

様式3

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

令和2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

下記のとおり令和元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ネットワーク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31年4月1日 ～ 令和2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	
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 マウスをホストとし、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の検証をすすめる。

(2) 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 とい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。

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、bihormonal 細胞もしくは non- β 細胞に分化転換していた。

次に我々は、単一細胞レベルで β 細胞内で Notch シグナル関連遺伝子の発現を変化させる実験を行った。インシュリンを発現する β 細胞系譜の標識システムと併用することで、Notch シグナル関連遺伝子の過剰発現またはノックダウンによって β 細胞にどのような分化転換が起こるかを解析することができる。さらに、それらのマウスに高脂肪食+STZ の負荷を掛けて高血糖にしたときの分化転換を併せて解析することで血糖依存的、非依存的な分化転換をそれぞれ解析できる。また、高血糖下で β 細胞がより未分化な内分泌細胞に分化転換する際に、Notch シグナルが一過性に活性化されるかどうかについては、実験2で用いた Notch シグナルのレポーターマウスもしくはレポーターコンストラクトを電気穿孔法で導入して解析した。

もし、高血糖下での β 細胞の未分化内分泌細胞への分化転換の際に Notch シグナルの活性化が一過性にも起きていれば、電気穿孔法で、Notch シグナルを抑制する発現コンストラクトを導入することで、分化転換が起こらなくなるかどうかを解析した。

結果として、Notch シグナルが未分化性を維持し、Notch シグナルの低下が分化・成熟を促していることがわかった。

このように遺伝子導入の方法としては、すでに確立しているので、未分化性の維持や細胞分化に関わるものがこれまでに示されている Notch シグナル以外のシグナル伝達系等についても同様の解析を行い、糖尿病に関しては複数存在すると考えられる発症機序を今後一つずつ明らかにしていく。

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。)

埼玉医科大学雑誌(2020) vol.47 in press

中尾啓子

Notch シグナルによる膵内分泌細胞の分化維持機構と新たな糖尿病治療戦略