

また、hnRNP K 及び TCTP については、二次元ゲル上のスポットパターンからリン酸化等の翻訳後修飾の変化が想定された。

(3) 今年度はIRS高発現肝細胞、IRS高発現CHO細胞を用いて免疫沈降物、二次元電気泳動ゲルよりの蛋白スポットからLC-MS/MSにてペプチドの翻訳後修飾解析の予備的検討を行った。

II: インスリン抵抗性

INS-1 細胞のGSISは、0.35mM palmitate, 120h 処理にて有意に低下した。この際にわずかにアポトーシスが誘導されるものの dsDNA 含量に変動は確認されなかった。この条件下での INS-1 total cell lysate を用いた 2D-DIGE による解析の結果、有意に変動を認めるスポット (増加: 6, 減少: 5) を確認した。これらの蛋白スポットから LC-MS/MS 解析により、増加した 5 つの蛋白(very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2, translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog, glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1, Dienoyl-CoA Isomerase Chain C)と減少した 1 つの蛋白(3-oxoacid CoA transferase 1)を同定したが、同定された蛋白のほとんどがミトコンドリアで脂質代謝に関与していた。このため、さらに詳細に解析するために、同一条件下で INS-1 細胞から得られた細胞質及びミトコンドリア分画を 2D-DIGE にて解析した。その結果、有意に変動を認めるさらに多くのスポットを細胞質分画 (増加: 28, 減少: 9)、ミトコンドリア分画 (増加: 41, 減少: 25) にて確認した。

D. 考察

I: インスリン・シグナル伝達

今回我々は個々の IRS と相互作用する蛋白を検索するために IRS 高発現肝細胞株を用いて解析し、各 IRS 高発現によって異なる発現変動を示す蛋白を検出したが、その一つは糖新生に関与していた。また、各 IRS と相互作用する蛋白を検索するために、IRS 特異抗体による免疫沈降物を用いて解析した。今後、同定された蛋白がインスリン擬似薬の標的になるか培養細胞、モデル動物へのアデノウイルスによる高発現あるいは発現抑制にて検討することによって、内服可能なインスリンと同様の効果を持つ薬剤の分子標的となる蛋白が発見されることを期待する。

また、IRS 高発現細胞からの核抽出液の蛋白プロファイルを二次元電気泳動にてディファレンシャル解析し、同定された有意に変動する蛋白約150個から RNA 代謝、TCTP 等の蛋白合成に関与する多くの蛋白を同定した。これらの蛋白の IRS-3 を介した細胞増殖抑制経路への役割は不明であるが、IRS あるいは細胞周期を制御する protein kinase

との直接的な相互作用、インスリン依存性の翻訳後修飾の変化等についてさらに解析し、インスリンによる細胞増殖への意義を検証する。

II: インスリン抵抗性

長期の脂肪酸曝露によるGSIS障害については、Total cell lysateから有意に変動を認めるスポット (増加: 6, 減少: 5) を確認し、LC-MS/MS解析により、増加した5つのタンパク質と減少した1つのタンパク質を同定した。同定された蛋白の多くはミトコンドリアで脂肪酸代謝に関与する分子であったため、さらに細胞質分画及びミトコンドリア分画を用いてpalmitate処理により有意に変動を認める蛋白を検索し、長期の脂肪酸曝露により変動するさらに多くの蛋白スポットを認めた。

また、遊離脂肪酸の短時間処理によるインスリン分泌亢進については、前年度にpalmitate刺激により有意に変動を認める蛋白としてcofilinを同定したが、siRNAによる発現抑制の結果インスリン分泌促進には関与していないことが判明した。このため、今年度からpalmitoylationによるaffinityの増大によって膜にtranslocateする蛋白を検索するために、palmitoylationを受けた蛋白をビオチンラベル後に精製して網羅的に検索する系を確立して検索する。

E. 結論

ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を用いて治療に有用な新規の薬剤ターゲットをいかに探索するかが課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者: 740万人、潜在的には推計1620万人と患者数が多い上にさらに増加傾向にあること、患者の90%以上を占める2型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。このため、本プロジェクトにて、二次元電気泳動、pull-down法を用いたプロテオーム的手法による網羅的解析によって、インスリン作用に特異的なシグナル蛋白、膵β細胞での長鎖飽和脂肪酸応答性にインスリン分泌を制御する蛋白を検索することは、2型糖尿病の原因究明及び治療薬の分子標的探索への意義は大きいと考える。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

論文発表

Kaburagi Y, Okochi H, Satoh S, Yamashita R, Hamada K, Ikari K, Yamamoto-Honda R, Terauchi Y, Yasuda K, Noda M. Role of IRS and PHIP on insulin-induced

tyrosine phosphorylation and distribution of IRS proteins. Cell Structure and Function in press

学会発表

鏑木康志、山下亮、浜田圭子、安田和基、野田光彦：IRS高発現CHO細胞の核抽出液でのプロテオーム解析、第79回日本内分泌学会学術総会、2006年5月、神戸

山下亮、井狩高平、浜田圭子、安田和基、鏑木康志：IRS-1, IRS-2 高発現ヒト肝細胞のプロテオーム解析、第4回日本ヒトプロテオーム学会、2006年7月、東京

井狩高平、山下亮、浜田圭子、大友明日香、安田和基、鏑木康志：IRS-1, IRS-2 高発現ヒト肝細胞のプロテオーム解析、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006年12月、名古屋

浜田圭子、山下亮、井狩高平、大友明日香、安田和基、鏑木康志：インスリン/IGF 受容体による遺伝子発現制御の比較解析、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006年12月、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし

