

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650228

研究課題名(和文) *in vivo*イメージングを用いた膵内分泌細胞の細胞運命決定機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cell fate determination mechanism of pancreatic endocrine cells using *in vivo* imaging

研究代表者

高橋 智 (Takahashi, Satoru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50271896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵細胞の細胞運命の揺らぎが、新たな糖尿病進展のメカニズムであることを明らかにすることを目的とする。そして、この不安定性に伴う膵内分泌細胞の可塑性が、インスリン抵抗性を含む糖尿病病像の多様性や、疾患の増悪因子として関与することを明らかにする。この目的を達成するために、新規リアルタイム・イメージング技術をモデル動物に応用した評価系を確立する。

研究成果の概要(英文)：In this study, it is intended to make clear that the fluctuation of the cell fate of pancreatic beta cells is one of the mechanisms of diabetes progression. We also want to reveal that the plasticity of pancreatic endocrine cells associated with the instability is related to insulin resistance and a precipitating factor for the disease. To this end, We want to establish evaluation systems using an animal model and a new real-time imaging techniques.

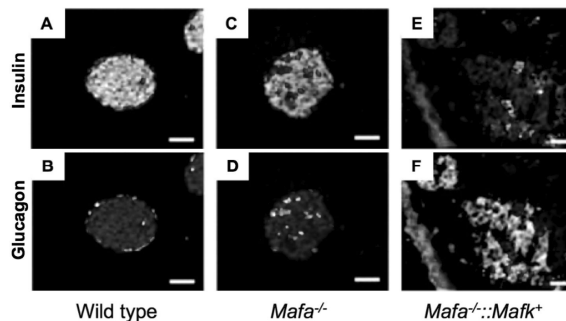
研究分野：発生工学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：発生・分化 糖尿病 細胞・組織 応用動物 再生医学

1. 研究開始当初の背景

膵内分泌細胞は、主にインスリン産生を担う細胞と、グルカゴン産生を担う細胞で構成されている。従来これらの細胞は最終分化細胞と考えられてきたが、一定の条件下で「細胞から細胞、また逆に細胞から細胞へ転換する」ことが、昨年より相次いで報告された。このように、膵内分泌細胞は、生体内のグルコース恒常性を維持するために、生体内外の刺激に応じて、細胞レベルでインスリン分泌とグルカゴン分泌をダイナミックに調節している可能性が示唆された。申請者は、これまで大 Maf 群転写因子を中心に、膵細胞の発生の研究を行ってきたが、最近、細胞と細胞の組織学的局在と数が全く逆転し、重症糖尿病を発症するモデルマウスを開発した (Shimohata H. et al, 2009) (図1)。後述するように、このマウスの膵細胞の細胞系譜の追跡実験を行ったところ、殆どのインスリン陽性細胞は、分化成熟段階でグルカゴン産生細胞へと転換することが明らかとなった。そこで、このモデルマウスの発症メカニズムの詳細な解析によって、細胞と細胞の細胞運命の揺らぎが糖尿病発症の新たなメカニズムとして証明することが可能であると考え、本提案の着想に至った。



(図1)野生型(A,B)、*Mafa* 欠損マウス(C,D)、*Mafa*欠損 *MafK*過剰発現マウス(E,F)のインスリン抗体(上段 A,C,E)とグルカゴン抗体(下段 B,D,F)によるランゲルハンス島の免疫染色像。*Mafa* 欠損 *MafK* 過剰発現マウスでは、グルカゴン陽性細胞 (F) がインスリン陽性細胞(E)を取り囲むような構築の異常を呈する。(Shimohata H. et al, 2009 より改変)

2. 研究の目的

糖尿病の発症・進展に関わるインスリン産生細胞の減少・機能不全に対して、膵細胞の分化不全や、種々のストレスによる細胞死が関与することが明らかとなっている。本研究では、膵細胞の細胞運命の揺らぎが、新たな糖尿病進展のメカニズムであることを明らかにすることを目的とする。そして、この不安定性に伴う膵内分泌細胞の可塑性が、インスリン抵抗性を含む糖尿病病像の多様性や、疾患の増悪因子として関与することを

