

Title	Generation and characterization of a novel mouse model that allows spatiotemporal quantification of pancreatic $\beta$ -cell proliferation( Abstract_要旨 )
Author(s)	Tokumoto, Shinsuke
Citation	京都大学
Issue Date	2021-01-25
URL	<a href="https://doi.org/10.14989/doctor.k22881">https://doi.org/10.14989/doctor.k22881</a>
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（医学）	氏名	徳本 信介
論文題目	<b>Generation and characterization of a novel mouse model that allows spatiotemporal quantification of pancreatic <math>\beta</math>-cell proliferation</b> (膵臓 $\beta$ 細胞増殖の時空間的定量化を可能にする新規マウスモデルの樹立)		
(論文内容の要旨) <p>【背景】糖尿病の新たな治療戦略として<math>\beta</math>細胞の増殖刺激因子が注目されているが、このような因子の効果を判定するためには、<math>\beta</math>細胞の増殖率に対する再現性のある正確な定量手法が必要不可欠である。これまで<math>\beta</math>細胞増殖率の測定方法としては合成核酸アナログ投与後の組織切片を免疫染色で評価する手法が取られる。しかし、この方法では合成核酸アナログが細胞周期を阻害し<math>\beta</math>細胞の増殖率を正確に評価できないと指摘されているうえ、プロトコールが統一されていないため再現性が乏しいとも報告されている。またこの手法では膵島全体の3次元的评价も不可能であることから、サンプルサイズも制限されていた。以上の状況を鑑み、正確かつ再現可能な<math>\beta</math>細胞増殖率の新たな評価手法を開発することは<math>\beta</math>細胞増殖の研究にとっては重要である。本研究では、こうした既存の評価手法の欠点を克服する目的にて細胞周期可視化蛍光プローブ(Fucci)が膵<math>\beta</math>細胞特異的に発現するRIP-Cre;Fucci2aRマウスを樹立した。このマウスモデルでは細胞周期のG0/G1期にある<math>\beta</math>細胞はmCherryにより赤色に、S/G2/M期にある<math>\beta</math>細胞はmVenusにより緑色に標識される。そのため、増殖中の<math>\beta</math>細胞の定量評価のみならず、透明化技術を利用することによって増殖中の<math>\beta</math>細胞の空間情報についても解析することができる。【方法】インスリン受容体アンタゴニスト(S961)投与により<math>\beta</math>細胞増殖が顕著に増加することが報告されている。S961によって<math>\beta</math>細胞の細胞周期が進行することを確認するため、S961投与下でRIP-Cre;Fucci2aRマウスの膵臓を多光子レーザー顕微鏡(FV1200MPE)にて10時間リアルタイムで観察した。次に8週齢のRIP-Cre;Fucci2aRマウスをS961投与群と非投与群に分け、投与1週間後に膵臓を回収した。<math>\beta</math>細胞特異的にFucciが発現していることを確認するために、膵臓のインスリン・グルカゴン・ソマトスタチンの染色を行った。さらにS961投与以外にも高脂肪食、妊娠および膵切除術後の膵臓組織をCUBIC法にて透明化したのち、ライトシート顕微鏡によって膵組織内の膵島の3次元データを取得した。画像解析ソフトウェア(Imaris)による解析を行い、各膵島の体積・<math>\beta</math>細胞数および膵島内の増殖中の<math>\beta</math>細胞数を評価した。【結果】RIP-Cre;Fucci2aRマウスのリアルタイム生体イメージングの結果から、<math>\beta</math>細胞がG1期からS期へ移行する瞬間を捉えた。また免疫染色の結果から、Fucciプローブがインスリン陽性細胞内に局在する一方で、グルカゴンとソマトスタチン陽性細胞内には発現が認められなかった。S961投与群では非投与群と比較し、各膵島あたりの増殖中の<math>\beta</math>細胞が有意に多かった。両群とも膵島あたりの増殖<math>\beta</math>細胞数と、膵島体積および膵島あたりの<math>\beta</math>細胞数との間に有意な正の相関を認めた。高脂肪食、妊娠および膵切除術群でも同様な結果を認めた。【結語】増殖中の<math>\beta</math>細胞の時間的および空間的情報が得られるため、RIP-Cre;Fucci2aRマウスは<math>\beta</math>細胞増殖評価として有用なツールになりえる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

糖尿病の新たな治療薬として膵 $\beta$ 細胞の増殖刺激因子が注目されている。このような因子の効果を判定するためには、 $\beta$ 細胞の増殖率の再現性ある定量法が必要不可欠である。申請者は細胞周期可視化蛍光プローブ(Fucci)を $\beta$ 細胞特異的に発現するRIP-Cre;Fucci2aRマウスを樹立することで、時空間的に $\beta$ 細胞の増殖の定量化を可能にする方法の開発に取り組んだ。

免疫染色の結果から、RIP-Cre;Fucci2aRマウスではFucciがインスリン陽性細胞、すなわち $\beta$ 細胞のみに発現していることが確認できた。RIP-Cre;Fucci2aRマウスの透明化した膵組織を3次元的に解析すると、インスリン受容体アンタゴニスト(S961)投与群では非投与群と比較し、各膵島あたりの増殖中の $\beta$ 細胞が有意に多かった。両群とも膵島あたりの増殖中の $\beta$ 細胞数と、膵島体積および膵島あたりの $\beta$ 細胞数との間に有意な正の相関を認めた。高脂肪食、妊娠および膵部分切除術群でも同様の結果を認めたが、S961投与により $\beta$ 細胞の増殖が最も促進されることが明らかとなった。またSGLT2阻害薬を用いて血糖を低下させてもS961による $\beta$ 細胞増殖効果は保持されたことから、S961による $\beta$ 細胞増殖促進には高血糖以外の因子が関与する可能性が示唆された。さらに2光子顕微鏡を利用し、RIP-Cre;Fucci2aRマウスの膵臓を経時的に観察することにより、生体内で $\beta$ 細胞がG1期からS期へ移行する瞬間を捉えることに成功した。

以上の研究は $\beta$ 細胞の増殖機序の解明に貢献し代謝学及び糖尿病学の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、令和2年12月11日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降