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

組織幹細胞の維持・分化増殖機構の解析および膵島細胞への分化誘導

分担研究者 大河内仁志 国立国際医療センター研究所
細胞組織再生医学研究部 部長

これまでにヒト脂肪組織由来の培養細胞に Pdx1 を一過性に導入したところ、Pax4 と Pax6 の遺伝子発現が見られたので、今年度はヒト脂肪組織由来の培養細胞に Pdx1 を恒常的に発現するように導入した。培養条件を工夫することにより、Pax4 と Pax6 はもとより、一部に Neurogenin3 や Insulin の遺伝子を発現する細胞が出現した。

A. 研究目的

皮膚の真皮と脂肪組織に多能性幹細胞の存在が示唆されているので、膵組織の細胞分化に重要な遺伝子とされる Pdx1 遺伝子を導入することにより膵島細胞への分化誘導を検討することを目的とする。

胞は浮遊するので、間葉系幹細胞が豊富に含まれる沈殿分画を回収した。これらの細胞を FBS 添加 DMEM 培地で T75 の培養皿に培養した。70-80%コンフルエントになったら継代し、3-5回継代後遺伝子導入実験に用いた。

B. 研究方法

脂肪組織から多能性幹細胞の分離・培養

術前に同意の得られた手術患者から皮下脂肪組織を採取し、ハサミで細かく裁断する。同量の PBS を加えて攪拌し、下層のみを吸引し、下層が透明になるまで繰り返す。次に脂肪層と同量の 0.075%コラゲナーゼ溶液を加え 37度で約 1 時間攪拌しながら処理を行う。同量の 10%FBS 添加 DMEM を加えてコラゲナーゼを不活化し、室温で 1500rpm 5 分間遠心すると脂肪を含んだ細

Pdx1 遺伝子プラスミドの調整

ヒト Pdx1 遺伝子の cDNA (850bp) が組み込まれた pcDNA3.1 ベクター（安田和基部長より提供）から制限酵素で cDNA を切り出し、 β -actin promoter に Pdx1 遺伝子と薬剤による選択をするために Puromycin 耐性遺伝子を連結させたコンストラクトを作成し、レトロウイルス発現ベクター (pMSCV) に組み込んだ。

さらに分化効率を上げるためには Pdx1 遺伝子の発現時期をコントロールすること

が重要と考えて、tetracyclin による発現制御機構を用いたベクターシステムを構築した。具体的にはまず tTA-Fx+IRES+Puro-pA+MAR+TetO+EGFP というカセットベクターの作成を行った。最適なトランスアクチベーターの検討をするために tTA-Fx の部分に tTA-F2, tTA-F3, tTA-F4, tTA-WT を用いて細胞毒性等を検討した。

脂肪組織由来の細胞への Pdx1 遺伝子導入

前述の方法で培養した脂肪組織由来の細胞 (P3-P5) を non-coating 培養皿に播種し、5%FBS 添加 DMEM で 60-80%コンフルエントになるまで培養する。

作成したレトロウイルス pMSCV-puro ベクターを脂肪組織由来の細胞に添加した。Puromycin 存在下でコロニーをピックアップした。ブドウ糖濃度、B27 や KSR (knockout serum replacement) の添加の有無による遺伝子発現の違いを検討した。遺伝子導入後 10 日目に細胞を回収し、全 RNA を抽出した。Nestin, 外因性 Pdx1, 内因性 Pdx1, Pax6, Pax4, Neurogenin3, Insulin, GAPDH に対するプライマーをそれぞれ作成して RT-PCR 法にて遺伝子発現の解析を行った。さらに短期間浮遊培養をした後、30 日間培養して、RNA を抽出し、RT-PCR を行った。

「倫理面への配慮」

研究に用いたヒト皮膚及び脂肪組織は術前に同意を得た手術標本の一部を使用した。

C. 研究結果

脂肪組織由来の細胞はコラゲナーゼ処理により成熟脂肪細胞と間葉系幹細胞の分離は容易にできるが、初代培養においては紡錘形の細胞に混じって敷石状の細胞増殖もみられ、内皮細胞の可能性が示唆された。実験には内皮細胞の影響が少ないと考えられる 3-5 代の細胞を用いた。培養した脂肪組織由来の細胞に Pdx1 遺伝子を恒常的に導入したところ、導入 2 と 3 日目に確かに外因性の Pdx1 の発現が確認された。5%FBS 添加 Low glucose DMEM にても Pax6 と Pax4 の遺伝子発現がみられたが、DMEM/F-12+EGF+bFGF+B27 により Pax6 の発現がより強くみられた。高濃度ブドウ糖や KSR の検討もおこなったが、ほとんど影響を与えなかった。Neurogenin3 や Insulin 遺伝子の発現は認められなかった。そこで 3 日間浮遊培養した後、接着培養すると Pax4 と Pax6 の遺伝子発現に加えて Neurogenin3 や Insulin の遺伝子発現が見られた。

テトラサイクリンによる遺伝子発現調節機構のために tTA-F2, tTA-F3, tTA-F4, tTA-WT を用いて蛍光強度をもとに細胞毒性等を検討したところ、いずれの場合においても細胞毒性はほとんど見られなかった。

D. 考察

膵組織の細胞分化に重要な遺伝子とされる Pdx1 遺伝子を脂肪由来の細胞にアデノウイルスを用いて一過性に導入したところ、Pax6 と Pax4 の遺伝子発現がみられたが、

