

厚生労働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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 裕

平成16(2004)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 -----	4
山田祐一郎	
2. 膵島分化に関与する転写因子 LRH-1 のコード遺伝子多型と 2 型糖尿病の感受性 -----	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 -----	14
荒木 栄一	
4. 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 -----	21

膵β細胞幹細胞の分化に関する研究

主任研究者 清野 裕 京都大学医学研究科教授

研究要旨

ネスチンプロモータによって活性化される EGFP 強度を指標として膵β細胞の前駆細胞を単離することが可能となった。単離した前駆細胞は、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。一方、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/前駆細胞であることが強く示唆された。in vitro では増殖させることは困難であるため、血糖をコントロールしながら in vivo で増殖させることが有効であると考えられた。

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、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性があること以外に、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細胞を複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。

B. 研究方法

次の 3 つの研究計画から構成されている。①神経細胞の幹細胞で発現が報告されている intermediate filament で

あるネスチンなど幹細胞に特異的に発現する因子に着目し、これらの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(EGFPマウス)から、膵β細胞の幹細胞の単離解析する。②小腸粘膜や膵島に発現するESTを単離同定し、これらを用いてmicroarrayを構築する。幹細胞に特異的に発現する因子をmicroarray法により同定する。③幹細胞ないしは分化した膵β細胞を門脈内に投与し治療に結びつける移植法を開発する。

(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陽性細胞をその発現レベルから、2つの群(highとlow)に分けることができた。pelletにおいては、いずれの群も存在していたが、膵ランゲルハンス島ではlow群のみが確認された。
(2)pelletに認められたhigh群において、ネスチン遺伝子やEGFP遺伝子が確認され、sortが有効にされていることが明らかとなった。
(3)high群において、他の遺伝子発現を確認すると、インスリン・グルカゴン・ソマトスタチン・PPなど内分泌

細胞の遺伝子の発現はない、または低い。転写因子Pdx-1、NeuroD(BETA2)、p48やアミラーゼの遺伝子が発現していた。

(4)low群においては、ネスチン遺伝子やEGFP遺伝子の発現は、ほとんど認められなかった。したがって、本細胞群に認められるEGFP蛋白の発現(FACSで蛍光発光を確認)との乖離があることがわかった。また、インスリン・グルカゴン・ソマトスタチン・PPなど内分泌細胞の遺伝子の発現が認められた。

(5)膵ランゲルハンス島から単離したlow群の遺伝子発現は、pelletから単離したlow群と類似した発現様式であった。

(6)adultの膵におけるネスチン陽性細胞の発現は、膵ランゲルハンス島では少なく、外分泌領域に散在していることを確認した。

(7)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microarrayを作成した。

(8)作成したmicroarray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。

(9)放出薬投与により膵β細胞由来細胞株MIN6においてアポトーシスが誘導され、一方、膵島において遺伝子工学的手法によりCHOP遺伝子の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。

(10)in vivoにおいても、Akita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た。

(11)移植後も血糖コントロールを維持することが出来れば、移植した膵ランゲルハンス島の被膜の外部にもインスリン陽性細胞が出現することを確認した。

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陽性を指標に細胞を単離した。ネスチン遺伝子の発現様式から、high群からlow群へと細胞の性質が推移していくものと考えられた。high群がPdx1、NeuroD、p48の発現があるが、インスリン・グルカゴン・ソマトスタチン・PPなど内分泌細胞の遺伝子の発現はないこと、low群ではインスリン・グルカゴン・ソマトスタチン・PPなど内分泌細胞の遺伝子の発現が出現することから考えて、本細胞が膵内分泌細胞の幹/前駆細胞であることが明らかとなった。また、本細胞に外分泌細胞の特徴であるp48やアミラー

ゼが発現していることから、外分泌細胞への系譜も考えられた。

また、糖尿病発症が遅延し、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得る可能性がある。

E. 結論

ネスチン陽性細胞は、膵内分泌細胞のみならず、膵外分泌細胞の幹/前駆細胞であることが強く示唆された。

インスリン依存の糖尿病患者への治療法として、脳死ドナーから得られた膵島を用いる移植法（エドモントン・プロトコール）が近年発表され、欧米では大々的に展開されているが、なお症例は300例に留まっている。わが国では心臓死からの膵島移植ないしは生体膵島移植が提案されているが、まだ実施された症例はない。すなわち、ドナー不足が深刻であり、本研究で膵β細胞の前駆細胞を単離出来たことは、ドナー不足の改善につながることを期待される。

