

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

幹細胞からの膵β細胞分化誘導に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 裕

平成15(2003)年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
幹細胞からの膵β細胞分化誘導に関する研究-----	1
清野 裕	
II. 分担研究報告	
1. 膵β細胞幹細胞の分化に関する研究 -----	5
山田祐一郎	
2. 膵β細胞・小腸遺伝子のESTマイクロアレイ化と 幹細胞特異的マーカーの同定 -----	8
武田 純	
3. 幹細胞からの膵β細胞分化誘導に関する研究 -----	12
荒木 栄一	
4. 1型糖尿病モデル動物における移植膵ランゲルハンス島 に対する自己免疫防止に関する研究 -----	13
中村 直登	
5. マウス膵切除後糖尿病発症モデルの確立及び残膵β細胞の 再生、増殖 -----	15
安波 洋一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	20

厚生科学研究費(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
総括研究報告書

幹細胞からの膵β細胞分化誘導に関する研究

主任研究者 清野 裕 京都大学医学研究科教授

研究要旨

ネスチン遺伝子のプロモータに EGFP を結合したトランスジェニックマウスから、膵β細胞の幹細胞の単離に成功した。遺伝子発現の検討や長期培養を行うことにより、幹細胞の特性を検討している。

分担研究者

山田祐一郎

京都大学医学研究科・助教授

武田 純

群馬大学生体調節研究所・教授

荒木栄一

熊本大学医学部 教授

中村 直登

京都府立医科大学 講師

安波洋一

福岡大学医学部・助教授

かつ重篤な低血糖の増加やQOLの低下を招くため、根本的な治療法の確立が望まれている。膵島移植は、可能性は秘めているが、免疫抑制薬を継続投与する必要があること以外に、ヒトでは十分な量の膵島を得ることが困難であること、ブタでは異種間感染の可能性など解決すべき問題が多い。

最近の発生工学・細胞生物学の進展により、膵β細胞の分化増殖機構が明らかにされてきた。そこで、これらの知見を応用して、幹細胞から膵β細胞を作製して供用しようとする膵β細胞の再生療法は、糖尿病の根治治療法として期待されている。本研究は、膵β細胞の幹細胞を、*in vitro*で増殖させ膵β細胞を分化させることを目的としている。

A. 研究目的

糖尿病は過去40年間に70倍に激増し、690万に達した。糖尿病に伴って生じる合併症も深刻な問題となっており、糖尿病による透析導入や後天的な失明もそれぞれ年間約12,000人、4,000人と原因の第1位である。糖尿病の治療として、インスリン注射などを用いた厳格な血糖コントロールが行われているが、このような対症療法では血糖の制御を行うことは不可能で、

B. 研究方法

(1) 幹細胞の単離

神経細胞の幹細胞で発現が報告されているintermediate filamentであ

るネスチンに着目し、ネスチン遺伝子のプロモータの下流にEGFP (enhanced green fluorescent protein) 遺伝子を結合させたトランスジェニックマウス (ネスチンEGFPマウス) から、膵β細胞の幹細胞の単離を試みた。まず、ネスチンEGFPマウスから膵ランゲルハンス島をコラギナーゼ法で単離した。次に、トリプシン処理を行うことにより、個々の細胞に分散させた。分散した細胞を用いてナイロンメッシュを通した後、fluorescence-activated cell sorting法 (FACS法、Beckman Coulter社、ALTRA) により、EGFP強度が高い分画の細胞を単離した。5匹のネスチンEGFPマウスより、約1万～5万個のEGFP陽性細胞を分取することが可能となった。

#### (2) 幹細胞の特性

EGFP陽性の細胞からmRNA purification kit を用いてmRNAを抽出し、Superscript IIを用いて、cDNAを合成した。得られたcDNAをrealtime PCR法 (Taqman) を用いて、種々の遺伝子発現量を検索した。EGFP陽性細胞においては、インスリン遺伝子の発現が低下しているのみならず、膵β細胞の機能維持に必須であることが報告されているPdx-1遺伝子発現も低下、逆に膵内分泌細胞に特異的な転写因子BETA 2の発現は亢進、膵外分泌細胞に特異的な転写因子p48の発現も亢進しており、本細胞が膵内分泌細胞のみならず、膵外分泌細胞の幹細胞であることが強く示唆された。

#### (3) 遺伝子発現の検討

ヒトインスリノーマEST解析で見出された256種類の転写因子を用いて独自に作成したマイクロアレーを用いて、膵β細胞・肝臓・小腸で発現の変化する (ないしは共通である) 転写因子を同定するなど、DNAマイクロアレーを用いた幹細胞同定への分子資源の準備を順調に進めている。