Neurogenin3 や Insulin 遺伝子の発現は認められなかった。膵島細胞への分化誘導には不十分である可能性が示唆されたので、培養期間を長くし、また stable transfectant を樹立する必要があると考えられた。そこでレトロウイルス pMSCV-puro ベクターを用いたコンストラクトを作成し、ヒト脂肪組織由来の細胞に Pdx1 を恒常的に発現させた培養細胞を得ることができた。Pdx1 を恒常的に発現させた場合に Pax4 と Pax6 の遺伝子発現に加えて、一部の細胞に Neurogenin3 や Insulin の遺伝子発現が見られたことは特筆すべきことと思われる。今回は遺伝子導入された細胞の中で比較的増殖のよい細胞を選択したが、増殖の遅い細胞の中に分化しやすい細胞が存在する可能性も否定できないので、次年度はこの点についてもさらに検討したいと考えている。

膵臓の正常発生過程を考慮すると Pdx1 遺伝子は2峰性の発現をすることが知られているので、Pdx1 を恒常的に発現させるだけで、すべて分化転換がうまく進むとは考えにくい。さらに neurogenin3 などの追加的な遺伝子導入が必要になるであろうと予想していたが、Pdx1 遺伝子の恒常的発現と浮遊培養法の組み合わせで Neurogenin3 や Insulin の遺伝子発現が見られた。浮遊培養することによって3次元の構造をとり、平面培養とは違ったシグナルが入る可能性が示唆された。一方 Pdx1 遺伝子のより in vivo の発生に近い発現パ

ターンを再現できれば、分化効率はさらに高まるのではないかと考えられる。そこでテトラサイクリンによる遺伝子発現調節機構を付加することで Pdx1 の発現をコントロールできるシステムの構築が必要と判断し、ベクターの作成を試みた。トランスアクチベーターの検討を行ったが、いずれも使用できそうな結果が得られたので、19年度は実際に脂肪細胞由来の細胞にて検討する予定である。

我々は脂肪細胞由来の細胞から種々の因子を加えることで、肝細胞に分化させる系の検討も行っており、少なくとも蛋白レベルでアルブミンと薬剤を分解する酵素を発現する細胞を確認している (Hepatology in press)。このことは間葉系幹細胞を内胚葉系の細胞に分化転換できる可能性を示唆している。骨髄の間葉系幹細胞から2種類の因子を培養液に添加して膵臓β細胞を誘導する研究も行われているので、脂肪由来の幹細胞からも同様なことが可能になるのではないと思われる。

また皮膚の幹細胞研究を推進した結果、毛乳頭細胞も多能性幹細胞としての性質を持つことが示唆され、マウスにおいて新しい毛乳頭細胞の表面マーカーを見いだした。今後脂肪組織由来幹細胞だけでなく、毛乳頭細胞の多能性にも注目して研究を進めていきたい。

E. 結論

ヒト脂肪組織由来の細胞に Pdx1 を遺伝

子導入して持続的な発現をさせると Pax6 と Pax4 の遺伝子発現がみられ、培養方法を工夫して途中で浮遊培養法を取り入れるとわずかながらインスリン産生細胞を誘導できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Banas A, Tokuhara M, Okochi H, Ochiya T Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes **Hepatology** in press
- 2) Ito Y, Hamazaki TS, Ohnuma K, Tamaki K, Asashima M, Okochi H. Isolation of Murine Hair-Inducing Cells Using the Cell Surface Marker Prominin-1/CD133. **J Invest Dermatol.** In press
- 3) Nakanishi, M., Hamazaki, T.S., Komazaki, S., Okochi, H., and Asashima, M. Pancreatic Tissue Formation from Murine Embryonic Stem Cells in vitro. **Differentiation** 75:1-11, 2007.
- 4) Nishimura Y, Hamazaki TS, Komazaki S, Kaminura S, Okochi H, and Asashima M Ciliated Cells Differentiated from Mouse Embryonic Stem Cells. **Stem Cells** 24:1381-8, 2006
- 5) Honda M, Kurisaki A, Ohnuma K, Okochi H, Hamazaki TS, Asashima M. N-cadherin is a useful marker for the progenitor of cardiomyocytes differentiated from mouse ES cells in serum-free condition. **Biochem Biophys Res Commun.** 351:877-882. 2006
- 6) 大河内仁志 皮膚 stem cell による再生医療 臨床皮膚科 60:163-165, 2006
- 7) 大河内仁志 皮膚の幹細胞—最新の知見と再生医療への応用 日皮会誌 116:1739-1744, 2006

学会発表

(国外)

- 1) Ito Y, Hamazaki TS, Tamaki K, Asashima M, Okochi H A new surface marker for dermal papilla cells 67th Annual meeting of the Society of Investigative Dermatology, Philadelphia, Pennsylvania, USA, May, 2006
- 2) Osada A, Iwabuchi T, Kishimoto J, Hamazaki TS, Okochi H: Long term culture of mouse vibrissal dermal papilla cells and de novo hair follicle induction European Hair research Society Annual Meeting 2006, London, United Kingdom, June, 2006

(国内)

- 1) Agnes Banas、徳原真、寺谷工、Gary Quinn、山本雄介、大河内仁志、落谷孝広 Human adipose stem cells as a source of functional hepatocytes 第5回日本再生医療学会、岡山、3月、2006
- 2) 伊藤ゆり子、浜崎辰夫、玉置邦彦、浅島誠、大河内仁志 新規毛乳頭細胞表面マーカーの同定と発毛誘導能の検討 日本研究皮膚科学会 第31回年次学術大会、京都、5月、2006
- 3) マウス毛包内 CD133 陽性細胞の分化多能性の検討 伊藤ゆり子 浜崎辰夫、玉置邦