明らかにする。この目的を達成するために、新規リアルタイム・イメージング技術をモデル動物に応用した評価系を確立する。

3. 研究の方法

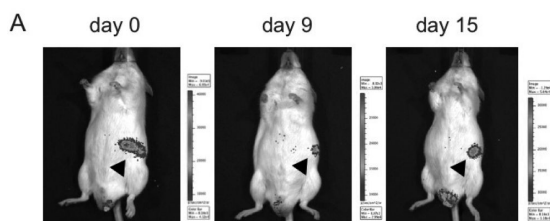
(1)新規糖尿病モデルマウスにおける新たな発症機序の解明

まず、最近我々が報告した *Mafa* 欠損 *Mafk* トランスジェニック (*Mafa*^{-/-::Mafk}) マウスの糖尿病発症機序を明らかにする。このマウスは、細胞の機能的成熟に必須な転写因子 *MafA* の欠損と、小 *Maf* 群転写因子の一つである *MafK* を細胞特異的に過剰発現する二重変異マウスである。転写活性化ドメインを有しない *MafK* は、一義的には *MafA*、*MafB* を含む大 *Maf* 群転写因子に対して、DNA 結合配列上で優勢抑制 (ドミナント・ネガティブ) すると考えられるが、このマウスの細胞における正確な役割は分かっていない。前述の如く、このマウスはインスリン産生を行う細胞とグルカゴン産生を行う細胞とが全く逆転し、生直後より重症糖尿病を発症する (Shimohata H. et al, 2009) (図1)。さらに膵細胞の細胞系譜を追跡するために、このモデルマウスと細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスおよびレポーターマウス (Z/EG マウス) との交配を行ったところ、生後6週の時点で、殆どのインスリン陽性細胞は、グルカゴン陽性細胞に転換していることが明らかになった。一方 *MafA* 遺伝子単独欠損マウスでは、この転換は見られなかった。昨年ジュネーブ大の Herrera 教授らは、マウス細胞に細胞死を誘導し続けると、細胞から細胞転換が生じることを *Nature* 誌に報告した (Thorel F. et al, 2010)。逆に、カリフォルニア大学の研究グループは、DNA メチルトランスフェラーゼの一つである *Dnmt1* 遺伝子の細胞特異的欠損マウスでは、細胞特異的転写因子 *Arx* が活性化することで、細胞から細胞転換が生じることを *Developmental Cell* 誌に報告した (Dhawan S. et al, 2011)。このように、膵内分泌細胞は、生体内のグルコース恒常性を維持するために、生体内外の刺激に応じて、細胞レベルで細胞と細胞を変換させ、インスリン分泌とグルカゴン分泌をダイナミックに調節している可能性が示唆された。したがって、我々の *Mafa*^{-/-::Mafk} マウスにおいて、*MafK* の役割を明らかにすることで、細胞から細胞への分化転換の分子メカニズムを明らかにすることができる。そのために、胎仔、新生仔の膵臓に対して、各種ホルモンに対する抗体を用いた免疫組織学的解析により、分化転換時期の確定を行う。さらに分化転換時期における FLAG 抗体による ChIP シーケンスと遺伝子発現パターン解析を行って、ゲノムワイドに *MafK* の DNA 結合領域および、その標的遺伝子を同定する。トランスジーンである *MafK* は、FLAG タグ融合タンパク質として挿入されているので、

抗タグ抗体を用いることによって、効率的な ChIP シーケンスを実施することが可能である。これらの細胞から細胞転換に関わる新規遺伝子、あるいは既知の遺伝子の中からマスター遺伝子を同定して、糖尿病発症機序を明らかにする。

