

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14588

研究課題名(和文) 生体内でのインシュリン産生細胞誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of induction method of insulin-producing 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：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探索するため、トランスジェニックマウス(MIP-GFP Tg)を用いて細胞を単離し、候補遺伝子を探索した。その結果、Isl1 とEfl3を同定した。それらについて、Pdx1、NeuroD、MafAとのインシュリン産生における協調作用を確認したところ、Isl1 の同時発現では、肝臓細胞からのインシュリン産生が10倍程度増強されることを確認した。以上の結果から、Isl1 はPdx1、NeuroD、MafAとともに、肝臓細胞からのインシュリンの産生を増強する作用があることが確認された。これらの結果をまとめ、Endocrinology誌に論文として発表した。

研究成果の概要(英文)： To search for new factors that promote conversion to insulin-producing cells from liver cells, Mouse insulin promoter 1-GFP transgenic mouse (MIP-GFP Tg), which has GFP reporter regulated by mouse insulin promoter was used. After isolating insulin producing cells, we did microarray analysis for identifying genes that are expressed in normal cells, but not in induced insulin producing cells. As a result, new candidate genes Isl1 and Efl3 were identified. Each candidate gene was examined to confirm cooperative action in insulin production with Pdx1, NeuroD, MafA in vivo. Coexpression of Isl1 enhanced insulin production from liver cells by about 10 times. On the other hand, coexpression of Efl3 revealed that insulin transcription was suppressed contrary to expectation.

From the above results, it has been confirmed that Isl1, together with Pdx1, NeuroD, MafA, has an effect of enhancing the production of insulin from liver cells. These results were published in Endocrinology.

研究分野：分子生物学

キーワード：インシュリン 細胞 再生 転写因子 肝細胞

1. 研究開始当初の背景

研究実施者は以前より、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β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2型糖尿病の発症リスクと相関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)。

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1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-Luc Tg) 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。しかしながら、その誘導効率は十分ではなく、インシュリンの産生も一過的であった。このことは、更なる因子が必要であることを明確に示している。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

本申請では、生体内で肝臓細胞よりインシュリン産生細胞を効率よく再分化させる方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 正常のマウスβ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、NeuroD、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る。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に無いことが明らかである。そこでインシュリン産生細胞への変換を促進する新

たな因子を探索する。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β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β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β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する。正常β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β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β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る。同定した因子について2) のマウスを用いてその機能を検証する。

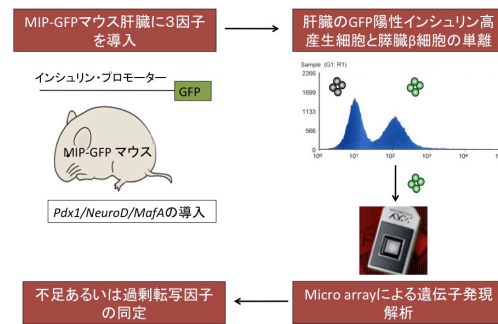


図3. MIP-GFPマウスを用いた不足あるいは過剰転写因子の同定

2) Pdx1、NeuroD、MafA の転写因子を誘導的に肝臓で恒常発現できるマウスを用いた同定因子の機能解析

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と、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る。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、現段階では、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無いために、インシュリン転写が低下するの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、Cre の誘導により Pdx1、NouroD、MafA を組織特異的に恒常的に発現させることができるトランスジェニックマウスを作製した。このマウスは、Cre の発現により Pdx1、NouroD、MafA を組織特異的かつ恒常的に発現できる。このマウスを用いることにより、Pdx1、NouroD、MafA を恒常的に発現されることにより、インシュリンの発現が継続するかが明らかにできると考えられる。恒常的な発現によってもインシュリンの発現が一過性である場合は、発現細胞内にインシュリンの発現を抑制する因子が誘導されると考えられるので、誘導される因子を遺伝子発現解析で同定できると考えられる。因子が同定できた場合は、その遺伝子をアデノウイルスでノックダウンすることにより、その機能を検証する。一方、恒常的な発現が確認できた場合は、1) で同定した因子の機能検定をより効率良く実施するための、プラットフォームとして、新たな因子の機能解析を行う。

3) 同定因子の shRNA による機能解析

マイクロアレイによる遺伝子発現解析により、正常 β 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、Pdx1、NouroD、MafA を恒常的に発現させることができるトランスジェニックマウスに、その因子と Cre 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する。一方、正常 β 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。Cre を発現させ転写因子 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。このような解析を通じて明らかに誘導促進が得られる組合せを同定して、最終的には、それら因子を条件付きで恒常発現できるマウスを作製して、生体内での肝臓細胞から恒常的にインシュリンを産生する細胞を誘導できる方法を確立する。