#### (倫理面への配慮)

動物の実験に関しては、各大学の動物実験に関する指針を厳守して実施した。

#### C. 研究成果

(1) FACSまでの種々の条件を検索することによって、5匹のネスチンEGFPマウスより、約1万～5万個のEGFP陽性細胞を分取することが可能となった。

(2) EGFP陽性細胞においては、インスリン遺伝子の発現が低下しているのみならず、膵β細胞の機能維持に必須であることが報告されているPdx-1遺伝子発現も低下していることを明らかにした。逆に、膵内分泌細胞に特異的な転写因子BETA 2や膵外分泌細胞に特異的な転写因子p48の発現は亢進しており、本細胞は膵内分泌のみならず、膵外分泌の幹細胞であることが強く示唆された。

(4) ヒトインスリノーマEST解析で見出された256種類の転写因子を用いて独自に作成したマイクロアレーを用いて、膵β細胞・肝臓・小腸で発現の変化する (ないしは共通である) 転写因子を同定した。

#### D. 考察

本年度は、膵β細胞の幹細胞を単離することを主たる目的とし研究を遂行した。膵ランゲルハンス島より、ネスチンプロモータによって活性化されるEGFP強度を指標として、単離することが可能となった。単離した幹細胞は、予想されたようにインスリン遺伝子の発現は低かったが、それに加えて膵β細胞の機能維持に重要と考えられる転写因子Pdx-1の発現も低下していた。このことは、in vitroで幹細胞から膵β細胞に増殖分化させるにあたって、Pdx-1をいかに活性化させるかが重要であることが示唆された。また、膵内分泌細胞に特異的な転写因子BETA 2や膵外分泌細胞に特異的な転写因子p 4 8の発現は亢進しており、本細胞は膵内分泌のみならず、膵外分泌の幹細胞であることが強く示唆された。

ヒトインスリノーマEST解析で見出された256種類の転写因子を用いて独自に作成したマイクロアレーを用いて、膵β細胞・肝臓・小腸で発現の変化する(ないしは共通である)転写因子を同定するなど、DNAマイクロアレーを用いた幹細胞同定への分子資源の準備を順調に進めている。

#### E. 結論

ネスチン遺伝子のプロモータにEGFPを結合したトランスジェニックマウスから、膵β細胞の幹細胞の単離およびその特性の解析に成功した。幹細胞の表面抗原の探索が急務である。。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

- 1) Shang W, Yasuda K, Takahashi A, Hamasaki A, Takehiro M, Nabe K, Zhou H, Naito R, Fujiwara H, Shimono D, Ueno H, Ikeda H, Toyoda K, Yamada Y, Kurose T. Effect of high dietary fat on insulin secretion in genetically diabetic Goto-Kakizaki rats. **Pancreas** 25(4): 393-399, 2002.
- 2) Kuroe A, Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Nakai Y, Taniguchi A, Matsuura T, Suzuki H, Kurose T, Yasuda K, Yamada Y, Seino Y. Impaired β-cell function and insulin sensitivity in Japanese subjects with normal glucose tolerance. **Diabetes Res Clin Pract** 59(1): 71-77, 2002.
- 3) Taniguchi A, Nagasaka S, Fukushima M, Sakai M, Okumura T, Yoshii S, Watanabe T, Ogura M, Yamadori N, Nin K, Kuroe A, Yamada Y, Seino Y, Nakai Y. C-reactive protein and insulin resistance in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. **Metabolism** 51(12): 1578-1581, 2002.
- 4) Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H,

- Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst JJ, Makino M, Tashita A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomori T, Seino Y. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med* 8(7): 738-742, 2002. (Y.Y and M.K. equally contributed to the study)
- 5) Kajikawa M, Fujimoto S, Tsuura Y, Mukai E, Takeda T, Hamamoto Y, Takehiro M, Fujita J, Yamada Y, Seino Y. Ouabain suppresses glucose-induced mitochondrial ATP production and insulin release by generating reactive oxygen species in pancreatic islets. *Diabetes* 51(8): 2522-2529, 2002.
- 6) Inoue S, Inoue K, Utsunomiya M, Nozaki J, Yamada Y, Iwasa T, Mori E, Yoshinaga T, Koizumi A. Mutation, analysis in PKD1 of Japanese autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Hum Mutat* 19(6): 622-628, 2002.
- 7) Ban N, Yamada Y, Someya Y, Miyawaki K, Ihara Y, Hosokawa M, Toyokuni S, Tsuda K, Seino Y. Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\alpha$  Recruits the Transcriptional Co-activator p300 on the GLUT2 Gene Promoter. *Diabetes* 51(5): 1409-1418, 2002.
- 8) Ikebukuro K, Adachi Y, Yamada Y, Fujimoto S, Seino Y, Oyaizu H, Hioki K, Ikehara S. Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus by transplantation of islet cells plus bone marrow cells via portal vein in rats. *Transplantation* 73(4): 512-518, 2002.
- 9) Fujimoto S, Mukai E, Hamamoto Y, Takeda T, Takehiro M, Yamada Y, Seino Y. Prior exposure to high glucose augments depolarization-induced insulin release by mitigating the decline of ATP level in rat islets. *Endocrinology* 143(1): 213-221, 2002.
2. 学会発表  
山田 祐一郎、第 37 回糖尿病学の進歩  
平成 15 年 2 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
マウス MIN-6 細胞や小腸の EST については、シークエンス作業が終了次第 DDBJ (DNA database of Japan) に登録する予定である。