F. 健康危険情報

とくになし。

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膵β細胞の幹細胞を単離した。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、Ficoll-Conray 法で膵ランゲルハンス島と残りの膵組織 (pellet) に分け、それぞれ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 purifica-

tion 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。また、ネスチン EGFP トランスジェニックマウスの adult の膵と腸管などを単離し、免疫染色法によってネスチン発現細胞を同定した。

(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 陽性細胞をその発現レベルから、2つの群(high と low)に分けることができた。pellet においては、

いずれの群も存在していたが、腓ランゲルハンス島では low 群のみが確認された。

(2)pellet に認められた high 群において、ネスチン遺伝子や EGFP 遺伝子が確認され、sort が有効にされていることが明らかとなった。

(3)high 群において、他の遺伝子発現を確認すると、インスリン・グルカゴン・ソマトスタチン・PP など内分泌細胞の遺伝子の発現はない、または低いが、転写因子 Pdx-1、NeuroD(BETA2)、p48 やアミラーゼの遺伝子が発現していた。

(4)low 群においては、ネスチン遺伝子や EGFP 遺伝子の発現は、ほとんど認められなかった。したがって、本細胞群に認められる EGFP 蛋白の発現

(FACS で蛍光発光を確認)との乖離があることがわかった。また、インスリン・グルカゴン・ソマトスタチン・PP など内分泌細胞の遺伝子の発現が認められた。

(5)腓ランゲルハンス島から単離した low 群の遺伝子発現は、pellet から単離した low 群と類似した発現様式であった。

(6)adult の腓におけるネスチン陽性細胞の発現は、腓ランゲルハンス島では少なく、外分泌領域に散在していることを確認した。

D. 考察

腓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 陽性を指標に細胞を単離した。high 群すなわちネスチン遺伝子発現細胞群は、腓のマスター遺伝子とも考えられる転写因子 Pdx-1 に加え、腓内分泌細胞に特異的な転写因子 NeuroD の発現、腓外分泌細胞に特異的な転写因子 p48 の発現も認めた。一方、ネスチン遺伝子は発現せず、EGFP の蛋白発現のみを認めた群を同定した。したがって、ネスチン遺伝子の発現から考えて、high 群から low 群へと細胞の性質が推移していくものと考えられた。high 群が Pdx1、NeuroD、p48 の発現があるが、インスリン・グルカゴン・ソマトスタチン・PP など内分泌細胞の遺伝子の発現はないこと、low 群ではインスリン・グルカゴン・ソマトスタチン・PP など内分泌細胞の遺伝子の発現が出現することから考えて、本細胞が腓内分泌細胞の幹/前駆細胞であることが強く示唆された。また、本細胞に外分泌細胞の特徴である p48 やアミラーゼが発現していることから、外分泌細胞への系譜も考えられた。

E. 結論

ネスチン陽性細胞は、腓内分泌細胞のみならず、腓外分泌細胞の幹/前駆細胞

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) Suzuki H, Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Taniguchi A, Nakai Y, Matsuura T, Yasuda K, Hosokawa M, Seino Y, Yamada Y. IGT with fasting hyperglycemia is more strongly associated with microalbuminuria than IGT without hyperglycemia. **Diabetes Res Clin Pract** (in press).
- 2) Inada A, Hamamoto Y, Tsuura Y, Miyazaki J, Toyokuni S, Ihara Y, Nagai K, Yamada Y, Bonner-Weir S, Seino Y. Overexpression of inducible cyclic AMP early repressor inhibits transactivation of genes and cell proliferation in pancreatic β cells. **Mol Cell Biol** 24(7): 2831-2841, 2004.
- 3) Hansotia T, Baggio LL, Delmeire D, Hinke SA, Yamada Y, Tsukiyama K, Seino Y, Holst JJ, Schuit F, Drucker DJ. Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory action of DPP-IV inhibitors. **Diabetes** (in press).
- 4) Suzuki H, Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Taniguchi A, Nakai Y, Matsuura T, Kuroe A, Yasuda K, Kurose T, Seino Y, Yamada Y. Factors responsible for development from normal glucose tolerance to isolated postchallenge hyperglycemia. **Diabetes Care** 26(4): 1211-1215, 2003.
- 5) Sugawara F, Yamada Y, Watanabe R, Ban N, Miyawaki K, Kuroe A, Hamasaki A, Ikeda H, Kurose T, Usami M, Ikeda M, Seino Y. The role of the TSC-22 (-396) A/G variant in the development of diabetic nephropathy. **Diabetes Res Clin Pract** 60(3): 191-197, 2003.
- 6) Hamamoto Y, Fujimoto S, Inada A, Takehiro M, Nabe K, Shimono D, Kajikawa M, Fujita J, Yamada Y, Seino Y. Beneficial effect of pretreatment of islets with fibronectin on glucose tolerance after islet transplantation. **Horm Metab Res** 35(8):460-465, 2003.
- 7) Oya M, Hosokawa M, Tsukada H, Fukuda K, Nakamura H, Tsukiyama K, Nagashima K, Fujimoto S, Yamada Y, Seino Y. Effects of an aldose reductase

