

糖尿病再生医療の実現に向けた膵β細胞新生機構の解明

順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科

宮塚 健

1. 目的

糖尿病の根治を可能とするためには、失われた膵β細胞機能を補充することが不可欠である。こうした中でES細胞・iPS細胞や組織幹細胞等の非β細胞からインスリン産生細胞への分化誘導を促す再生医療が注目され、我々を含む多くの研究者が、インスリン産生細胞を誘導することに成功している。しかし、このようにして作製された“代替β細胞”は、インスリン遺伝子の発現量、即時的なブドウ糖応答性、適度な自己複製能（増殖能）等の機能面に関しては、膵臓に内在するβ細胞とは似て非なるものであり、血糖値を正常化することのできるβ細胞を作製する、即ち糖尿病再生医療を実現するためには、このギャップを埋める必要がある。

上記問題点を克服するための一つの手掛かりは胎生期から成体に至るまでの膵発生およびβ細胞分化過程を詳細に解析することにある。我々はその第一歩として膵臓特異的転写因子の機能および発現制御機構に焦点を当てて研究してきた(Miyatsuka 2015) (Miyatsuka et al. 2009) (Smith et al. 2010) (Miyatsuka et al. 2011)。一方、内分泌細胞分化の最終局面であるインスリン産生細胞の新生(neogenesis)、そして成熟(maturation)を規定する分子機構に関しては未解明の問題が多い。

我々はβ細胞新生を優れた時間分解能で解析するためのツールとして、時間依存性にその蛍光波長がシフトする蛋白質“DsRed-E5 (Fluorescent Timer)”をinsulin 1 promoterの下流に連結した“Insulin-Timerマウス”を作製し、膵内分泌前駆細胞から分化したばかりの“新生β細胞”を緑色蛍光細胞として標識することに成功した(Miyatsuka et al. 2014)。Insulin-Timerマウスを用いてFACSを行うことで新生β細胞を単離することができる一方、緑色蛍光のintensityが弱いため、蛍光顕微鏡で緑色蛍光細胞を観察することができなかった。

本プロジェクトでは新生β細胞の位置情報を得るためのInsulin-new-Timerマウスを作製し、新生β細胞を蛍光顕微鏡下で観察することにより「β細胞がどこから生まれ、どのように移動しながら膵島を形成するのか？」を明らかにする。

2. 方法

① Insulin-new-Timerマウスの作製

前述のInsulin 1 promoter-DsRedE5マウス(Ins1-DsRedE5)とInsulin 1 promoter-eGFPマウス(Ins1-GFP)とを交配することにより、Ins1-GFP; Ins1-DsRedE5ダブルトランスジェニックマウス(以降Insulin-new Timerマウスと表記)を作製する。Ins1-GFPマウスはeGFP蛋白質が翻訳されてから緑色蛍光として観察されるまでの時間が早く、また蛍光強度も強いいため、最も早い段階の新生β細胞を緑色に標識することができる。またinsulin 1 promoterが活性化してから一定時間経過したβ細胞内にはGFP由来の緑色蛍光蛋白とDsRedE5の緑色蛍光蛋白+赤色蛍光蛋白質が存在するため、その総和として黄緑色～黄色～橙色に標識される。

Insulin-new-Timerマウス胎仔より膵臓を摘出し、live imagingで観察し、また凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて緑色蛍光細胞および黄色蛍光細胞の位置情報を観察した。またDBA-lectinや血管内皮細胞、グリア細胞を標識する抗体を用いて免疫組織染色を行うことにより、膵管、血管系、神経系を標識しながら、新生β細胞と周辺組織との位置関係を解析した。

3. 結果

胎生16.5日(E16.5)のInsulin-new-Timerマウス膵臓を摘出し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてlive imagingで観察したところ、緑色蛍光細胞が時間経過とともに赤色蛍光を呈するようになることを観察した(緑色蛍光は消失せず)。これは、我々の想定通り、緑色蛍光細胞を観察することにより新生β細胞の位置情報を得ることができることを意味している。

E15.5～E18.5および生後0.5日(P0.5)のInsulin-new-Timerマウスの膵臓を摘出、凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、膵管（DBA-lectinで標識）近傍に緑色蛍光細胞を認め、膵管からやや離れたところに黄色細胞（=分化したβ細胞）で構成される膵島様クラスターを認めた。これはNeurog3陽性内分泌前駆細胞が膵管内あるいは膵管に近接して存在することと合わせて考えると、内分泌前駆細胞からβ細胞へと分化した後に膵管から離れて行き、膵島を形成する過程が想起される。一方、緑色蛍光細胞の中には膵管から離れた箇所が存在し、同時に既存の膵島様クラスターと血管内皮細胞に近接して存在していた。膵島近傍の新生β細胞(new βd)と血管内皮細胞近傍の新生β細胞(new βv)とを定量したところ、胎生16.5日では全β細胞の3.2±0.3%がnew βd細胞、3.3±0.5%がnew βv細胞であった。

4. 考察

eGFPとDsRed-E5の蛍光特性の差異を利用することにより、β細胞新生過程を顕微鏡下で観察することに成功した。当初の計画ではeGFPとDsRed-E5をIRESで連結したコンストラクトをインスリンプロモータの下流に配置したトランスジェニックマウスあるいはノックインマウスを作製する予定であったが、transgene陽性のマウスは得られていないため、2種類のトランスジェニックマウスを交配することにより代用した。

現在までの発生生物学研究において、Neurog3陽性内分泌前駆細胞は膵管近傍に存在することが報告されており(Schwitzgebel et al. 2000)、また全てのβ細胞はNeurog3陽性細胞から分化することも示されていたため(Gu et al. 2002)、本プロジェクト発案の時点ではβ細胞新生も膵管近傍で起こることを想定していた。実際の実験結果も膵管に近接する緑色蛍光細胞細胞は当初の仮説に合致する結果である。一方、膵管から離れて存在する緑色蛍光細胞が存在するという事は、Neurog3陽性内分泌前駆細胞が前駆細胞のまま膵管から離れた後にβ細胞新生が起こる別経路が存在することを意味する。さらに膵管から離れた場所で生まれた新生β細胞は必ず既存の膵島と血管内皮細胞の両者に近接しているため、これらの細胞集団から何らかのシグナルを受け取ることがβ細胞新生過程に必須であることが予想される。今後はVegfa欠損Insulin-Timerマウスを作製し、血管内皮細胞の形成を障害した条件下でβ細胞新生過程がどのような影響を受けるか検討したい。

5. 参考文献

- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129: 2447-2457.
- Miyatsuka T. 2015. Chronology of endocrine differentiation and beta-cell neogenesis [Review]. *Endocr J*.
- Miyatsuka T, Kosaka Y, Kim H, German MS. 2011. Neurogenin3 inhibits proliferation in endocrine progenitors by inducing Cdkn1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 185-190.
- Miyatsuka T, Li Z, German MS. 2009. Chronology of islet differentiation revealed by temporal cell labeling. *Diabetes* 58: 1863-1868.
- Miyatsuka T, Matsuoka TA, Sasaki S, Kubo F, Shimomura I, Watada H, German MS, Hara M. 2014. Chronological analysis with fluorescent timer reveals unique features of newly generated beta-cells. *Diabetes* 63: 3388-3393.
- Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS. 2000. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127: 3533-3542.
- Smith SB, Qu HQ, Taleb N, Kishimoto NY, Scheel DW, Lu Y, Patch AM, Grabs R, Wang J, Lynn FC et al. 2010. Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans. *Nature* 463: 775-780.