

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640049

研究課題名(和文) マウス生体内での肝臓細胞からのインシュリン産生細胞誘導法の開発

研究課題名(英文) Generation of induction method of insulin producing cells from mouse liver cells in vivo

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス生体内で、肝臓細胞からのインシュリン産生細胞の誘導法を開発するために、Pdx1、NeuroD、MafAを条件付きにマウス生体内で過剰発現するマウスを作製した。また、Pdx1、NeuroD、MafAの機能を増強して、マウス肝臓細胞からのインシュリンの産生を増強する新たな因子を同定した。新たな因子はインシュリンの産生を10倍程度増強できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a method that induces insulin-producing cells from the liver cells in living mice, we generated conditionally over-expressing mice of Pdx1, NeuroD and MafA. Furthermore, We identified a new factor that enhances the production of insulin from mouse liver cells with Pdx1, NeuroD and MafA. The new factor could enhance insulin transcription approximately 10-fold.

研究分野：実験動物学

キーワード：インスリン 細胞 再生 ディレクトリプログラミング

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは以前より、Large Maf 転写因子群の機能解析を個体レベルで行ってきた。その中で MafA を同定し、ノックアウトマウスを作製した。MafA 欠損マウスは耐糖能の異常をきたし、糖尿病を発症すること、MafA が成熟細胞の機能維持に必須の転写因子であることを明らかにした (Zhang C, et al. Mol Cell Biol, 2005, Kato T, et al. Cell Metabolism, 2006)。また MafA の多型がヒトの型糖尿病の発症リスクと関連していることも大阪大学との共同研究で明らかにした (Noso S, et al. Diabetes, 2010)。このように申請者は、Large Maf 転写因子群の機能解析について世界をリードする研究を展開している。Large Maf 転写因子群については、膵臓内分泌細胞の再生との関係が近年非常に注目されている。MafA を含む複数の転写因子を膵臓外分泌細胞や肝臓細胞に導入することにより、それらの細胞からインシュリンの産生を誘導できることが報告されている (Kaneto H, et al. J Bio Chem, 2005, Zhou Q, et al. Nature, 2008)。しかし、それらの報告は再現性が十分ではなく、誘導効率についても定量的な評価がなされていなかった。そこで申請者らは、生体内でのインシュリン遺伝子の転写をリアルタイムで定量するために、マウスインシュリン遺伝子の制御領域を有する BAC DNA に、ルシフェラーゼ遺伝子を挿入した BAC トランスジェニックマウス (Ins-Bac-LucTg) を作製し、インシュリン遺伝子の転写をリアルタイムに定量評価できる系を作製した (Katsumata T et al. Plos One, 2013)。この解析系を用いて肝臓細胞からインシュリン産生を誘導するために必要な転写因子を探索したところ、Pdx1、NeuroD、MafA の組合せが、3 因子の組合せとしては最も効率が良いことを明らかにした。本申請はこのような背景のもとに計画した。

### 2. 研究の目的

本研究では、試験管内で幹細胞や体細胞をインシュリン産生細胞に分化誘導するのではなく、マウス生体内の肝臓細胞をインシュリン産生細胞 (膵臓細胞様細胞) に再分化させる条件を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Pdx1、NeuroD、MafA の転写因子を誘導的に肝臓で恒常発現するマウスの開発

これまでのインシュリン BAC DNA ルシフェラーゼ トランスジェニックマウスの Xenogen 社の IVIS を用いた研究、および RT-PCR による遺伝子発現解析で、転写因子 Pdx1、NeuroD、MafA をアデノウイルスで肝臓細胞に導入すると、インシュリン遺伝子の転写が、遺伝子導入後 3 日目から誘導