厚生科学研究費(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
分担研究報告書

膵β細胞幹細胞の分化に関する研究

分担研究者 山田 祐一郎 京都大学医学研究科助教授

研究要旨

ネスチン遺伝子のプロモータに EGFP を結合したトランスジェニックマウスから、FACS ソーティングによって単離した膵β細胞の幹細胞を用い、本細胞が内分泌細胞のみならず、膵外分泌細胞の幹細胞であることが強く示唆された

A. 研究目的

最近の発生工学・細胞生物学の進展により、膵β細胞の分化増殖機構が明らかにされてきた。そこで、これらの知見を応用して、幹細胞から膵β細胞を作製して供用しようとする膵β細胞の再生療法は、糖尿病の根治治療法として期待されている。本研究は、腸管上皮に存在する膵臓の幹細胞から膵β細胞を分化させることを目的としている。

B. 研究方法

ネスチン遺伝子のプロモータに EGFP (enhanced green fluorescent protein) を結合したトランスジェニックマウスから、膵ランゲルハンス島を単離し、単一の細胞に分散後、FACSで、EGFP陽性細胞を単離した。(1)これらの細胞から mRNA purification kit を用いてmRNAを抽出し、Superscript II を用いて、cDNA を合成した。得られたcDNA を realtime PCR法(Taqman)を用いて、種々の遺

伝子発現量を検索した。

(倫理面への配慮)

動物の実験に関しては、「京都大学動物実験に関する指針(昭和63年総長裁定)」に従い、動物実験に係る京都大学医学研究科内諸規則を厳守して実施した。

C. 研究結果

(1)EGFP陽性細胞においては、インスリン遺伝子の発現が低下しているのみならず、膵β細胞の機能維持に必須であることが報告されているPdx-1遺伝子発現も低下していることを明らかにした。逆に膵内分泌細胞に特異的な転写因子BETA2の発現は亢進、膵外分泌細胞に特異的な転写因子p48の発現も亢進していた。

D. 考察

膵ランゲルハンス島からネスチンプロモータで活性化されたEGFP

陽性を指標に幹細胞を単離した。膵内分泌細胞に特異的な転写因子 BETA 2 の発現は亢進、膵外分泌細胞に特異的な転写因子 p 4 8 の発現も亢進しており、本細胞が膵内分泌細胞のみならず、膵外分泌細胞の幹細胞であることが強く示唆された。

#### E. 結論

ネスチン陽性細胞は、h<sub>b</sub> な膵β細胞の幹細胞では、膵内分泌細胞のみならず、膵外分泌細胞の幹細胞であることが強く示唆された。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shang W, Yasuda K, Takahashi A, Hamasaki A, Takehiro M, Nabe K, Zhou H, Naito R, Fujiwara H, Shimono D, Ueno H, Ikeda H, Toyoda K, Yamada Y, Kurose T. Effect of high dietary fat on insulin secretion in genetically diabetic Goto-Kakizaki rats. *Pancreas* 25(4): 393-399, 2002.
- 2) Kuroe A, Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Nakai Y, Taniguchi A, Matsuura T, Suzuki H, Kurose T, Yasuda K, Yamada Y, Seino Y. Impaired β-cell function and insulin sensitivity in Japanese subjects with normal glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract* 59(1): 71-77, 2002.
- 3) Taniguchi A, Nagasaka S, Fukushima M, Sakai M, Okumura T, Yoshii S, Watanabe T, Ogura M, Yamadori N, Nin K, Kuroe A, Yamada Y, Seino Y, Nakai Y. C-reactive protein and insulin resistance in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism* 51(12): 1578-1581, 2002.
- 4) Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst JJ, Makino M, Tashita A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomori T, Seino Y. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med* 8(7): 738-742, 2002. (Y.Y and M.K. equally contributed to the study)
- 5) Kajikawa M, Fujimoto S, Tsuura Y, Mukai E, Takeda T, Hamamoto Y, Takehiro M, Fujita J, Yamada Y, Seino Y. Ouabain suppresses glucose-induced mitochondrial ATP production and insulin release by generating reactive oxygen species in pancreatic islets. *Diabetes* 51(8): 2522-2529, 2002.
- 6) Inoue S, Inoue K, Utsunomiya M, Nozaki J, Yamada Y, Iwasa T, Mori E, Yoshinaga T, Koizumi A. Mutation analysis in PKD1 of Japanese autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Hum Mutat* 19(6): 622-628, 2002.