- inhibitor on gastroenteropathy in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetes Res Clin Pract** 62(2):69-77, 2003.
- 8) Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M, Seko S, Tanaka J, Uchida K, Nagashima K, Kurose T, Yamada Y, Chiba T, Seino Y. High prevalence of autoantibodies against carbonic anhydrase II and lactoferrin in type 1 diabetes: concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas. **Pancreas** 27(1):26-30, 2003.
- 9) Fujimoto S, Matsushima A, Yoshitani K, Oya M, Shimono D, Takeda T, Kurose T, Yamada Y, Seino Y. Type-1 diabetes mellitus with insufficient serum immunoreactive insulin elevation after subcutaneous NPH-insulin injection. **Diabetes Res Clin Pract** 60(1): 69-73, 2003.
- 10) Taniguchi A, Nishimura F, Murayama Y, Nagasaka S, Fukushima M, Sakai M, Yoshii S, Kuroe A, Suzuki H, Iwamoto Y, Soga Y, Okumura T, Ogura M,
なし
3. その他
なし
- Yamada Y, Seino Y, Nakai Y. Porphyromonas gingivalis infection is associated with carotid atherosclerosis in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. **Metabolism** 52(2): 142-145, 2003.
- 11) Pamir N, Lynn FC, Buchan AM, Ehses J, Hinke SA, Pospisilik JA, Miyawaki K, Yamada Y, Seino Y, McIntosh CH, Pederson RA. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor null mice (GIPR^{-/-}) exhibit compensatory changes in the enteroinsular axis. **Am J Physiol** 284(5): E931-939, 2003.
2. 学会発表
山田 祐一郎、第 37 回糖尿病学の進歩
豊田健太郎、山田祐一郎、第 47 回日本
糖尿病学会
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

「膵島分化に関与する転写因子 LRH-1 のコード遺伝子多型と 2 型糖尿病の感受性」

分担研究者： 武田 純

岐阜大学医学部免疫アレルギー内分泌講座

内分泌代謝病態学分野 教授

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β細胞は、腸管・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。膵島特異的に発現する遺伝子とその発現を制御する転写因子を効率良く同定して解析することは、幹細胞からの特異的な分化機構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。前年度までに膵島で発現する転写因子を多数集積した。本年度の研究では、これらのコード遺伝子について SNP 関連解析を行ない、糖尿病発症リスクに関与する転写因子を求めた。その結果、膵島の発生に重要な HNF-3β と共発現しているオーファン受容体 LRH-1 遺伝子の発現量の差異が 2 型糖尿病発症と関連することを見出した。

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β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β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β細胞を分化誘導させることを目的とする。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は、膵島の組織特異性の獲得に関与する遺伝子を制御する転写因子の同定が重要である。初年度に大規模 EST (expressed sequence tag) の収集とマイクロアレイ解析により、比較的特異性の高い転写因子遺伝子を収集することができた。この遺伝子プールの中から、分化誘導遺伝子を下流に有する転写因子を

選別することが必要である。効率良く選別するためには、下流標的となる膵島特異的遺伝子群を先ず同定して逆に上流因子を探索することが効果的である。第2年度に、ESTアレイと *in situ* hybridization 解析を用いて膵島で比較的高発現する転写因子を集積した。当該年度は、これらの転写因子遺伝子の SNP ハプロタイプを用いて糖尿病発症との関連解析を行なった。