され、7 日目に転写が最大となるが、その後減少することが明らかになっていた。導入した転写因子の発現は 5 日目が最大であり、その後減少して 7 日目にはほぼ発現が検出できなくなるため、導入した転写因子の発現が持続しないためにインシュリンの転写が持続しないのか、導入している転写因子がインシュリン産生細胞を完全誘導するのに十分でないためにインシュリン転写が低下するのかが明らかとなっていない。アデノウイルスによる肝臓細胞への遺伝子導入は、尾静脈からウイルスを注射しても、95% は肝臓細胞に導入される効率が高い方法であること、導入遺伝子の発現が高いことが利点として挙げられるが、ゲノムに挿入されないため、その発現は一過性であるという欠点を有している。そこで、転写因子 Pdx1、NeuroD、MafA を恒常的に発現させることにより肝臓細胞から恒常的なインシュリン産生細胞が誘導可能かどうかを検討した。発生の初期からこれらの転写因子を肝臓に発現させると、肝臓の発生障害を誘導することが予想されるため、Cre-loxP システムにより誘導的に 3 因子を発現できるマウスを作製した。肝臓細胞での高い発現が報告されている Rosa26 遺伝子領域に CAG promoter-loxP-EGFP-loxP-Pdx1-2A-NeuroD-2A-MafA-IRES-DsRed の構築を挿入したマウスを作製した。このマウスの作製には CRISPR/Cas9 システムを用いた。我々のこれまでの解析で、CRISPR/Cas9 システムを用いることにより、マウス受精卵に対するインジェクションで目的の遺伝子領域に外来性の遺伝子を挿入することに成功しており (Mizuno S et al, Mamm Genome. 2014)。Rosa26 領域は ES 細胞でも組換え効率が高いこと、TALEN を用いた同様の方法が機能していることが知られているので、ES 細胞を用いずに、直接 Rosa26 遺伝子領域に CAG promoter loxP-EGFP-LoxP-Pdx1-2A-NeuroD-2A-MafA-IRES-DsRed 遺伝子を挿入したマウスの作製を試みた。このマウスの肝臓に Cre を発現するアデノウイルスを直接注射することにより、Cre の誘導により恒常的に 3 因子を発現させ、肝細胞から恒常的なインシュリンの産生が検出できるかを明らかにする予定だった。このマウスは Cre による組換え誘導が起きた場合には、DsRed が細胞に発現しているため、Cre アデノウイルスにより組換えが誘導された肝臓細胞を検出することが可能であり、それらの細胞でインシュリンの産生が継続するかを解析する予定だった。

転写因子 Pdx1、NeuroD、MafA を恒常的に発現させることにより、肝臓細胞から恒常的なインシュリン産生細胞が誘導可能であった場合には、肝臓細胞での恒常的な遺伝子発現が可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて遺伝子導入系を作製し、AAV ウイルスにより恒常的なイ

インシュリン産生が誘導できるかを確認する予定だった。マウス肝臓からの恒常的なインシュリンの産生が確認できた場合には、前臨床試験として、ヒトの肝臓細胞を有するマウスを用いて、ヒトの肝臓細胞をインシュリン産生細胞へ変換できるかどうかを確認する予定だった。ヒトの肝臓細胞を有するマウスは、実験動物中央研究所より購入できるので、それらのマウスに転写因子をAAVウイルスで導入し、組織切片を作製して、インシュリンの産生を確認する予定だった。

(2) 正常のマウス 細胞と肝細胞から誘導したインシュリン産生細胞の遺伝子発現解析

前述した様に、我々はアデノウイルスを用いて転写因子 Pdx1、NouroD、MafA を導入することにより、肝臓細胞よりインシュリン産生細胞を誘導できることを明らかにしていた。これらのインシュリン産生細胞は、糖尿病マウスを数週間に渡って治療できるものの、その効果は一過性であることが明らかになっており、インシュリン産生細胞への変換が十分でないことが予想された。そこでインシュリン産生細胞への変換を促進する新たな因子を研究計画(1)と平行して探索した。そのために、マウスインシュリンプロモーターに GFP が連結されたトランスジーンを有するマウス (Mouse Insulin Promoter 1- GFP : MIP-GFP Tg) を用いて、正常の膵臓でインシュリンを高産生している細胞と、遺伝子導入により肝細胞より誘導されたインシュリンを高産生している細胞を GFP の発現を指標にセルソーターを用いて単離し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析により、正常細胞で発現しているが誘導インシュリン産生細胞で発現していない遺伝子、もしくは正常細胞で発現していないが誘導インシュリン産生細胞で発現している遺伝子を同定した。正常細胞で発現しているが誘導インシュリン産生細胞で発現していない遺伝子は、3 因子の機能を促進できる遺伝子である可能性が高く、正常細胞で発現していないが誘導インシュリン産生細胞で発現している遺伝子は、誘導細胞のインシュリン産生機能を抑制している遺伝子の可能性が高いと考えられた。マイクロアレイによる遺伝子発現解析により、正常細胞で発現しているが誘導インシュリン産生細胞で発現していない遺伝子が同定された場合には、転写因子 Pdx1、NouroD、MafA に加えてその因子をアデノウイルスで発現させ、インシュリン産生細胞への完全変換を促進できるかどうかを解析した。一方、正常細胞で発現していないが誘導インシュリン産生細胞で発現している遺伝子が同定された場合には、その遺伝子の発現を抑制できる shRNA を発現するアデノ

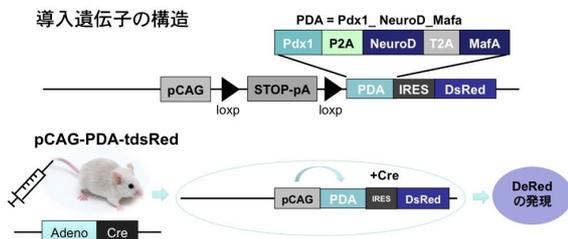
ウイルスを作製する予定だった。転写因子 Pdx1、NouroD、MafA を発現させた後に、その shRNA を導入することにより、インシュリン産生細胞への完全変換が促進できるかを解析する予定だった。

