

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3年4月22日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科学  
職 名 助教  
研究代表者 氷室 美和

下記のとおり令和2年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 20004 )

1. 共同研究課題名	新規レポーターマウスを用いた膵α細胞新生・分化機構の解明		
2. 共同研究目的	膵前駆細胞から分化したばかりの新生α細胞および成熟α細胞を可視化し、時間軸に沿って解析するための新規レポーターマウス“Gcg-Timer マウス”(順天堂大学で作製済)を用いて、膵α細胞の新生・成熟を制御する分子機構を解明する。群馬大学で進行中の膵内分泌細胞の細胞系譜解析と合わせて統合的に解析することにより、膵内分泌細胞分化におけるα細胞の役割を明らかにする。		
3. 共同研究期間	令和2年4月1日 ~ 令和3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) 氷室 美和	順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科学	助教	研究全体の統括
(分担研究者) 宮塚 健	順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科学	准教授	Omics 解析の統括
鈴木 路可	順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科学	助教	遺伝子改変マウス表現系解析 (transcriptome 解析)
片平 雄大	順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科学	助教	遺伝子改変マウス表現系解析 (組織学的評価)
若林 侑香	順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科学	大学院生	遺伝子改変マウス表現系解析 (組織学的評価)
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御分野	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

近年終末分化を遂げた膵 $\alpha$ 細胞が $\beta$ 細胞へとリプログラミングすることが報告されており、 $\alpha$ 細胞の分化を制御するメカニズムを解明することは、 $\alpha$ -to- $\beta$  reprogramming を介した $\beta$ 細胞再生医療へと繋がる可能性がある。我々は蛍光特性を経時的に変化させるコンストラクト“eGFP-IRES-mRFP”をプログルカゴン遺伝子座に挿入したレポーターマウス“*Glucagon-Timer*”マウスを作製し、様々な分化段階の $\alpha$ 細胞を高時間分解能で単離することに成功した。本マウスでは eGFP の下流に IRES を介して mRFP を配置しているため、IRES の下流に配置した mRFP の発現量が eGFP に比し相対的に低下し、eGFP の緑色蛍光と mRFP の赤色蛍光との検出にタイムラグが生じる。本研究では *Glucagon-Timer* マウスを用いて組織学的観察およびトランスクリプトーム解析を行うことにより、「 $\alpha$ 細胞がいつ、どこで生まれ、どのようにして成熟 $\alpha$ 細胞へと分化していくのか？」を解析する。さらに群馬大学で進行中の内分泌細胞系譜解析の結果と合わせて統合的に解析することにより、 $\alpha$ 細胞の spatio-temporal patterning を高い時間分解能・空間分解能で再構築する。

## 7. 共同研究の成果

### 1) 新生 $\alpha$ 細胞の定量化

*Glucagon-Timer* マウス膵を摘出し、共焦点レーザー顕微鏡および Flowcytometry を用いて経時的に新生 $\alpha$ 細胞を定量化した結果、胎生 12 日から生後 5 日にかけて新生 $\alpha$ 細胞(緑色蛍光優位な細胞)を認め、生後 7 日以降成体マウスには認めなかった。以上の結果から、生理的条件下では $\alpha$ 細胞新生は胎生期および生後早期に特化した現象であることが示された。

### 2) 胎生期 *Glucagon-Timer* マウス膵を用いたトランスクリプトーム解析

胎生 17 日の *Glucagon-Timer* マウス膵より FACS を用いて新生 $\alpha$ 細胞・成熟 $\alpha$ 細胞、非 $\alpha$ 細胞の各分画に単離し、RNA を抽出し、RNA-sequencing を行った。その結果、新生 $\alpha$ 細胞や成熟 $\alpha$ 細胞特異的に高発現する複数の遺伝子群を抽出することに成功した。 $\alpha$ 細胞系譜に関わる既知の転写因子に関しては、Arx などは新生 $\alpha$ 細胞と成熟 $\alpha$ 細胞で発現に変化がなかったが、Mafk は成熟 $\alpha$ 細胞により多く発現しており、 $\alpha$ 細胞分化に伴い増加していた。

今後さらに「 $\alpha$ 細胞がどこで生まれるのか？」を明らかにするため、胎生期膵臓において膵管、血管等と新生 $\alpha$ 細胞との位置関係を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。

## 8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換 (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

・ Aoyama S, Nishida Y, Fujitani Y, Fukunaka A, Miyatsuka T, Suzuki L, Himuro M, Yoshimori T, Watada H. Rubicon in pancreatic beta cells plays a limited role in maintaining glucose homeostasis following increased insulin resistance. *Endocr J.* 67(11):1119-1126, 2020.

### ②この共同研究に基づくとの記載のある論文

なし

### ③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

なし

### ④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

コロナのため訪問が困難であり、メールでの情報交換および Web ミーティングを施行した。

・2020 年度上半期は FACS においていかに viability を維持しながら目的とする膵内分泌細胞( $\alpha$ 細胞、PP 細胞)を収集するか、至適条件の検討を行った。

・下半期は RNA sequencing の結果につき意見交換を行った。

また、Web 上でスライドを用いてプレゼンテーションを行った。