B. 研究方法

転写因子遺伝子における SNP スクリーニングと連鎖不平衡を利用したハプロタイプ関連解析

膵島特異的な発現を解析するためには EST クローンを用いた *in situ* hybridization (ISH) が有効である。従って、大量の組織切片を効率的に調製するためにはラットの EST が扱いやすく望ましい。そこで昨年度に、ラット膵島腫瘍とインスリン産生細胞株 RINm5F の一方向性 cDNA ライブラリーから無作為選択した EST を用いて ISH スクリーニングを開始した。この過程で得られた転写因子の中で、膵島の発生と分化に関与すると考えられるコード遺伝子について当該年度は直接解析を行なった。先ず、若年発症成人型糖尿病 (MODY, maturity-onset diabetes of the young) 100 例について、エクソン領域を直接シーケンス法により疾患発症の原因となる変異の有無をスクリーニングした。ついで、この過程で得られたエクソン領域の一塩基多型 (SNP, single nucleotide polymorphism) とイントロン

領域を新たにスクリーニングして得られた SNPs を用いて連鎖不平衡 (LD, linkage disequilibrium) 解析をおこなった。同じ LD ブロックに属する SNPs についてはハプロタイプを構築し、ケースコントロール解析に供した。

C. 研究結果

一連の HNF (hepatocyte nuclear factor) 転写因子の異常によりインスリン分泌不全 (MODY1; 3-6) が生じる。またこれらの遺伝子は膵島の発生と分化に重要であることが知られている。そこで、HNF-3 β に転写制御され、膵島の発生初期に同組織で発現している LRH-1 (liver receptor homolog-1) 遺伝子に着目した。

先ず、LRH-1 遺伝子がゲノム上約 150 kb にわたり、8 つのエクソンから構成されることを明らかにした。MODY 100 例の変異スクリーニングでは疾患発症の原因となる異常は見出せなかった。次に、日本人成人発症 2 型糖尿病 192 例と健常者 192 例 (年齢 >60 years; HbA1c < 5.6%, BMI < 23 kg/m², 糖尿病家族歴なし) について LRH-1 遺伝子の全エクソンと近接プロモーター領域を直接シーケンス法によりスクリーニングしたが、同様に発症の成因となる変異は見出せなかった。そこで、関連解析に用いる SNPs を同定するため、正常者 16 人の LRH-1 ゲノムを約 100 kb シーケンスした。その結果、頻度の高い 22 個の SNPs を同定することができた。これらについて連鎖不平衡係数を見積もることにより、4 つのハプロタイプブ

ロックを見出した。得られた SNP ハプロタイプを用いた解析の結果、成人発症 2 型糖尿病群と対照群の間で有意差 (OR 2.64) のあるアリルとハプロタイプをプロモーター上流領域に見出した。そこで同塩基置換が遺伝子の発現量に及ぼす影響を解析するためにルシフェラーゼアッセイを施行した。その結果、転写活性は同塩基置換により 24% 低くなることが判明した。次いでゲルシフトアッセイを行ない、cis-エレメントを認識する trans-エレメントの有無を解析した。その結果、感受性アリルの塩基置換部位にはある転写調節蛋白が結合せず、転写活性の低下の成因となることを明らかにした。

D. E. 考察と結論

LRH-1 は、肝臓、膵臓に発現の強い転写因子であり、SHP (small heterodimer partner) との相互作用により胆汁酸代謝で重要な役割を果たすことが知られている。最近、LRH-1 は SR-BI (scavenger receptor class B type I) を介してコレステロール代謝に関与することも報告された。一方、SHP 遺伝子の異常はインスリン過分泌を介して胎児の子宮内生育の増進と生後の過体重の成因となることを我々は既に明らかにしている。SHP は LRH-1 に結合し、自身を含めて標的遺伝子の発現を制御する。従って、LRH-1 遺伝子もインスリン分泌不全に関連する可能性が考えられる。実際、LRH-1 遺伝子を欠失させたマウスが最近開発されたが、同マウスでは膵島の発達障害が観察

された。

当該年度の研究により、LRH-1 遺伝子のプロモーター多型が 2 型糖尿病発症と関連することが明らかとなった。また、この多型により遺伝子の発現量が変化することも明らかとなった。ノックアウトマウスの成績と合わせることによって、膵島の形成不全は 2 型糖尿病発症の背景となることが示唆された。従って、転写因子 LRH-1 を直接的にあるいが間接的に制御する物質を同定することができれば、膵島の発生分化のみならず、糖尿病におけるインスリン分泌不全の治療薬および根治的な再生医療の開発を可能にするものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(英文論文)