4 . 研究成果

(1) Pdx1、NouroD、MafA の転写因子を誘導的に肝臓で恒常発現するマウスの開発

当初の計画では、Rosa26 領域への CAG promoter loxP-EGFP-LoxP-Pdx1-2A-NouroD-2A-MafA-IRES-DsRed のノックインマウスを作製するとともに、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて遺伝子導入系を作製し、転写因子 Pdx1、NouroD、MafA を恒常的に発現させることにより、肝臓細胞から恒常的なインシュリン産生が誘導できるかを確認する予定だった。Rosa26 領域への CAG promoter loxP-EGFP-LoxP-Pdx1-2A-NouroD-2A-MafA-IRES-DsRed のノックインマウスの作製を試みたが、Rosa26 領域には遺伝子は導入されなかった。また、十分な解析を行うためには、導入遺伝子が大きくならざるを得なかったため、アデノ随伴ウイルスの作製が困難だった。そこで、条件付きに生体内で導入遺伝子を発現できるトランスジェニックマウスの作製を行った。導入遺伝子として Rosa26 遺伝子座へ導入予定だった CAG promoter-loxP-EGFP-loxP-Pdx1-2A-NouroD-2A-MafA-IRES-DeRed を用いて作製した。その結果、導入した遺伝子を有する 2 line のマウスが樹立でき、1 つのラインでは高い EGFP mRNA の発現が確認できた。このマウスに Cre を発現するアデノウイルスを直接注射したところ、肝臓の細胞の一部で DsRed の発現を確認できたが、その発現はわずかであった。そこで、マウスの全身で Cre を発現する Ayu1-Cre マウスと交配したところ、心臓で DsRed の強い発現が観察された。EGFP mRNA の発現も心臓で最も高かったことから、この発現は有為なものと考えられた。今後このマウスを用いて、Cre により EGFP を取り除き、Pdx1、NeuroD、MafA を活性化させた時に、内在性のインシュリンの発現が誘導できるかを

条件付きで Pdx1、NeuroD、MafA を過剰発現できるマウスの作製



このマウスを用いることにより、Cre組換え酵素で恒常的に転写因子Pdx1、NeuroD、MafAをマウス体内の特定の組織で発現させることができる。Pdx1、NeuroD、MafAを発現している細胞は、DeRedの赤色傾向でモニターすることができる。

確認する予定である。

(2) 正常のマウス 細胞と肝細胞から誘導したインシュリン産生細胞の遺伝子発現解析

マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、正常の細胞で発現しているが、誘導インシュリン産生細胞で発現していない遺伝子を複数同定した。その中で、これまでインシュリン遺伝子の転写を促進する機能が報告されている1遺伝子を Pdx1、NouroD、MafA に加えて、アデノウイルスでマウスの肝臓に発現させたところ、インシュリン遺伝子の転写が10倍程度促進され、またその発現期間も延長された。実際に、STZ で糖尿病を誘導したマウスにこれら4因子を導入したところ、3因子より統計学的に有意な治療効果が得られた。治療効果は明らかに延長したが、その発現はやはり一過性で、肝臓細胞のインシュリン産生細胞への完全変換には、更なる因子が必要であると考えられた。細胞への転換抑制因子については、細胞転換促進因子として有力な因子が得られたため、実施しなかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Abdellatif AM, Ogata K, Kudo T, Xiafukaiti G, Chang Y-H, Kato MC, El-Morsy SE, Oishi H, **Takahashi S.** Role of Large MAF Transcription Factors in Mouse Endocrine Pancreas. *Exp Animal.* 2015 64(3): 305-12. doi: 10.1538 査読有り
2. Nishimura W, **Takahashi S.** Yasuda K. Pancreatic  $\beta$ -cell plasticity is regulated by maturation factor MafA. *Diabetologica.* 2015 Mar; 58(3): 566-74. doi: 10.1007 査読有り
3. Nishimura W, Oishi H, Funahashi N, Fujiwara **Takahashi S.** Yasuda K. Generation and characterization of MafA-Kusabira Orange mice. *Endocr J.* 2015 Jan 30; 62(1): 37-51. doi: 10.1507 査読有り
4. Nagasaki H, Katsumata T, Oishi H, Tai P-H, Sekiguchi Y, Koshida R, Jung Y, Kudo T, **Takahashi S.** Generation of insulin-producing cells from the mouse liver using  $\beta$  cell-related gene transfer including *Mafa* and *Mafb*. *Plos One.* 2014 Nov 14; 9(11): e113022. doi: 10.1371 査読有り

〔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