- 7) Ban N, Yamada Y, Someya Y, Miyawaki K, Ihara Y, Hosokawa M, Toyokuni S, Tsuda K, Seino Y Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\alpha$  Recruits the Transcriptional Co-activator p300 on the GLUT2 Gene Promoter. **Diabetes** 51(5): 1409-1418, 2002.
- 8) Ikebukuro K, Adachi Y, Yamada Y, Fujimoto S, Seino Y, Oyaizu H, Hioki K, Ikehara S Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus by transplantation of islet cells plus bone marrow cells via portal vein in rats. **Transplantation** 73(4): 512-518, 2002.
- 9) Fujimoto S, Mukai E, Hamamoto Y, Takeda T, Takehiro M, Yamada Y, Seino Y. Prior exposure to high glucose augments depolarization-induced insulin release by mitigating the decline of ATP level in rat islets. **Endocrinology** 143(1): 213-221, 2002.

## 2. 学会発表

山田 祐一郎、第 37 回糖尿病学の進歩  
平成 15 年 2 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

「膵?細胞・小腸遺伝子の EST マイクロアレイ化と幹細胞特異的マーカーの同定」

分担研究者： 武田 純 群馬大学生体調節研究所  
調節機構部門遺伝情報分野 教授

研究要旨：

膵?細胞は、腸管・肝・膵管などに存在する幹細胞から、種々の転写因子の作用を受けて分化する。転写因子を効率良く収集して解析することは、幹細胞の特異性を理解するのみならず、糖尿病の再生治療の開発においても有意義である。本研究では、前駆細胞を効率よくインスリン分泌細胞に誘導するために、転写因子の収集を行ない分化に関連する特異的因子の同定を試みた。ヒトインスリノーマ EST 解析で見いだされた 256 種類の転写因子を用いて独自に作成した DNA マイクロアレイを用いて、膵?細胞・肝・小腸で共通する特異的転写因子を 11 種類同定することに成功した。

A. 研究目的

欧米人の肥満型インスリン抵抗性とは異なり、本邦の 2 型糖尿病はやせ型インスリン分泌不全を特徴とする。すなわち、発症早期から膵?細胞はグルコースに対するインスリン分泌が障害されている。インスリン分泌が高度に障害されれば、現時点ではインスリン注射による補充療法しか望めず、根治療法はない。このような補充療法では正確な血糖管理は困難であり、かつ附随して起こりうる重篤な低血糖は、生活質を大きく低下させるのみならず、特に高齢患者では致命的にもなり得る。最近の発生学的研究により、幹細胞から膵?細胞への分化・増殖機構が明らかにされつつある。

本研究では、腸管上皮に存在する膵臓の幹細胞から膵?細胞を分化誘導させることを目的とする。そのためには、腸管上皮の幹細胞

を特異的に認識する技法が要求される。そこで、幹細胞の細胞膜表面マーカーを獲得するために同細胞遺伝子の発現プロファイルを解析している。また、前駆細胞を効率よくインスリン分泌細胞に誘導する技法の開発も必要である。当該年度において分担者は膵島、肝、小腸で得意的に発現する転写因子を同定した。

B. 研究方法

EST (expressed sequence tag) クローンを用いた転写因子アレイの作成

別計画で先行しているヒト膵島 EST 解析の成績を本計画に応用した。すなわち、ヒト膵島腫瘍の cDNA ライブラリーから無作為選択した 22,000 個の EST を用いて、クラスタリング解析を行なうことにより重複しない 6,704 種類の EST プールを構築した。次いで、これら

の EST クローンを用いて転写因子マイクロアレイを作成した。すなわち、転写因子をコードする EST クローンのインサートをベクタープライマーを用いて PCR 増幅した。PCR 産物は 1% アガロース電気泳動で確認し、最終的に PCR 増幅しえた 246 種類の転写因子 EST をマイクロアレイ作成に供した。PCR 産物を精製した後、3XSSC に溶解し、OmniGrid DNA スポッターを用いてスライド上にスポットした。スポット条件は既に前年度に確立されている。

#### DNA マイクロアレイ解析

単一遺伝子異常の糖尿病 (maturity-onset diabetes of the young) の 6 種類の原因遺伝子はすべて膵島と小腸で発現しており、5 種類はさらに肝で発現している。これらの遺伝子のうち、5 種類は膵? 細胞の発生と分化に重要である転写因子をコードすることから、発生と分化に関与する新しい転写因子も同様の組織分布を示すと考えた。実際、これらの組織の発生原基は共通である。そこで肝臓と小腸で共通発現する遺伝子をマイクロアレイ解析により探索した。肝臓と小腸の mRNA を Cy3 と Cy5 で蛍光標識し、スライド上でハイブリダイゼーションを行なった後にスキャナー (ChipReader、Virtek 社) を用いてシグナルを検出した。成績は、MicroArray Suite のソフトを用いて解析した。