彦、浅島誠、大河内仁志 第19回内藤カ
ンファレンス、平成18年11月14日-
17日、神奈川

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を
含む

なし

マウス ES 細胞からの膵臓組織分化系の確立と機能解析に関する研究

分担研究者： 浜崎辰夫 国立国際医療センター・研究所 細胞組織再生医学研究部 室長

研究要旨:マウスES細胞を用い内胚葉系の器官や組織を誘導する試みは多く行われてきているが、これまでにそれを確立した系は、ほとんど報告されていない。膵臓は内胚葉から発生する器官であり、しかも内分泌系の細胞(主にインスリン産生細胞)を含む非常に複雑な臓器である。この病態を解析・治療することを目的として、我々はES細胞からの膵臓組織の分化誘導を試みた。生体の胎児期における形態形成因子のうち、膵臓原基に発現が認められるアクチビンとレチノイン酸に着目し、ES細胞の細胞塊を浮遊条件で共処理すると、膵臓導管を含む内分泌系・外分泌系の膵臓組織が培養系で形成されること、さらに、アクチビン処理濃度を高めると外分泌系細胞の割合が減少し、内分泌系細胞が大きく増加することも分かった。本年は、ES細胞から分化誘導した膵臓組織および組織幹細胞の1つであると考えられている脂肪前駆細胞を用いて分化誘導した細胞の移植による評価系の開発を目指して、病態モデルマウスの作成と予備的な移植実験を行った。

A. 研究目的

これまでにマウス胚性幹(embryonic stem, ES)細胞から様々な細胞種や一部の組織が誘導されることが報告されている。その中でも膵臓のβ細胞を誘導する研究は、糖尿病治療を目的として移植されるインシュリン産生細胞の供給源としてES細胞を用いることに道を開くだけでなく、膵細胞の分化・発生機構の解析および機能維持・疾患病因の解明などに有用であると考えられている。

近年、マウスES細胞からインシュリンを発現・分泌する細胞へと誘導しうることを示すいくつかの報告がなされている。しかしながら、

これまでの研究は、膵臓のβ細胞の誘導に焦点を合わせたものであり、膵臓を器官や組織として誘導した報告はない。また内分泌細胞と共に外分泌細胞と導管の分化についての報告は、アミラーゼやカルボキシペプチダーゼなどの外分泌細胞マーカーが転写レベルで発現しているという報告があるのみである。膵臓は内分泌細胞、外分泌細胞、および導管から構成されており、いずれも共通の前駆細胞から分化すると考えられているが、まだ不明な点が多い。

また、成体組織幹細胞の1つであると考えられている脂肪組織由来前駆細胞は、培養系で可塑性・分化多能性を示し、骨細胞や

神経細胞また、肝細胞へと分化する可能性が示されている。

我々はこれまで、マウス ES 細胞の細胞塊をアクチビンとレチノイン酸で同時に処理することによって、sonic hedgehog (shh)の発現を抑制し、かつ膵臓のマーカー遺伝子の転写を誘導し培養系で腸管様構造と共にそれに隣接して膵臓組織を分化誘導することができた。さらにアクチビンの処理濃度を変えることにより外分泌細胞(アミラーゼ産生細胞)が主に分化する系と内分泌細胞(主にインスリン産生細胞)が多く分化してくる誘導系を見出した。本年度は、この誘導系においてどの程度効率よくβ細胞が分化誘導可能かを調べた。更に、分化誘導した膵臓組織および組織幹細胞の1つであると考えられている脂肪前駆細胞(分担研究者:大河内により、脂肪前駆細胞は、可塑性を持ちβ細胞への分化誘導可能性が報告されている)を用いて分化誘導した細胞の移植による評価系の開発を目指して、病態モデルマウスの作成と予備的な移植実験を行った

B. 方法

ES 細胞の培養

マウス由来の ES 細胞 (E14)をマイトマイシン C (Sigma)で処理(10 ng/ml, 2.5 時間)したマウス胚性線維芽細胞上に播種し、15% ES cell qualified FBS、MEM 非必須アミノ酸溶

液(GIBCO)、0.001% β-メルカプトエタノール (Sigma)、1500 U/ml LIF ESGRO(Chemicon)を添加した DMEM (high glucose, with L-glutamine, with pyruvate, GIBCO 11995-065)中で培養した。3 日目の ES 細胞のコロニーを 15 % KnockOut Serum Replacement (KSR, GIBCO)を添加した DMEM 中で培養し 15 % KSR およびアクチビン A (10 または 25 ng/ml と all-trans レチノイン酸 (RA) (0.1 μM) (Sigma)を添加した DMEM 中でさらに 2 日間培養した。誘導処理後、EBSs を 0.1 % ゼラチン (Sigma)で一晩コートしたマルチプレート または培養ディッシュ(TPP) に接着させ、10 % KSR を添加した DMEM 中で培養を続けた。培養液は 3 日に一度交換した。また、移植実験の評価には 1 個体あたり 10-20 個のコロニーが必要なため、コラゲナーゼ処理を省略し、直接培養中の ES 細胞にアクチビン+RA 処理したものも用いた。

免疫染色

誘導処理終了後 13 日後、EBSs を 4 % パラホルムアルデヒド 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.4)溶液中で常温で 40 分間固定した。固定された EBSs をディッシュから剥がし、アクリル系の樹脂である LR Gold Resin System (Structure probe)を用いて包埋し、600 nm の準薄切切片を作製した。切片を 3 % ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin; BSA)リ