1. Y. Horikawa, N. Oda, L. Yu, K. Fujiwara, M. Makino, Y. Seino, M. Itoh and J. Takeda. Genetic variations in CAPN10 are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 244-247, 2003.
2. M. Hayashi, H. Yamada, S. Uehara, R. Morimoto, A. Muroyama, S. Yatsushiro, J. Takeda, A. Yamamoto and Y. Moriyama. Secretory granule-mediated

- co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans.
J. Biol. Chem. 278: 1966-1974, 2003.
3. Q. Zhu, K. Yamagata, A. Miura, N. Shihara, Y. Horikawa, J. Takeda, J. Miyagawa and Y. Matsuzawa.
 T130I mutation in HNF-4 α gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type II diabetes mellitus in Japanese subjects.
Diabetologia 46: 567-573, 2003.
4. T. Tanaka, K. Ikari, K. Furushima, A. Okada, H. Tanaka, K. Furukawa, K. Yoshida, T. Ikeda, S. Ikegawa, S. Hunt, J. Takeda, S. Toh, S. Harata, T. Nakajima and I. Inoue
 Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses pinpoint the ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine to COL6A1 locus on chromosome 21.
Am. J. Hum. Genet. 73: 812-822, 2003.
5. A. N. Smith, R. C. Lovering, M. Futai, J. Takeda, D. Brown and F. E. Karet.
 Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H⁺-ATPase subunit genes.
Mol. Cell 12: 801-803, 2003.
6. J. Lin, H. Wang, T. Narita, R. Kikuno, O. Ohara, N. Shihara, T. Nishigori, Y. Horikawa and J. Takeda.
 Expression profile of mRNAs from human pancreatic islet tumors.
J. Mol. Endocrinol. 31: 519-528, 2003.
7. Y. Shimamoto, J. Ishida, K. Yamagata, T. Saito, H. Kato, T. Matsuoka, K. Hirota, H. Daitoku, M. Nangaku, K. Yamagata, H. Fuji, J. Takeda and A. Fukamizu.
 Inhibitory effect of small heterodimer partner hepatocyte nuclear factor-4 mediates bile acid-induced repression of human angiotensinogen gene.
J. Biol. Chem. 279: 7770-7779, 2004.
8. M. Enya, Y. Kanoh, T. Mune, M. Ishizawa, H. Sarui, M. Yamamoto, N. Takeda, K. Yasuda, M. Yasujima, S. Tsutaya and J. Takeda.
 Depressive state and paresthesia dramatically improved by intravenous MgSO₄ in Gitterman's syndrome.
Intern. Med. (In press)
9. J-H. Kim, H-J. Kim, H-A. Seong, K-C. Park, A. Sanyal, J. Takeda, H. Ha, M. Shong, M-J. Tsai and H-S.

- Choi.
Orphan nuclear receptor SHP, a novel corepressor for a basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor BETA2/NeuroD. Mol. Endocrinol. (In press)
10. N. Shihara, Y. Horikawa, T. Onishi, M. Ono, K. Kashimada and J. Takeda. Identification of a *de novo* case of hepatocyte nuclear factor-1? deficiency with highly varied phenotypes. Diabetologia (In press)
11. M. Nishimura, T. Miki, N. Yokoi, Y. Horikawa, H. Yoshioka, J. Takeda, O. Ohara and S. Seino
Construction of a multi-functional cDNA library specific for normal mouse pancreatic islets and its application to microarray. DNA Res. (In revision)
12. Y. Horikawa, L. Yu, N. Yamada, N. Oda, Y. Seino and J. Takeda. The P200T mutation of CAPN10 is associated with increased susceptibility to type 2 diabetes in Japanese. J. Clin. Endocrinol. Metab. (in revision)
13. T. Kawamoto, Y. Horikawa, T. Tanaka, N. Kabe, J. Takeda and M. Mikuni. Genetic variations in the *WFS1* gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder. Mol. Genet. Metab. (In submission)
14. T. Tanaka, Y. Horikawa, T. Kawamoto, N. Kabe, Y. Nozaki, I. Ida, J. Takeda and M. Mikuni. Expression profile of mRNAs from rat hippocampus and its application to microarray. Mol. Brain Res. (In submission)
- (和文論文)
1. 武田 純
「糖尿病遺伝子と妊娠」
In; 妊娠と糖尿病:診療スタンダード、金芳堂、pp241-244, 2003.
2. 山本真由美、武田 純
「糖尿病」
In; 分子予防環境医学、本の泉社、pp454-461, 2003.
3. 堀川幸男、武田 純
「2型糖尿病の遺伝学的解剖」
最新医学 58: 124-130, 2003.
4. 堀川幸男、武田 純
「カルパイン10とは？」
肥満と糖尿病 2: 37-39, 2003.
5. 堀川幸男、志原伸幸、武田 純
「糖尿病と転写因子」
日本内科学会誌 92: 890-896, 2003.
6. 堀川幸男、志原伸幸、武田 純
「多因子病の遺伝子解析におけるハプロタイプ解析の意義」
内分泌・糖尿病科 16: 567-572, 2003.