#### C. 研究結果

既知遺伝子と一致した EST をコード蛋白のおよその機能別に分類すると、最も種類が多かったのは、遺伝子発現/蛋白合成に関する

カテゴリーであり、全体の 23.2%であった。細胞内シグナル伝達 (19.8%)、代謝 (16.1%) が続き、細胞構造 (8.1%)、細胞防衛 (6.1%)、細胞分裂 (5.0%) に関するものはいずれも 5% 前後であった。最も多かった遺伝子発現/蛋白生成のグループをさらに亜分類すると、転写関連因子が 246 種類であり、最も多く認められた。

これら 246 種類の転写因子はマイクロアレイを用いて解析した結果、小腸だけで発現している転写因子は 33 種類であり、一方、肝臓のみで発現しているのは 26 種類であった。3 組織で共通発現している転写因子は 175 種類であったが、UniGene と dbEST のサーチの結果、その内 164 種類は 10 以上の組織と臓器に発現していたので非特異的な転写に関与すると考えられた。残りの 11 種類は特異的な転写因子と考えられた。

#### D. E. 考察と結論

当該年度は先行するヒト計画の成績を応用して特異的な転写因子を 11 種類獲得した。マウスのゲノム計画も完了しているので、これらのヒトの成績をマウスに転用することは容易である。マウス EST の収集は完了しているので、同様の解析を行ない特異的な転写因子の数を増やす予定である。ラットの塩基配列はマウスと近似しているので、別計画のラット EST の成績も本研究に転用する予定である。これらの作業により、膵島再生において重要な転写因子は網羅されるであろう。さらに、これらの転写因子発現を前駆細胞に導入することにより最終分化のインスリン産生細胞が

得られるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表・知的財産権の出願・登録状況

1 I. Yoshiuchi, K. Yamagata, Q. Zhu, I. Tamada, Y. Takahashi, K. Onigata, J. Takeda, J. Miyagawa and Y. Matsuzawa.

Identification of a gain-of-function mutation in the HNF-1 $\beta$  gene in a Japanese family with MODY.

*Diabetologia* 45: 154-155, 2002.

2 S. Sanyal, J-Y. Kim, H-J. Kim, J. Takeda, Y-K. Lee, D. D. Moore and H-S. Choi.

Differential regulation of the orphan nuclear receptor SHP gene promoter by orphan nuclear receptor ERR isoforms.

*J. Biol. Chem.* 277: 1739-1748, 2002.

3 H. Nishizawa, K. Yamagata, M. Takahashi, H. Kuriyama, K. Kishida, K. Hotta, H. Nagaretani, N. Maeda, S. Kihara, T. Nakamura, H. Nishigori, H. Tomura, D. D. Moore, J. Takeda, T. Funahashi and Y. Matsuzawa.

Small heterodimer partner, an orphan nuclear receptor, augments

PPAR $\gamma$  transactivation.

*J. Biol. Chem.* 277: 1586-1592, 2002.

4 A. Saito, Y. Kanou, M. Suzuki, H. Tomura, J. Takeda and S. Tanaka.

Sequence analysis and expressional regulation of mRNAs encoding  $\beta$ -subunits of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*.

*Biol. Reprod.* 66: 1299-1309, 2002.

5 Y. Mimura, K. Mogi, M. Kawano, Y. Fukui, J. Takeda, H. Nogami and S. Hisano.

Differential expression of two distinct vesicular glutamate transporters in the rat retina.

*Neuroreport*, 13: 1925-1928, 2002.

6 S. Hisano, K. Sawada, M. Kawano, M. Kanemoto, G. Xiong, K. Mogi, H. Sakata-Haga, J. Takeda, Y. Fukui and H. Nogami.

Expression of inorganic phosphate/vesicular glutamate transporters (BNPI/VGLUT1 and DNPI/VGLUT2) in the cerebellum and precerebellar nuclei of the rat.

*Mol. Brain Res.* 107: 23-31, 2002.

7 N. Tonooka, H. Tomura, Y. Takahashi, K. Onigata, N. Kikuchi, Y. Horikawa, M. Mori and J. Takeda.

High frequencies of mutations in

the HNF-1 $\beta$  gene in non-obese patients with diabetes of youth in Japanese and identification of a case of digenic inheritance.  
*Diabetologia* 45: 1709-1712, 2002.

武田 純  
小太り遺伝子と生活習慣病  
肥満研究 (日本肥満学会誌) 8: 82-83, 2002.