(2)リアルタイム・イメージングを可能にする評価系モデルの開発

申請者は、日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究(S)「生命科学研究推進の為の新たな *in vivo* イメージングの基盤技術の開発(平成 21-25 年度)」の研究代表者を務めており、発生過程にある胎仔細胞を、マウス体内で非侵襲的に検出可能な技術とモデルを開発した (Sekiguchi Y. et al, 主な発表論文等の雑誌論文(4))。そこで本申請では、その新技術がマウス生体内における細胞間の転換により作出あるいは喪失した細胞の可視化・定量化に応用可能な点に着目した。これまでに、マウスインスリン 1 遺伝子座の人工染色体(BAC)のインスリン遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置換したマウス(MIP-Luc-BAC Tg) を作製し、生物発光を利用して、高感度に細胞量を定量可能な検出系を確立した。図 2 に細胞毒であるストレプトゾトシン投与後の一例を示す(図 2)。さらに、成熟細胞を細胞レベルで追跡可能にするために、MafA 遺伝子座を含む BAC の MafA 遺伝子を赤色系蛍光であるクサビオレンジに置換したマウス(MafA-KusabiraOrange BAC Tg) を作製した。現在、申請者の動物施設に膵臓前駆細胞および細胞をモニターする Pdx1-eGFP マウス、膵臓内分泌細胞をモニターする Ngn3-GFP マウス、インシュリンの産生をモニターする Insulin-DsRed1 マウス、細胞と細胞をモニターする MafB-GFP knockin マウスが導入されており、細胞から細胞への転換時に必要と考えられる種々の分化段階の細胞を、レーザー走査型顕微鏡で蛍光として検出することを可能になりつつある。また、これらの評価系モデルマウスと *Mafa^{-/-}::Mafk⁺* マウスを交配することで、膵内分泌細胞の可塑性を、経時的に可視化、追跡する。



(図 2) ストレプトゾトシン投与前、投与後 9 日、15 日の MIP-Luc-BAC Tg マウスの生物発光イメージング像。糖尿病誘導後 10 日以上に渡って、膵臓におけるインスリン遺伝子活性の低下が検出された。矢印は、それぞれ

の生物発光を示す。

(3)膵内分泌細胞の可塑性が病態生理学的に糖尿病に与える意義

平成 25 年度には、この膵内分泌細胞の持つ可塑性が、病態生理学的に糖尿病に与える意義について解析を行う。図 1 に示したように、*Mafa^{-/-}::Mafk⁺* マウスのランゲルハンス島は、グルカゴン陽性細胞がその殆どを占めるようになるが、グルカゴンによる肝臓でのグリコーゲン分解と糖新生促進作用は、糖尿病患者におけるインスリン抵抗性に関与している (Ling H. et al, 2009)。そこで、このマウスにおける(1)インスリン抵抗性(2)膵グルカゴン含有量および血中グルカゴン濃度の上昇、さらに(3)肝における *Pepck* や *Glucose-6-phosphatase* を含む糖新生関連遺伝子の発現増強を示し、このモデルマウスにおける膵内分泌細胞の可塑性に伴うグルカゴン陽性細胞の増加が、インスリン抵抗性の一因であることを証明する。

(4)細胞の可塑性に伴う新たなモデルマウスの作製と解析

一方、初年度に明らかになる細胞の可塑性の分子メカニズムに基づいて、さらに新たな糖尿病モデルマウスを作製する。すなわち、前述の ChIP シーケンスとマイクロアレイから明らかになる未知遺伝子について、遺伝子欠損 ES 細胞を国際コンソーシアムより購入して、キメラマウスおよび遺伝子欠損マウスの作製と初期の表現型解析を行う。これらの新規マウスは、初年度に開発した MIP-Luc-BAC Tg マウス等の評価系モデルを応用して、より高速かつ簡便に可塑性の証明を行う。

4. 研究成果

(1)新規糖尿病モデルマウスにおける新たな発症機序の解明

我々作製した *Mafa^{-/-}::Mafk⁺* マウスにおいて、MafK の役割を明らかにすることによって、細胞から細胞への分化転換の分子メカニズムを明らかにすることができる。そのために、胎仔、新生仔の膵臓に対して、各種ホルモンに対する抗体を用いた免疫組織学的解析により、分化転換時期の確定を行った。その結果、細胞から細胞への分化転換は胎生期中期から起こり、出生時期までには細胞と細胞の細胞数が逆転していることが明らかとなった。この逆転は、当初 MafA 欠損も必要であると考えられていたが、MafK 単独欠損でも同様の変化が確認できることが明らかとなった。また細胞の全体数も増加しており、この変化が細胞の数の減少だけではなく、細胞の増加を伴う現象であることが確認された。さらに、細胞特異的転写因子 *Arx* の発現細胞も増加していることが確認された。以上の結果は、胎生期におい

て、細胞から細胞への分化転換が起きていることを示唆していると考えられる。一方 MafK の標的遺伝子を解析するために、CHIP 解析の予備検討を行った。Flag-MafK に対する CHIP 解析を実施するための抗 Flag 抗体を用いた CHIP 実験の予備実験を行い、実験条件をほぼ決定することができた。

