

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成30年4月26日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 埼玉医科大学  
職 名 専任講師  
研究代表者 中尾 啓子

下記のとおり平成29年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:17006)

1. 共同研究課題名	膵島 β 細胞への電気穿孔遺伝子導入法の開発と糖尿病発症機構の解明			
2. 共同研究目的	藤谷与士夫先生と共同で開発した膵臓細胞への高効率な遺伝子導入法を用いることで糖尿病モデルマウスにおいて脱分化状態にあると考えられる β細胞の再分化に必要な遺伝子を明らかにし糖尿病の新規治療法開発をめざす			
3. 共同研究期間	平成29年4月1日 ~ 平成30年3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 中尾 啓子	医学部・生理学	専任講師	マウス膵臓へのエレクトロポレーション法による遺伝子導入及び表現型の解析	
(分担研究者) 今井 貴雄	医学部・生理学	非常勤講師	発現ベクターのコンストラクションと発現解析	
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御	氏 名	藤谷与士夫

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

#### 6. 共同研究計画

本研究では、遺伝子導入細胞が単一細胞レベルで識別可能で、しかも導入した遺伝子の発現のタイミングをコントロールできる膵島細胞への電気穿孔法を確立し、膵β細胞の分化形質の維持機構を明らかにするために以下の様な計画を進めていく。

(1) 膵炎を惹起させることなく効率よい遺伝子導入を可能にする「β細胞への電気穿孔法による遺伝子導入法」の至適化(中尾らが担当)

(2) Pdx1<sup>flox/flox</sup>: Rosa26-eYFP マウスを宿主とし、この膵臓組織に外来性の RIP (rat insulin promoter)-Cre 遺伝子を電気穿孔法を用いて導入することにより、adult β組織において inducible に Pdx1 を欠損させる実験を行ない、この方法のβ細胞機能解析における有用性を検証する。また、β細胞が Pdx1 の発現量を段階的に低下させることにより、PP細胞やα細胞へと運命転換するという仮説を検証する(中尾が藤谷と共同ですすめる)

(3) (1), (2) がクリアできれば、その他の標的遺伝子特異的な crispr/cas9 を電気穿孔法によりβ細胞に導入することにより、adult のβ細胞のゲノム編集が可能かどうかの検証実験を行なう(中尾、今井が担当)

#### 7. 共同研究の成果

研究計画の(1)にある膵β細胞への電気穿孔法を用いた遺伝子導入法を開発し、単一細胞レベルの解像度で遺伝子導入された細胞の分化を解析できる系を確立した。

さらに(2)の糖尿病におけるβ細胞の機能低下が、Pdx1 遺伝子のダウンレギュレーションによりβ細胞が分化転換したことに因るという仮説を証明するために、β細胞特異的な発現を可能にする RIP (rat insulin promoter)-Cre プラスミッドを我々が開発した電気穿孔法を用いて Pdx1-flox f/f または f/+マウスの膵島に導入することにより、一部のβ細胞内の Pdx1 遺伝子の発現のみをノックアウトまたはノックダウンさせることに成功し、それがβ細胞の分化状態にどのような効果をもたらすかを解析することが可能になった(特許申請及び論文投稿準備中)。さらに、続いて Pdx1 の発現を異所性プロモーター支配下の Pdx1 遺伝子発現を導入することでレスキューできるかどうかを検討するためにコンストラクションを作成中で、でき次第導入実験を開始予定。

#### 8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出して下さい。)

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文  
投稿準備中

②この共同研究に基づくとの記載のある論文  
投稿準備中