武田 純  
糖尿病と転写因子の異常  
日本内科学会雑誌 (印刷中)

研究要旨

膵β細胞の分化誘導機序に関して、その制御機構の1つであるアポトーシスの観点よりその機序を解析した。小胞体ストレスを介する機序が重要であることを新たに解明し得た。

A. 研究目的

生体内における膵β細胞は生理的な条件下においては、幹細胞から分化誘導され新たに生じる細胞と、アポトーシスにより細胞死に至る細胞が平衡状態にあるため、一定の細胞量を保っている。このことは分化誘導の機序を解明するためには、その制御機構であるアポトーシスの機構を解明することが必須であることを意味している。また、分化誘導した細胞を生体に移植し臨床応用する場合、移植細胞のアポトーシスを抑制する手段を有することは治療において大変重要な点となる。このため、本研究は分化誘導した細胞の制御機構の1つとしてアポトーシスの観点よりその機序（特に小胞体ストレスの関与の有無）を解明することを目的とした。

B. 研究方法

膵β細胞のアポトーシスの機序を解明するため、以下の3つの実験系で小胞体ストレスの関与を検討した。

1. NOによる膵β細胞株（MIN6）におけるアポトーシス誘導の解析。
2. 小胞体ストレス誘導性アポトーシス惹起転写因子（CHOP）の発現の有無とアポトーシスとの関連の解析（膵ラ氏島を用いた解析）。
3. 自然糖尿病発症モデル動物のAkitaマウス（インスリン遺伝子の点変異のため、構造異常のあるインスリンが産生される）におけるCHOPの発現の有無とアポトーシス並びに糖尿病発症との関連の解析。

C. 研究結果

1. NO放出剤SNAP処理によりMIN6においてアポトーシスが誘導された。
2. 膵ラ氏島において遺伝子工学的手法によりCHOP発現を消失させると、NO誘導性アポトーシスが抑制された。
3. Akitaヘテロマウス（原因遺伝子をヘテロに有する）においてCHOP発現を消失させると、膵β細胞でのアポトーシスが抑制され、糖尿病発症が遅延した。

D. 考察

小胞体では新規に合成される蛋白質の折り畳みが行われるが、これが妨げられると異常蛋白が蓄積して細胞機能に重大な障害となる。膵β細胞はインスリン分泌という目的のために高度に分化した細胞であるため、発達した小胞体と小胞体での厳密な蛋白調節が必要であり、このような特徴のため他の細胞に比べて小胞体ストレスを受けやすいと考えられる。2型糖尿病患者では、アポトーシスの亢進により膵β細胞数の減少を来することが報告されているため、分化誘導細胞の移植療法においてもアポトーシスを抑制する方法の開発が必要であると考えられる。その手法の1つとして小胞体ストレスを制御することでアポトーシスを減少させる可能性がある。

E. 結論

膵β細胞のアポトーシスの機序として小胞体ストレスの関与が重要であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表  
Araki, E. et al.: Internal Med. 42(1): 7-14, 2003.  
Oyadomari, S. et al.: J. Clin. Invest. 109: 525-532, 2002.
2. 学会発表  
親泊政一ら、第45回日本糖尿病学会、2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

（分担）研究報告書

1 型糖尿病モデル動物における移植膵ランゲルハンス島に対する自己免疫防止に関する研究

分担研究者 中村直登 京都府立医科大学大学院医学研究科 内分泌機能制御学 講師

研究要旨：1型糖尿病は若年に発症し、インスリンにて治療されるが、必ずしも良好に経過せず、慢性合併症にて腎不全、失明などを発症することも多い。根治療法として現在膵ランゲルハンス氏島（ラ氏島）移植が注目されている。移植療法を成功させるには拒絶反応のコントロールが必須であるが、自己免疫の再発の抑制も重要な要素である。本研究では自己免疫糖尿病を発症するBBラットに同系のラ氏島を移植し、この時、同時に抗CD4抗体を投与すると、非投与群では数日以内に糖尿病を再発するが、投与群では100日以上糖尿病を再発することなく、糖尿病を防止できた。

A 研究目的：1型糖尿病の究極の治療は膵移植であるが、拒絶反応とともに1型糖尿病の再発を克服する必要がある。今回、抗CD4抗体によって1型糖尿病の再発が防止できるか、1型糖尿病のモデル動物であるBBラットを用いて検討した。

B 研究方法：BB・DRラットに抗RT6抗体とpoly I:Cを投与することによって1型糖尿病を誘発した。インスリンにて約3週間治療後実験に使用した。同系ラットから膵ラ氏島をコ

ラゲナーゼ法にて単離し、レシピエント1匹あたり約2000個のラ氏島を肝門脈より肝内に移植した。コントロール群（n=4）にはマウスIgGを、実験群（n=4）には2.4mg/ラットのOX38（抗CD4）抗体を移植4日前より連日投与した。膵ラ氏島移植3日後に頸部リンパ節よりリンパ球を採取し蛍光抗体法にて検討した。移植後3回/週尿糖、血糖を測定した。尿糖3+以上かつ血糖200mg/dl以上にて糖尿病と判定した。