ン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline; PBS)でマスキング(常温、40 分間)した後、膵臓特異的 1 次抗体(後述)と反応させた (4°C、12 時間し、PBS で洗浄後、標識 2 次抗体(後述)と4°Cで8時間反応させた。1 次抗体はウサギ抗 α -アミラーゼ (1:1000 希釈、Sigma)、モノクローナル抗インシュリン(1:400 希釈、Sigma)、ヤギ抗 C-ペプチド (1:800 希釈、Linco Research)抗体をもちいた。2 次抗体として Alexa Flour 488、および Alexa Flour 594 コンジュゲート 2 次抗体(Molecular Probes)を使用した。切片を蛍光顕微鏡を用いて観察し、ORCA-3CCD カメラを用いて AquaCosmos(浜松ホトニクス)により画像を撮影した。画像解析はメタモルフを用いた。

移植実験

I 型糖尿病病態モデルマウスを作成するため streptozotocin (STZ)をヌードマウスに 100, 150 および 200 mg/kg body weight を腹腔内に注射した。血糖値の上昇が認められなかった場合は 2 度目の処理を行い、効率よく病態モデルマウスを作成できる条件の検討を行った。また、I 型糖尿病を自然発症する AKITA マウス(8 週齢、オス)を用いて、ES 細胞から誘導組織を 10 コロニー/個体で腹腔内に移植して、血糖値の変化を観察した。

C. 研究結果

アクチビン濃度依存的に変化する内分泌細

胞と外分泌細胞の比

前年度の報告書に記述したようにレチノイン酸およびアクチビンの処理濃度が ES 細胞のコロニーに対する膵臓組織の誘導に与える影響を確認するため、レチノイン酸(0.1 μ M)およびアクチビン(10, 25 ng/ml)で共処理した EBSs から処理後 13 日にサンプルを固定し、連続切片作成した。これらをすべて抗アミラーゼ抗体および抗 C-ペプチド抗体で染色して、インスリン産生細胞の分化効率を確認した(図1、表1)。レチノイン酸の処理濃度を一定(0.1 μ M)としてアクチビンの処理濃度を変えた場合、低濃度(10 ng/ml)のアクチビンと共処理した EBSs では無処理の EBSs と比較して外分泌細胞のマーカであるアミラーゼおよび ptf1a/p48 の発現量が著しく増加する一方、インシュリンの発現量は変化がなかったのに対し、より高い濃度(25 ng/ml)のアクチビンと共処理した EBSs ではインシュリンの発現量が著しく増加する一方、アミラーゼの発現量は低下した。分化誘導に用いた ES 細胞のコロニーの状態を反映している可能性は否定できないが、レチノイン酸+アクチビン処理して β 細胞へと誘導できたコロニーでは、全細胞数の内 5%以上の細胞が、インスリン(C-ペプチド)陽性細胞であった。これらの結果は EBSs において誘導される内分泌細胞と外分泌細胞の比はアクチビン濃度依存的に変化することを示唆している。

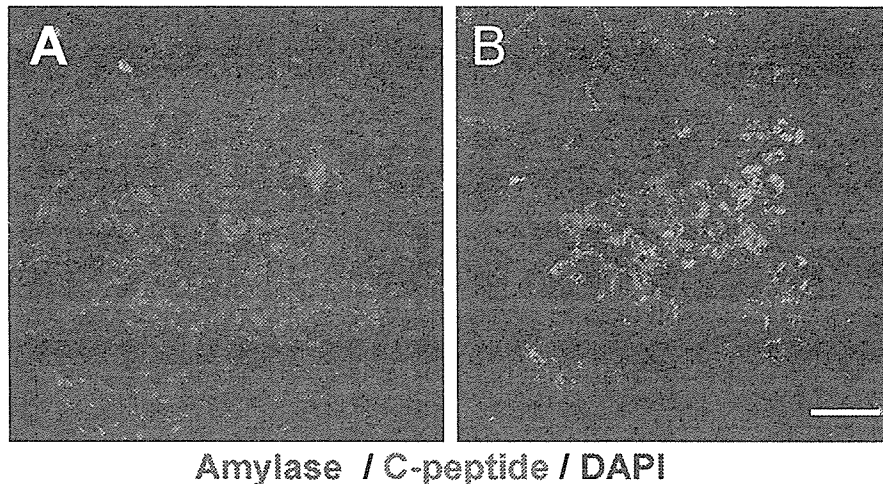


図 1. 抗 C-ペプチド抗体および抗アミラーゼ抗体による重染色
 0.1 μM レチノイン酸と 10 ng/ml アクチビンで共処理した ES 細胞 (A), および 0.1 μM レチノイン酸と 25 ng/ml アクチビンで共処理した ES 細胞 (B). 0.1 μM レチノイン酸と 25 ng/ml アクチビンで共処理した ES 細胞においてはインシュリン陽性細胞の割合が著しく増加した(B). [Bar = 50 μm]

	C-peptide-positive area in each EBS (average of positive EBSs, %)	C-peptide-positive area in each EBS (average of total EBSs, %)	Number of EBSs (containing positive signal/total tested)
RA+activin treated	4.99 ± 0.59	1.50 ± 0.78	3/10
Control	0	0	0/3

表 1. 0.1 μM レチノイン酸と 25 ng/ml アクチビンで共処理した ES 細胞のインシュリン(C-ペプチド)含有量の比較. インシュリンを産生しているコロニーは約 30 パーセントであり、その総細胞数のうち、約 5%が β 細胞であった。一方、残り 70%のコロニーでは誘導が認められなかった。一方、対照群では、 β 細胞はまったく認められなかった。膵臓への分化誘導処理を行った、すべての細胞あたりの β 細胞の誘導効率率は約 1.5%であった。

移植のための病体モデルマウスの作成

I型糖尿病も出るマウスの作成を目指し、ヌードマウスに 100-200 mg/kg の STZ 腹腔内注射をおこなったところ、100 mg/kg では、血糖値の上昇が処理後 10 日経過しても認められなかった。そのため追加注射処理 (100 - 200 mg/kg) を行ったところ、100+150 mg/kg の処理で最初の処理から 10 日前後で血糖値が上昇することがわかった (図 2)。その結