7. 志原伸幸、西郡俊絵、西郡秀和、武田純
「遺伝子異常による糖尿病」
周産期医学 33: 436-440, 2003.
8. 佐々木昭彦、武田純
「糖尿病と遺伝子異常」
医学のあゆみ 207: 625-629, 2003.
9. 武田純
「2型糖尿病の感受性素因」
In: ヒトゲノム、中山書店 (印刷中)
10. 武田純
「糖尿病の遺伝相談」
In: 遺伝相談、医学書院 (印刷中)
11. 川地慎一、武田純
「転写因子による ? 細胞機能の調節」
医学のあゆみ (印刷中)
12. 佐久間博也、武田純
「MODYと2型糖尿病」
小児科診療 (印刷中)
13. 塩谷真由美、堀川幸男、武田純
「糖尿病網膜症の遺伝因子」
Diabetes Frontier (印刷中)
14. 塩谷真由美、加納克徳、宗友厚、石澤正剛、山本真由美、猿井宏、武田純、武田純
則之、安田圭吾、保嶋実、高谷昭司、
「Mg 製剤により精神症状が劇的に改善した Gitelman 症候群の1例」
岐阜県内科医会雑誌 (印刷中)

研究課題：幹細胞からの膵β細胞分化誘導に関する研究

課題番号：H13—再生—

主任研究者：京都大学大学院医学研究科 糖尿病・栄養内科学

清野 裕

分担研究者：熊本大学大学院医学薬学研究部 代謝内科学

荒木 栄一

1. 研究目的

分化誘導した細胞を生体に移植する際に、移植細胞にアポトーシスが誘導され移植細胞の減少が起こるか否かは重要な問題である。また逆に、ある病的な環境下では膵β細胞数が減少すると、再生が起こり細胞数が回復することがあることがわかっている。そこで本研究では病的環境下における膵β細胞のアポトーシスを小胞体ストレスとの関連で解析すると共に、再生の機構を解明することを目的とした。

2. 研究方法

1. 膵β細胞での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を培養細胞、モデルマウスにより解析した。

2. マウスに膵β細胞障害性を有するストレプトゾトシンを投与し、膵β細胞の再生過程における分化因子の発現と組織学的変化を解析した。

（倫理面への配慮）

実験動物に苦痛を与える場合、麻酔を行った。

3. 研究結果

1. 膵β細胞では小胞体ストレスにより、CHOPを介したアポトーシスを惹起することが明らかとなった。

2. 膵β細胞の再生過程においては Pdx-1 (pancreatic and duodenal homeobox-1)などの分化因子が発現しており、その発現は発生段階におけるものと類似していることが明らかとなった。

4. 考察

移植膵β細胞のアポトーシスを抑制するためには小胞体ストレスを制御することが必要であり、移植膵β細胞の再生のためには、発生段階と類似の分化因子を利用し得ると考えられる。

5. 評価

1) 達成度について

膵β細胞の維持、増殖に関する新しい機構を同定する事が出来た。この観点から目的をほぼ達成出来た。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

新たなアポトーシスの機序としての小胞体ストレスの意義を世界で初めて明らかにし得た。また移植細胞増殖への可能性を明らかに出来た。

3) 今後の展望について

移植細胞の細胞死の予防、細胞増殖への応用が可能となる。

4) 研究内容の効率性について

研究はアポトーシス機序解析と再生機序解析の2グループにより効率的に行われた。

6. 結論

移植細胞の維持に関して小胞体ストレスにより起こるアポトーシスを抑制する必要があること、また移植細胞を増殖（再生）させる方法として発生段階における分化因子の応用可能性について明らかにした。

7. 研究発表

1) 国内

口頭発表 4件

原著論文による発表 0件

それ以外（レビュー等）の発表 5件

そのうち主なもの

論文発表

荒木栄一、親泊政一、森正敬

糖尿病と小胞体ストレス

生化学 第75巻、第10号、1324-1331、2003

学会発表

親泊政一、荒木栄一

Akita マウス糖尿病における小胞体ストレス関与の証明

第45回日本糖尿病学会年次学術集会

（著者・題名・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入）

2) 海外

口頭発表 3件

原著論文による発表 1件

それ以外（レビュー等）の発表 3件

そのうち主なもの

論文発表

Oyadomari S., Koizumi A., Takeda K., Gotoh T. Akira S., Araki E. and Mori M.

Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes.

J.Clin.Invest. 109, 525-532, 2002

学会発表

S.Oyadomari, A.Koizumi, K.Takeda, T.Gotoh, S.Akira, E.Araki, and M.Mori

Impact of endoplasmic reticulum stress pathway in apoptosis of pancreatic b-cell: the role of CHOP in the Akita Mouse

American Diabetes Association Annual Meeting

（著者・題名・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入）

8. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得: なし。

2. 実用新案登録: なし。

3. その他: 特記事項なし。

マウス胎児膵組織移植、膵切除モデルを用いた膵β細胞の再生に関する研究

分担研究者 安波洋一

福岡大学医学部第一外科助教授

1. 研究目的

幹細胞からの膵β細胞分化誘導を明らかにする為には適切な実験モデルの開発が必須である。本研究ではマウス胎児膵組織移植及び膵切除糖尿病発症モデルを確立しその実験系を用いて前者では移植後胎児膵グラフト、後者では残膵における膵β細胞の分化誘導、幹細胞の同定およびその動態解析を行うことを目的とした。

2. 研究方法

胎児膵組織移植：胎生18日目のマウス膵臓を実体顕微鏡下に摘出しストレプトゾトシン(STZ)糖尿病マウスの腎皮膜下に移植し、経時的にグラフト機能、形態(免疫組織染色)を検討した。

膵部分切除：実体顕微鏡下に70あるいは90%膵切除を行い、残膵機能、形態を解析した。

(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た。

3. 研究成果

胎児膵グラフトに於ける膵β細胞再生：形態学的に移植後胎児膵グラフトの外分泌細胞は脂肪変性し、膵管、膵島細胞のみが残存することが判明した。機能的には移植後30日後にストレプトゾトシン糖尿病レシピエントの高血糖が正常化できることが明らかになり、この移植条件下で高血糖を是正できる十分量の膵島β細胞が移植後グラフト内で分化増殖したと考えられた。形態学的に時間の経過とともにグラフト内で膵島の成熟過程を観察できた。また免疫組織染色でグラフト内膵管上皮にインスリン陽性細胞、PP陽性細胞、REG

蛋白陽性細胞が出現した。インスリン陽性PCNA陽性細胞の出現は移植後14日目がピークであった。

膵切除後残膵β細胞再生：

70%膵切除後には糖尿病は発症しなかったが、術後早期には耐糖能が有意に悪化した。しかし2ヶ月後には正常化し、残膵β細胞再生が示唆された。形態学観察(免疫組織染色)で残膵β細胞面積、インスリンPCNA陽性細胞の増加が確認された。

90%膵切除では術後3日目よりマウスは高血糖となり90日以上生存した。残膵β細胞の再生は認められなかった。90%膵切除糖尿病発症後に膵島の腎皮膜下移植により高血糖を是正し、一定期間後に膵島グラフトを含む腎臓を摘出し血糖値の推移で残膵β細胞再生を検討するモデルを作成した。残膵β細胞の再生が炎症惹起物質で促進されることが判明した。

4. 考察

胎児膵組織移植及び膵切除モデルは膵β細胞の再生増殖の解析に有用な実験系であることが判明した。また膵β細胞の再生増殖刺激として炎症によるシグナルが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

5. 評価

1) 達成度について

膵β細胞再生を解析する為の実験モデルは確立できた。膵β細胞再生のメカニズムに関

して膵β細胞に分化する体性幹細胞の適切な指標が現時点までに見いだせず詳細なメカニズムの解析は今後の課題とした。

2) 研究成果の学術的、国際的、社会的意義について

膵β細胞再生の解析を可能にする実験モデルは従来まではラットが中心で今回の研究でマウスモデルが確立できた。特にマウス90%膵切糖尿病発症モデルに関する既報告はなく学術的、国際的に極めて有意義と思われる。本研究はインスリン依存糖尿尿に対する新しい治療法の開発に寄与により社会的意義を有すると考えられる。