C 結果：コントロール群では5.7

日にて1型糖尿病を再発したが、実験群では全てのラットが200日以上非糖尿病であった(表1)。蛍光抗体法での検討では40%以上のOX35陽性細胞が認められ、抗CD4抗体が細胞表面に付着していると考えられた(表2)。

CD4陽性細胞  
抗マウスIgG OX35

実験群	1	43.4	45.6
	2	42.3	44.9
対照	1	1.2	44.4

E 結論：抗CD4抗体の投与はCD4陽性細胞を障害することなく、BB

表1 抗CD4抗体の1型糖尿病再発ラットの移植腓ラ氏島に対する自己免疫発防止効果 非糖尿病期間(日)の再発を防止した。

対照群	1	5
	2	7
	3	5
	4	6
実験群	1	232
	2	209
	3	214
	4	223

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表  
未発表

H 知的財産権の出願登録状況

1、特許取得

なし

2、実用新案登録

なし

表2 OX38抗体投与後の



幹細胞からの膵β細胞分化誘導に関する研究：

マウス膵切除後糖尿病発症モデルの確立及び残膵β細胞の再生、増殖

分担研究者 安波洋一

福岡大学医学部第一外科助教授

研究要旨：マウス膵切除後糖尿病発症モデルを確立した。90%膵切除術後マウスは直ちに高血糖となるが、70%切除では正常血糖で推移した。70%切除では残膵β細胞が再生増殖することより糖尿病が発症しないことが明らかとなった。

#### A. 研究目的

膵切除術後には残膵β細胞の再生増殖機能が発現していると考えられ、その解析には適切な実験モデルが必要である。マウス膵切除糖尿病発症モデルは技術的に困難で従来の研究ではラットが主に用いられてきた。しかしながらその詳細な解析には限界があり研究の進展にはマウスモデルが必須である。今回我々はマイクロサージャリーの手法を用い、マウス膵切除後糖尿病発症モデルを確立し、膵切除後残膵β細胞の再生、増殖に付き解析した。

#### B. 研究方法

雄性 BALB/c マウス (10・15週) を実験に用いた。ネンプター麻酔下に開腹、実体顕微鏡下に膵切除を行った。90%膵切除では総胆管より内側膵組織のみを残し、全て切除した。70%膵切除では総胆管内側、胃前庭下部膵組織のみを残存させた。切除率は切除膵重量比で計算した。膵切除前、切除後3及び7日、その後は週一回血糖値 (非空腹時)、体重を測定した。切除術後14及び60日に腹腔内糖負荷試験 (IPGTT) を行った。overnight (12時間) 絶食後に、2 g/kg グルコースを腹腔内に投与し、0, 30, 120分に採血した。残膵の組織学検索に関して、HE染色、免疫染色 (インスリン)、PCNA染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は福岡大学アニマルセンター倫理委員会の承認を受けている。

#### C. 研究結果

##### # 1. 膵切除術後血糖値

90%膵切除後3日目にはマウスは高血糖 (> 4

00 mg/dl) となり術後90日以上生存した。

70%膵切除後には糖尿病は発症せず正常血糖 (< 200 mg/dl) で推移した。

##### # 2. 膵切除術後耐糖能の推移

90%膵切除マウスでは術後14日、60日目いずれも糖負荷前、後の血糖値は400 mg/dl以上であった。70%膵切除マウスでは術後14日の糖負荷試験では負荷後30、120分の血糖値は無処置マウスに比し有意に高値を示した。しかしながら術後60日では無処置マウスの血糖値と有意差はなかった。

##### # 3. β細胞面積の測定

膵切除術後60日目に70又は90%膵切除後残膵組織につき切片を作成しインスリン染色を行った。残膵は十二指腸とともに一塊として摘出しブロックを作成した。残膵の断面が十二指腸の走行と90度となるように統一した。1サンプルにつき、200 μm 以上の間隔で切った4切片以上を Insulin で染色し、NIH image を用いて、サンプルごとの全膵組織面積と全 beta cell 面積を測定した。

70%膵切では無処置群、90%膵切群と比較してβ細胞面積は有意に増加していた。

##### # 4. インスリン、PCNA 二重染色

70%膵切除後残膵の切片を術後0、14、60日に作成し、インスリン、PCNA の二重染色を行った。1サンプルにつき、200 μm 以上の間隔で切片を作成し、計4切片以上を PCNA と Insulin で2重染色した。全ての Insulin 陽性細胞をカウントし、PCNA 陽性 Insulin 陽性細胞の割合を計測した。