果、1 回処理の目安は 200-250 mg/kg で行うか、または最初 100 mg/kg で処理し、追加処理として 150 mg/kg を注射することが効率よくモデルマウスを作成する条件であるが、この場合、成功率は約 50-60%であった。

移植実験

これらのマウスおよび AKITA マウスを用いて、予備的な移植実験を行った。

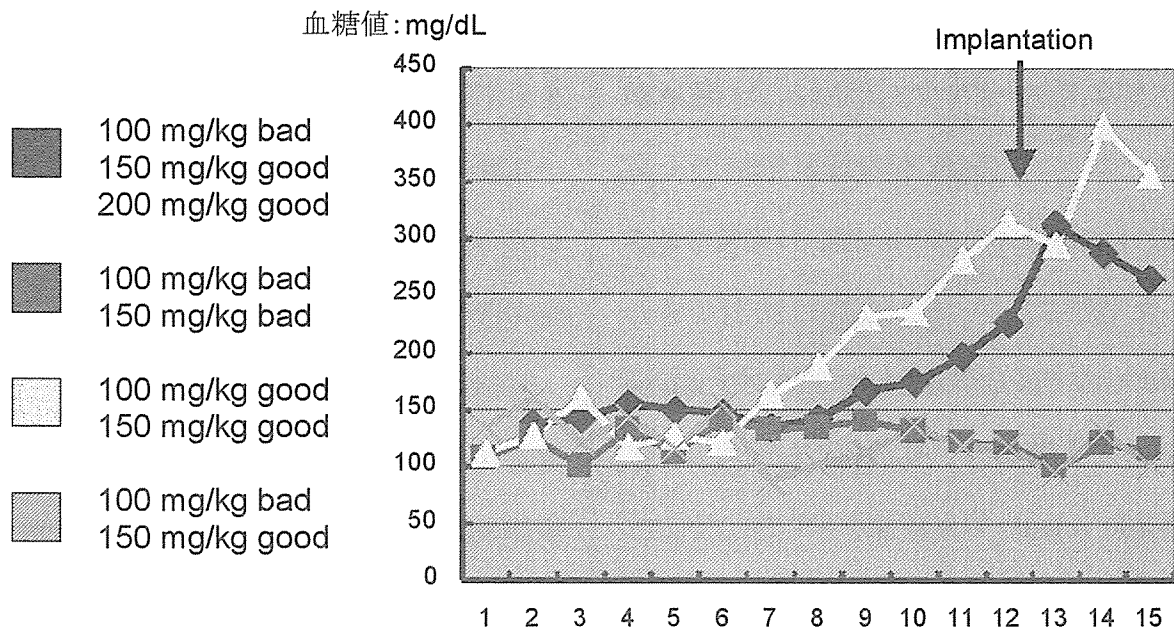


図2. 病態モデルマウスを作成するため、示してある量のSTZをヌードマウスに注射した。注射が的確でなかった(bad)ものは血糖値の上昇は認められず、100-150 mg/dLの正常な値を示している。一方、的確に注射できた(good)ものでは全体量として250-350 mg/kgのSTZで血糖値の上昇が認められ、12日後には300 mg/dLの血糖値を示した。これに、脂肪前駆細胞を移植して、予備実験を行ったところ、わずかに血糖値の低下傾向が認められた。

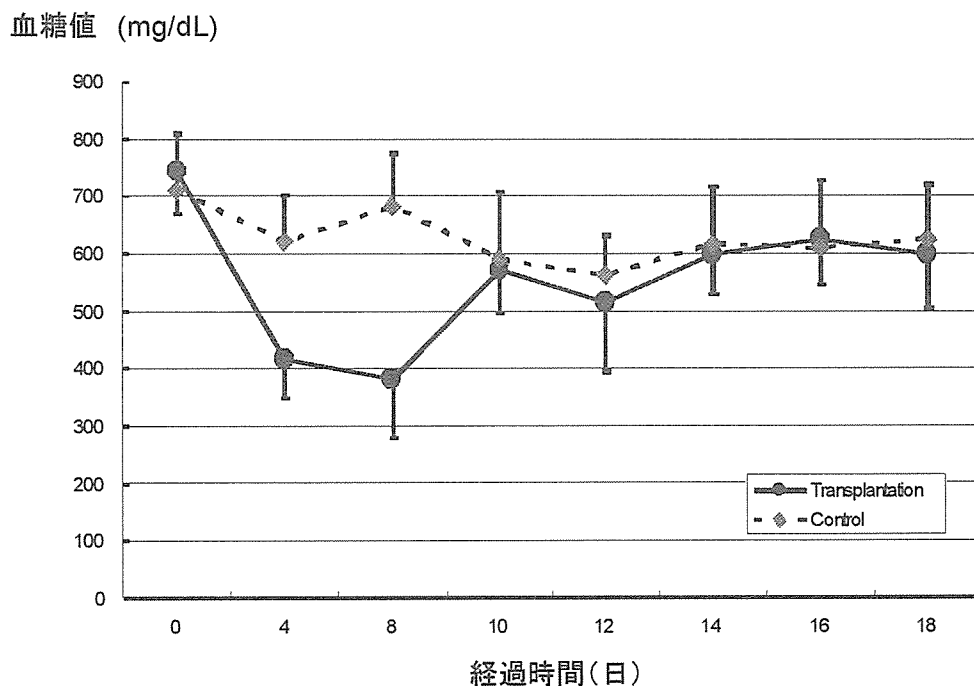


図3. 分化誘導したES細胞からの膵臓組織を10コロニーAKITAマウスに移植した結果、対照群と比較して、4日から8日の間、血糖値が下がっているのがわかる。しかし、その後上昇し、対象群と変わらなくなっていた。(n=3)