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。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。

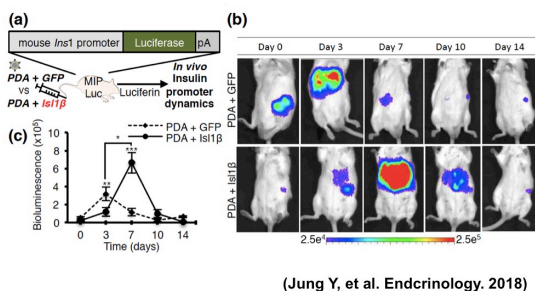
4. 研究成果

1) 正常のマウス β 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

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探索するため、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トランスジェニックマウス(Mouse Insulin Promoter1-GFP: MIP-GFP Tg)を用いて、マイクロアレイにより遺伝子発現解析を行い、正常 β 細胞では発現しているが誘導インシュリン産生細胞では発現していない遺伝子、もしくは正常 β 細胞では発現していないが、誘導インシュリン産生細胞では発現している遺伝子を探索した。その結果、正常 β 細胞では発現しているが誘導インシュリン産生細胞では発現していない、新たな候補遺伝子 Isl1 β と Efl3 を同定した。その候補遺伝子について、Pdx1、NeuroD、MafA とのインシュリン産生における協調作用を確認したところ、Isl1 β の同時発現では、肝臓細胞からのインシュリン産生が 10 倍程度増強されることを確認した。一方、Efl3 の同時発現では、予想に反してインシュリンの転写が抑制されることが明らかとなった。Efl3 の抑制作用の分子機構の詳細は不明であるが、タンパク質間の相互作用によることが予想された。

以上の結果から、Isl1 β は Pdx1、NeuroD、MafA とともに、肝臓細胞からのインシュリンの産生を増強する作用があることが確認された。これらの結果をまとめ、Endocrinology 誌に論文として発表した。

Isl1 β enhanced insulin transcription in PDA-adenovirus infected liver



2) 転写因子 Pdx1、NeuroD、MafA を誘導的に肝臓で恒常発現できるマウスを用いた同定因子の機能解析

Cre の誘導により、Pdx1、NeuroD、MafA を組織特異的に恒常的に発現させることができるトランスジェニックマウスを用い、インシュリンを恒常的に発現させることができるかを解析できると考えた。そこで、マウスを作製し、発現を誘導して解析したところ、肝臓での恒常的な発現を誘導することができたが、その発現量は非常に低く、またインシュリンの産生も確認できなかった。また、筋組織では高い恒常的な発現が確認されたが、インシュリンの産生は確認されなかった。

以上の結果から、肝臓以外の組織では、イ

ンスリンの産生誘導が難しいこと、肝臓で高い発現を示す新たなマウスの作製が必要であると考えられた。

3) 同定因子の shRNA による機能解析

正常 β 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について検索を行なった。複数の候補遺伝子を同定したが、shRNA による機能解析を実施するに至らなかった。

一方、本研究に関連して、 β 細胞および α 細胞における MafB の機能解析を行ったところ、これまでの報告と同様に、MafB が初期の β 細胞でのインシュリンの産生に重要であることを再確認するとともに、これまでの報告とは異なり、 α 細胞でのグルカゴンの産生には、MafB が必須であることを明らかにした。本研究成果は *Mol. Cell. Biol* 誌に発表した。

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 2 件)

1. Katoh MC, Jung Y, Ugboma CM, Shimbo M, Kuno A, Basha WA, Kudo T, Oishi H, Takahashi S. MafB is critical for glucagon production and secretion in mouse pancreatic α Cells *In Vivo*. *Mol Cell Biol*. 2018 Mar 29;38(8). pii: e00504-17. doi: 10.1128/MCB.00504-17. Print 2018 Apr 15.
2. Jung Y, Zhou R, Kato T, Usui JK, Muratani M, Oishi H, Heck MMS, Takahashi S. Isl1 β overexpression with key β cell transcription factors enhances glucose-responsive hepatic insulin production and secretion. *Endocrinology*. 2018 Feb 1;159(2):869-882. doi: 10.1210/en.2017-00663.

[学会発表] (計 0 件)

[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 0 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
<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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()