インスリン及びPCNA 陽性細胞数は術後14日目では0、60日に比較し有意に増加していた。

#### D. 考察

本研究により70%膵切除後には残膵 $\beta$ 細胞が再生増殖していることが明らかになった。今後、このモデルにより体性幹細胞の分化増殖機構の解析が可能となる。現在残膵より膵島を単離し、 $\beta$ 細胞再生増殖に関与する転写因子の解析を行っている。また、本研究により90%膵切除によるマウス糖尿病発症モデルを確立できたが、今後は同モデルで $\beta$ 細胞再生増殖の誘導により糖尿病発症を制御する新たな知見を見出すべく実験を行っている。

#### E. 結論

マウス膵切除後糖尿病モデルを確立した。70%膵切除後には残膵 $\beta$ 細胞の再生増殖が発現していることが明らかになった。

#### F. 論文発表

Manuscript, in preparation.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shang W, Yasuda K, Takahashi A, Hamasaki A, Takehiro M, Nabe K, Zhou H, Naito R, Fujiwara H, Shimono D, Ueno H, Ikeda H, Toyoda K, Yamada Y, Kurose T.	Effect of high dietary fat on insulin secretion in genetically diabetic Goto-Kakizaki rats	<b>Pancreas</b>	25(4)	393-399	2002
Kurose A, Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Nakai Y, Taniguchi A, Matsuura T, Suzuki H, Kurose T, Yasuda K, Yamada Y, Seino Y	Impaired $\beta$ -cell function and insulin sensitivity in Japanese subjects with normal glucose tolerance.	<b>Diabetes Res Clin Pract</b>	59(1)	71-77	2002
Taniguchi A, Nagasaka S, Fukushima M, Sakai M, Okumura T, Yoshii S, Watanabe T, Ogura M, Yamadori N, Nin K, Kurose A, Yamada Y, Seino Y, Nakai Y	C-reactive protein and insulin resistance in non-obese Japanese type 2 diabetic patients	<b>Metabolism</b>	51(12)	1578-1581	2002
Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst JJ, Makino M, Tashita A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomori T, Seino Y.	Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity	<b>Nat Med</b>	8(7)	738-742	2002
Kajikawa M, Fujimoto S, Tsuura Y, Mukai E, Takeida T, Hamamoto Y, Takehiro M, Fujita J, Yamada Y, Seino Y.	Ouabain suppresses glucose-induced mitochondrial ATP production and insulin release by generating reactive oxygen species in pancreatic islets	<b>Diabetes</b>	51(8)	2522-2529	2002

Hamamoto Y, Tsu ura Y, Fujimot o S, Nagata M, T akeda T, Mukai E, Fujita J, Yama da Y, Seino Y.	Recovery of function and mass of endogenous beta-cells in streptozotocin-induced diabetic rats treated with islet transplantation	Biochem Biophys Res Commun	287(1)	104-109	2001
Shihara N, Yasuda K, Moritani T, Ue H, Uno M, Adachi T, Nunoi K, Seino Y, Yamada Y, Tsuda K	Synergistic effect of polymorphisms of uncoupling protein 1 and beta3-adrenergic receptor genes on autonomic nervous system activity	Int J Obes	25(6)	761-766	2001

Inoue S, Inoue K, Utsunomiya M, Nozaki J, Yamada Y, Iwasa T, Mori E, Yoshinaga T, Koizumi A	Mutation analysis in PKD1 of Japanese autosomal dominant polycystic kidney disease patients	Hum Mutat	19(6)	622-628	2002
Ban N, Yamada Y, Someya Y, Miyawaki K, Ihara Y, Hosokawa M, Toyokuni S, Tsuda K, Seino Y.	Hepatocyte Nuclear Factor-1 Recruits the Transcriptional Co-activator p300 on the GLUT2 Gene Promoter	Diabetes	51(5)	1409-1418	2002
Ikebukuro K, Adachi Y, Yamada Y, Fujimoto S, Seino Y, Oyaizu H, Hioki K, Ikehara S	Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus by transplantation of islet cells plus bone marrow cells via portal vein in rats	Transplantation	3(4)	512-518	2002
Fujimoto S, Mukai E, Hamamoto Y, Takeda T, Takehiro M, Yamada Y, Seino Y. : , 2002	Prior exposure to high glucose augments depolarization-induced insulin release by mitigating the decline of ATP level in rat islets.	Endocrinology	143(1)	213-221	2002
I. Yoshiuchi, K. Yamagata, Q. Zhu, I. Tamada, Y. Takahashi, K. Onigata, J. Takeda, J. Miyagawa and Y. Matsuzawa.	Identification of a gain-of-function mutation in the HNF-1b gene in a Japanese family with MODY.	Diabetologia	45	154-155	2002
S. Sanyal, J-Y. Kim, H-J. Kim, J. Takeda, Y-K. Lee, D. D. Moore and H-S. Choi.	Differential regulation of the orphan nuclear receptor SHP gene promoter by orphan nuclear receptor ERR isoforms.	J. Biol. Chem	277	1739-1748	2002