3) 今後の展望について

膵β細胞に分化する体性幹細胞を同定できる適切な指標が見出されれば、今回確立されたモデルを用いて、その動態解析により膵β細胞の再生増殖を促進する新たな因子が同定できる可能性があり、インスリン依存糖尿病の新たな治療法の開発に貢献できる。

4) 研究内容の効率性について

マウス胎児膵組織移植、膵切除により膵β細胞再生増殖を検索するモデルが確立できた。また、膵切糖尿病発症に膵島移植を併用するモデルを用いて残膵β細胞の再生、増殖を促進するシグナルを見出した。よって研究は効率よく実施されたと判断できる。

6. 結論

マウス胎児膵組織移植及び膵切除糖尿病発症モデルを確立し、その実験系を用いて移植後胎児膵グラフト、及び膵切除後残膵における膵β細胞の再生増殖の知見を見出した。この実験モデルは今後、インスリン産生細胞へ分化する幹細胞の同定、動態解析、誘導メカニズムの解明等、今後の研究

発展に有用と判断される

7. 研究発表。

1) 国内

口頭発表 4件

学会発表

椎葉昌史、安波洋一、平川栄二、池田靖洋、田中雅夫。マウス同系胎児膵組織移植モデルにおける膵島の分化、再生の解析。

日本外科学会雑誌 103 巻臨時増刊号:262, 2002.

椎葉昌史、安波洋一、中野昌彦、勝田 仁、小野順子、安西慶三、池田靖洋。マウス膵部分切除モデルにおける膵島再生。糖尿病 46(suppl 1): S138, 2003.

論文発表

Manuscript, in preparation

8. 知的所有権の出願、取得状況

特になし。

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
Suzuki H, Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Taniguchi A, Nakai Y, Matsuura T, Yasuda K, Hosokawa M, Seino Y, Yamada Y	IGT with fasting hyperglycemia is more strongly associated with microalbuminuria than IGT without hyperglycemia.	Diabetes Res Clin Pract	in press		
Inada A, Hamamoto Y, Tsuura Y, Miyazaki J, Toyokuni S, Ihara Y, Nagai K, Yamada Y, Bonner-Weir S, Seino Y	Overexpression of inducible cyclic AMP early repressor inhibits transactivation of genes and cell proliferation in pancreatic β cells.	Mol Cell Biol	24 (7)	2831-2841	2004
Hansotia T, Baggio LL, Delmeire D, Hinke SA, Yamada Y, Tsukiyama K, Seino Y, Holst JJ, Schuit F, Drucker DJ.	Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory action of DPP-IV inhibitors.	Diabetes	in press		
Suzuki H, Fukushima M, Usami M, Ikeda M, Taniguchi A, Nakai Y, Matsuura T, Kuroe A, Yasuda K, Kurose T, Seino Y, Yamada Y.	Factors responsible for development from normal glucose tolerance to isolated postchallenge hyperglycemia.	Diabetes Care	26 (4)	1211-1215	2003

Sugawara F, Yamada Y, Watanabe R, Ban N, Miyawaki K, Kuroe A, Hamasaki A, Ikeda H, Kurose T, Usami M, Ikeda M, Seino Y.	The role of the TSC-22 (-396) A/G variant in the development of diabetic nephropathy.	Diabetes Res Clin Pract	60 (3)	191-197	2003.
Hamamoto Y, Fujimoto S, Inada A, Takehiro M, Nabe K, Shimono D, Kajikawa M, Fujita J, Yamada Y, Seino Y.	Beneficial effect of pretreatment of islets with fibronectin on glucose tolerance after islet transplantation.	Horm Metab Res	35 (8)	460-465	2003
Oya M, Hosokawa M, Tsukada H, Fukuda K, Nakamura H, Tsukiyama K, Nagashima K, Fujimoto S, Yamada Y, Seino Y.	Effects of an aldose reductase inhibitor on gastroenteropathy in streptozotocin- diabetic rats.	Diabetes Res Clin Pract	62 (2)	69-77	2003
Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M, Seko S, Tanaka J, Uchida K, Nagashima K, Kurose T, Yamada Y, Chiba T, Seino Y.	High prevalence of autoantibodies against carbonic anhydrase II and lactoferrin in type I diabetes: concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas.	Pancreas	27 (1)	26-30	2003