

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 31年 4月 10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30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 30年 4月 1日 ~ 平成 31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	マウス膵臓への新規遺伝子導入法を用いた糖尿病発症メカニズムの研究	
(分担研究者) 大石(原) 朱美	医学部・生理学	非常勤講師	マウス膵臓への新規遺伝子導入法の開発及び β 細胞の分化形質の維持に関わる遺伝子機能の解析	
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

(1) Pdx1^{flox/flox}: 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 細胞において 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。

(2) さらに、今回の開発に伴って見いだした膵島へのベクター導入法の部分を応用することでアデノ随伴ウイルスの膵島への確実な導入も可能になるため、電気穿孔法と合わせて二段階で遺伝子の導入実験ができる。従って β 細胞への分化形質の維持に必要な遺伝子の機能欠失実験とそれを回復させるレスキュー実験の両方が可能になる。これにより β 細胞の分化形質の維持ができない糖尿病のメカニズムを解明し、新規治療法開発をめざす

(3) さらにこれまで膵房中心細胞等では機能が明らかになっている Notch シグナルが膵島内では血管内皮細胞と α 細胞で発現することが示されているが、機能は明らかになっていない。我々はそれを Venus⁺ と言う検出感度の高い蛍光タンパク質を発現する Notch シグナルの活性を示すレポーターコンストラクトを用いてより正確に活性を再現できている。血管内皮細胞は膵島形成に関与するだけでなく逆に膵島からのシグナルによって VEGF-A シグナルが活性化され血管形成が促進されるという事が分かっている。Notch シグナルは細胞間相互作用と介して増殖と分化を制御することから膵島内の血管内皮細胞での Notch シグナルの機能をこの手法で明らかにしようとしている。このレポーターは canonical Notch シグナル経路の指標としての RBP-J 依存的な活性と非依存的な活性を両方とも検出できるセットになっているので、単なる Hes1 抗体による検出に比べて感度が非常に高いだけでなく特異性にも優れている。

(4) (1)(2)(3) 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
本研究を応用することにより、今後以下のような研究を計画している。

① crispr/cas を用いたゲノム編集技術と組み合わせることにより、数多くの任意の遺伝子の膵 β 細胞における機能解析を、conventional な β 細胞特異的な欠損マウス作製に頼ることなく、ハイスループットに行なうことが可能になる。

② ①のスクリーニングにおいて、見出したとくに興味ある遺伝子については、conventional な遺伝子欠損マウスを作製し、さらに詳細な解析を行う。

③ Pdx1 やその他標的遺伝子間の上下関係 epistasis を電気穿孔法による rescue 実験によって明らかにすることができる。

7. 共同研究の成果

これまでに、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。

高脂肪食負荷+STZ の投与で作成する糖尿病モデルにおける β 細胞の減少は、高血糖下で Pdx1 遺伝子のダウンレギュレーションが起こり、それによって β 細胞が分化転換したことによ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/+; Rosa26R-YFP マウスの膵島に導入することにより、一部の β 細胞内でのみ Pdx1 遺伝子の発現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 細胞の分化状態の維持にどのような効果をもたらすか解析を行った。Rip-Cre の導入により YFP を発現するようになった β 細胞は同時に Pdx1 遺伝子座の片方または両方ノックアウトされており、2~3週間後に bihormonal 細胞もしくは non- β 細胞に分化転換していた(論文投稿準備中)。

次に、高脂肪食負荷+STZ の投与後、高血糖下で Pdx1 遺伝子が低下し β 細胞が減少した後で、AAV 発現コベクターを用いて Pdx1 遺伝子を血糖非依存的なプロモーター支配下で強制発現することで β 細胞の再分化というレスキューできるかどうかを検討した。

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部提出してください。)

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

Development of monoclonal mouse antibodies that specifically recognize pancreatic polypeptide.

Endocr J. 2019 Mar 6.; 10.1507/endocrj.EJ18-0441. [Epub ahead of print]

Hara A, Nakagawa Y3, Nakao K, Tamaki M, Ikemoto T, Shimada M, Matsuhisa M, Mizukami H, Maruyama N, Watada H., Fujitani Y.

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