病態モデルマウスを作成するため、様々な濃度の STZ をヌードマウスに注射した。注射が的確でなかった(bad)ものは血糖値の上昇は認められず、100-150 mg/dL の正常な値を示した(図 2)。一方、的確に注射できた(good)ものでは全体量として 250-350 mg/kg の STZ で血糖値の上昇が認められ、12 日後には 300 mg/dL の血糖値を示した。これに、培養系で増殖させた脂肪前駆細胞を移植する予備実験を行ったところ、わずかに血糖値の低下傾向が認められた。しかし、これは一過的に低下したのみであった。

また、AKITA マウスに ES 細胞から分化誘導した膵臓組織をそれぞれ 10 コロニーづつ腹腔内に移植した群では、移植後 4-8 日間の間、短期的に血糖値の低下が認められた(図 3)。しかし、この場合も 10 日目には対象群と変わらない血糖値を示した。

D. 考察

マウス ES 細胞が *in vitro* において一部の細胞をインシュリン産生細胞へと分化しうることとはすでにいくつかの報告がなされている。しかし、マウス ES 細胞を *in vitro* において分化誘導因子の非存在下で自発的に分化させた場合、mRNA レベルでの膵臓マーカーの

発現や DTZ による染色などのβ細胞の性質を示す画分はごくわずかであり、さらにグルコース濃度依存的なインシュリン放出やインシュリン陽性の分泌顆粒の存在など、膵臓β細胞の機能的な特徴を持っていなかった。

膵臓は内分泌細胞、外分泌細胞、および導管から構成されており、いずれも共通の前駆細胞から分化する可能性が高いと考えられている。これまでに成されてきた研究は、膵臓のβ細胞の誘導に焦点を合わせたものでありマウス ES 細胞から *in vitro* においてインシュリン産生細胞へと分化させる研究を、個体内における膵臓の発生機構を解析する手段として利用するには困難であった。

本研究では ES 細胞から培養系で外分泌細胞、内分泌細胞および導管構造を含む膵臓組織を誘導できた。この膵臓は内分泌細胞のマーカーであるインシュリンやグルカゴン、Pdx-1 と外分泌細胞のマーカーであるアミラーゼはレチノイン酸とアクチビンで共処理した ES 細胞において発現量が著しく増加していた。

レチノイン酸の処理濃度を一定(0.1 μM)としてアクチビンの処理濃度を変えた場合、低濃度(10 ng/ml)のアクチビンと共処理した群では無処理群と比較してアミラーゼの発現量

が増加したのに対し、より高い濃度(25 ng/ml)のアクチビンと共処理したES細胞ではインシュリンの発現量が著しく上昇し、しかもアミラーゼの発現量は減少した。これらの結果はアクチビンが本研究で報告した系において内分泌細胞対外分泌細胞の分化の調節に関与している可能性を示唆する。

一方、予備的な移植実験においてI型糖尿病のモデルマウスであるAKITAマウスに、このES細胞から誘導された膵臓組織を移植した結果、一過的ではあるが血糖値の減少が認められたことは、この膵臓組織が血糖値の上昇に対してインスリンを放出している可能性があるが、十分な効果が得られたとは思われないため今後さらに詳細に検討していくべき課題である。また、移植実験による評価系の確立のため、ヌードマウスを用いたSTZ投与によるモデルマウスの作成では、まだ安定した結果は得られておらず、一回の投与では、その発症率は50-60%程度であり、これも更なる検討が必要である。安定して糖尿病モデルマウスの作成が可能となれば、ES細胞のみからではなく組織幹細胞からのβ細胞の誘導効率をより正確に評価するための系が確立できると考えられる。今後は、ES細胞および組織幹細胞から機能を持ったβ細胞の分

化誘導系を発展させて、より効率よく生体内のβ細胞と同等な機能を持つ細胞を分化誘導できる系の確立を目指す。

D. 結論

膵臓発生において重要な役割を果たしていると考えられている調節因子であるアクチビンとレチノイン酸を用いて、ES細胞から外分泌細胞、内分泌細胞、および導管構造を含む膵臓組織を誘導することができたことにより、本研究での誘導系は個体内における膵臓の発生機構および機能維持・代償機序と破綻などを解析する有用な手段となり得ると考えられる。

今後は、さらに生体に近い膵臓組織の培養系における形成をめざすと共に、臨床的な見地からES細胞や組織幹細胞から誘導されたβ細胞を、糖尿病モデルマウスへ移植する実験系の確立が必須であると考えている。本研究は、I型糖尿病治療のための基礎的な知見を得ることが可能な実験系となり得るとともに、個体内における膵臓の発生機構を解析する手段としても有効な系であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakanishi, M., Hamazaki, T. S., Komazaki, S., Okochi, H., and Asashima, M. (2007)
Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells in vitro.
Differentiation 75: 1-11.

Ito, Y., Hamazaki, T. S., Ohnuma, K., Tamaki, K., Asashima, M., and Okochi, H. (2007)
Isolation of Murine Hair-Inducing Cells Using the Cell Surface Marker Prominin-1/CD133.
J. Invest. Dermatol. (In Press)

Nishimura, Y., Hamazaki, T.S., Komazaki, S., Kaminura, S., Okochi, H., and Asashima, M. (2006)

Ciliated Cells Differentiated from Mouse Embryonic Stem Cells. Stem Cells 24: 1381-1388.