(2)リアルタイム・イメージングを可能にする評価系モデルの開発

膵臓内分泌細胞の発生や機能状態をリアルタイムでイメージングするために、新たな遺伝子改変マウスを作製した。細胞量とインシュリンの産生状態をモニターするためにマウスインシュリン 1 遺伝子の制御領域を 100Kb 有し、その転写をルシフェラーゼの活性でモニターできる MIP-Luc-BAC Tg マウスと MafA-KusabiraOrange BAC Tg マウス、および細胞をモニターする Insulin-EGFP マウス、膵臓内分泌細胞をモニターする Ngn3-GFP マウス、インシュリンの産生をモニターする Insulin-DsRed1 マウス、細胞と細胞をモニターする MafB-GFP knock-in マウスを用いて膵内分泌細胞の可塑性を、経時的に可視化し追跡できるシステムを構築した。MIP-Luc-BAC Tg マウスについては詳細な解析を行い、これまで使用されていた Insulin-Luc-VU マウスよりも高感度かつ非特異的な活性が少ないことを明らかにした。これらの結果は Plos One に論文として発表した (Katsumata T. et al, 主な発表論文等の雑誌論文(3))。

(3)膵内分泌細胞の可塑性が病態生理学的に糖尿病に与える意義

Mafa^{-/-}::Mafk⁺ マウスの糖尿病状態を更に解析した。前述の様に *Mafa^{-/-}::Mafk⁺* マウスは出生直後から高血糖状態を呈し、糖尿病を発症するが 30 週令前後まで生存する。血中のインシュリン量は減少しており、インシュリン抵抗性は認められなかった。

(4)細胞の可塑性に伴う新たなモデルマウスの作製と解析

マイクロアレイの解析から、MafA 欠損マウスの細胞では *Angptl7* の発現が有為に減少していた。*Angptl7* は細胞増殖、血管新生や脂質代謝に重要であることが報告されており、細胞減少の原因遺伝子の一つである可能性があることから、遺伝子欠損マウスの作製を行った。計画当初は国際コンソーシアムからの ES 細胞の購入を検討していたが、近年開発された CRISPR/Cas9 法による遺伝子欠損マウスの作製を行った。その結果、*Angptl7* 遺伝子を欠損するマウスを作製することができた。現在欠損マウスの表現型の解析を行っている。

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 15 件)

- (1) Hasegawa Y, Daitoku Y, Mizuno S, Tanimoto Y, Mizuno-Iijima S, Matsuo M, Kajiwara N, Ema M, Oishi H, Miwa Y, Mekada K, Yoshiki A, **Takahashi S**, Sugiyama F, Yagami K. Generation and Characterization of Ins1-cre-driver C57BL/6N for Exclusive Pancreatic Beta Cell-specific Cre-loxP Recombination. **Exp Animal**. 査読有, 63,183-191, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24770644>
- (2) Hasegawa Y, Daitoku Y, Sekiguchi K, Tanimoto Y, Iijima S, Mizuno S, Kajiwara N, Ema M, Miwa Y, Mekada K, Yoshiki A, **Takahashi S**, Sugiyama F, Yagami K-i. Novel ROSA26 Cre-reporter knock-in C57BL/6N mice exhibiting green emission before and red emission after Cre-mediated recombination. **Exp Animal**. 査読有, 62, 295-304, 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hasegawa+Y%2C+Daitoku+Y%2C+Sekiguchi+K>
- (3) Katsumata T, Oishi H, Sekiguchi Y, Nagasaki H, Daassi D, Ema M, Kudo T, **Takahashi S**. *In vivo* monitoring of pancreatic β -cell mass and intrahepatic *insulin* gene activity in Ins1-luc BAC transgenic mice by bioluminescence imaging. **Plos One**. 8, e60411, 2013. 査読有,8, e60411, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0060411.
- (4) Sekiguchi Y, Owada J, Oishi H, Katsumata T, Ikeda R, Kudo T, **Takahashi S**. Non-invasive monitoring of β -cell mass and fetal β -cell genesis in mouse using bioluminescence imaging. **Exp Animal**. 61, 445-451, 2012. 査読有り <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sekiguchi+Y%2C+Owada+J%2C+Oishi+H>

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 智 (TAKAHASHI, SATORU)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：50271896