 細胞で Pdx1 発現低下をもたらす、細胞から PPY 細胞へと選択的な分化転換を誘導することが明らかとなった。

2. 生理学的条件下における PPY 細胞の細

胞系譜の解明

PPY 遺伝子発現細胞の細胞系譜を追跡するため、PPY promoter-driven NLS-Cre ノックインマウス (PPY-Cre) と Rosa26R promoter driven eGFP マウス (Rosa26R-GFP) であった。本研究課題では、PPY-Cre を作製した後、PPY-Cre; Rosa26R-eGFP を作製し、解析に用いた。成体における PPY-Cre; Rosa26R-GFP のインスリン、PPY、GFP の発現を観察した結果、膵島内の一部のインスリン陽性細胞が GFP 陽性となり、PPY 遺伝子発現細胞はインスリン遺伝子発現細胞への分化能を有することを確認した。現在、PPY-Cre; Rosa26R-GFP マウスを用いて、胎生期から成体、糖尿病状態における PPY 細胞の細胞系譜の追跡を進めている。

引用文献

1. PNAS 91 (26), 12999-3003, 1994
2. Diabetes 27, 1-7, 1978
3. Development 112 (4), 1115-1121, 1991,
4. Dev. Dyn. 236 (12), 3451-3458, 2007

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6件)

1. Yamamoto E, Uchida T, Abe H, Taka H, Fujimura T, Komiya K, Hara A, Ogihara T, Fujitani Y, Ueno T, Takeda S, Watada H. Increased expression of ERp57/GRP58 is protective against pancreatic beta cell death caused by autophagic failure. Biochem Biophys Res Commun. 2014, 453 (1): 19-24.
2. Shigihara N, Fukunaka A, Hara A, Komiya K, Honda A, Uchida T, Abe H, Toyofuku Y, Tamaki M, Ogihara T, Miyatsuka T, Hiddinga HJ, Sakagashira S, Koike M, Uchiyama Y, Yoshimori T, Eberhardt NL, Fujitani Y, Watada H. Human IAPP-induced pancreatic cell toxicity and its regulation by autophagy.

J Clin Invest. 2014, 124 (8): 3634-44.

3. Abe H, Uchida T, Hara A, Mizukami H, Komiya K, Koike M, Shigihara N, Toyofuku Y, Ogihara T, Uchiyama Y, Yagihashi S, Fujitani Y, Watada H. Exendin-4 improves β -cell function in autophagy-deficient β -cells. Endocrinology. 2013, 154 (12): 4512-24

4. Medina A, Yamada S, Hara A, Hamamoto K, Kojima I. Involvement of the parasympathetic nervous system in the initiation of regeneration of pancreatic β -cells. Endocr J. 2013, 60 (5): 687-96.

5. Ishibashi K, Hara A, Fujitani Y, Uchida T, Komiya K, Tamaki M, Abe H, Ogihara T, Kanazawa A, Kawamori R, Watada H. Beneficial effects of vildagliptin combined with miglitol on glucose tolerance and islet morphology in diet-controlled db/db mice. Biochem Biophys Res Commun. 2013, 440 (4): 570-5.

6. Tamaki M, Fujitani Y, Hara A, Uchida T, Tamura Y, Takeno K, Kawaguchi M, Watanabe T, Ogihara T, Fukunaka A, Shimizu T, Mita T, Kanazawa A, Imaizumi M, Abe T, Kiyonari H, Hojyo S, Fukada T, Kawauchi T, Nagamatsu S, Hirano T, Kawamori R, Watada H. The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. J Clin Invest. 2013, 123 (10): 4513-24.

〔学会発表〕(計4件)

1. 原 朱美、藤谷 与士夫、荻原 健、宮塚 健、綿田 裕孝、ヒト型 IAPP は膵島移植の成功率を低下させる、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、演題番号 II-17-11、口頭発表、山口、2015 年 5 月
2. 原 朱美、藤谷 与士夫、荻原 健、宮塚 健、綿田 裕孝、ヒト型 IAPP は膵島

移植の成功率を低下させる、第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会、演題番号 29、口頭発表、京都、2015 年 2 月

3. 原 朱美、藤谷 与士夫、田蒔 基行、荻原 健、宮塚 健、福中 彩子、小宮 幸次、荻原 健、金澤 昭雄、綿田 裕孝、持続的高血糖は膵 β 細胞から PP 細胞への分化転換を誘導する、第 10 回 Diabetes Research Forum in Tokyo、演題 3、東京、2014 年 10 月

4. 原 朱美、藤谷 与士夫、田蒔 基行、荻原 健、宮塚 健、福中 彩子、小宮 幸次、荻原 健、金澤 昭雄、綿田 裕孝、持続的高血糖は膵 β 細胞から PP 細胞への分化転換を誘導する、第 28 回日本糖尿病肥満動物学会、一般演題 7、宮崎、2014 年 2 月、若手研究奨励賞受賞

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
原 朱美 (HARA, Akemi)
順天堂大学大学院・医学研究科・代謝内分泌内科学・博士研究員

研究者番号：60570009

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：