Satow, R., Kurisaki, A., Chan, T. C., Hamazaki, T. S., and Asashima, M. (2006)

Dullard promotes degradation and dephosphorylation of BMP receptors and is required for neural induction.
Dev. Cell 11: 763-774.

Honda, M., Kurisaki, A., Ohnuma, K., Okochi, H., Hamazaki, T. S., and Asashima, M. (2006)

N-cadherin is a useful marker for the progenitor of cardiomyocytes differentiated from mouse ES cells in serum-free condition.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 351: 877-882.

ヒト血管内皮細胞を用いた糖尿病性微小血管症の発症機構解明と治療法開発 分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨

糖尿病の予後を決定するもっとも重要な要素は合併症であり、網膜症、腎症、神経症等の合併症は患者の QOL に深刻な影響を及ぼす。本研究においては、合併症の発生と進展の分子機序を解明して、合併症発生の初期の変化をとらえるマーカーやパラメーターを探索すると共に、特異性の高い分子標的療法の開発を目指す。具体的には、糖尿病の合併症の病態を「細小血管症」としてとらえ、高血糖による血管内皮細胞などの傷害（「糖毒性」）の研究を進める。血管内皮細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞を用いた。測定する細胞内パラメーターは、細胞内 reactive oxygen species (ROS) (FACS を用いた測定法)、GSH (グルタチオン)、AGE (advanced glycation end-product)、血管内皮細胞機能としては索状構造形成能を用いた。さらに、網羅的な解析として、各種血管内皮細胞のブドウ糖濃度変化による遺伝子発現変化をマイクロアレーによって検討した。細胞内 reactive oxygen species (ROS) は、ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞を用いて測定したところ、何れの内皮細胞においても high glucose (30 mM) で高い値を得ることができた。このような high glucose による ROS は活性酸素消去剤である NAC (N-acetyl-Cysteine) によって阻害された。また、このような ROS の上昇（酸化ストレス）に関連して細胞内酸化還元状態の指標である GSH の減少がいずれの血管内皮細胞においても認められた。また、ヒト臍帯血静脈内皮細胞とヒト微小血管内皮細胞において、high glucose による AGE (advanced glycation end-product) の上昇が観察された。さらに、いずれの血管内皮細胞においても high glucose による索状構造形成能の低下が観察された。以上より、ヒト血管内皮細胞を用いて、ブドウ糖濃度の上昇に伴う細胞障害につながる細胞内機構が再現され、糖毒性の *in vitro* 解析系が確立された。このような系を用いて網羅的な解析を行ったところ、high glucose による Thioredoxin-interacting protein を初めとする遺伝子の高発現が認められた。一方、以上のような初代培養ヒト血管内皮細胞の限界を補うために、霊長類（サルおよびヒト）胚性幹細胞からの無フィーダー培養による血管内皮細胞の分化誘導を試みて、サル、ヒトいずれの系においても従来よりも極めて効率の高い（従来は 1% 以下、今回は 10-60%）継代可能な血管内皮細胞を得た。

A. 研究目的

糖尿病の予後を決定するもっとも重要な要素は合併症であると言っても過言ではない。合併症としては網膜症、腎症、神経症が知られており、いずれも進行すると患者の QOL に深刻な影響を及ぼすこととなる。例えば、網膜症による失明は 1 年間に 4000 人に上ることが知られている。腎症による透析に至っては、1 年間に 1.4 万人と報告されている。このような合併症による深刻な状態が無いとすると、糖尿病は恐れるに足る疾患ではなくなる。従って、合併症の発生と進展の分子機序を解明して、その分子を標的とした特異性の高い「分子標的療法」が開発されれば、糖尿病を発症したとしても、その予後は格段に改

善する。また、合併症発生の初期の変化をとらえるマーカーやパラメーターが明らかになれば、診断的ならびに患者状態のモニターという面での利点も大きい。この様に重要な研究課題であるにもかかわらず、合併症の研究は必ずしも進んでいない。

以上のような状況の中で、近年、糖尿病の合併症の病態を「細小血管症」としてとらえることができるという考え方が広まっている。すなわち、高血糖による血管内皮細胞などの傷害（「糖毒性」）が中心的な現象であるという可能性も含めた展開である。

本研究においてはこのような観点から、ヒトの血管内皮細胞を用いて糖毒性解析のための *in vitro* の解析システムを構築して高血糖による血管内皮細胞傷害の機序を解明して、

治療法開発や診断マーカー開発につなげたい。

B. 研究方法

血管内皮細胞は、これまでの研究において最も幅広く用いられてきたヒト臍帯静脈内皮細胞の他に、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞も用いて、できるだけ普遍的な結果を出すように試みた。

細胞内 reactive oxygen species (ROS)の測定に関しては、以下の如くである。5.5 mMあるいは30 mMのグルコース含有 EBM-2 培地 (10% FBS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml VEGF) で培養した内皮細胞を Trypsin/EDTA で剥離し (ヒト臍帯静脈内皮細胞は day 6、ヒト微小血管内皮細胞は day 11、ヒト大動脈内皮細胞は day 6 で細胞を回収)、細胞内の活性酸素種、ROS は蛍光プローブ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA (Molecular Probes)を用いて FACS Calibur (日本ベクトン・ディッキンソン)により測定した。FACS buffer (5% FBS, 0.05% NaN₃, PBS)に懸濁した細胞 5 x 10⁵ 個に終濃度 200 μM の DCFH-DA を添加、蛍光 FL-1 (励起波長 480 nm / 蛍光波長 530 nm)を測定し、mean の値を算出した。ROS 阻害剤として用いた 5 mM N-acetyl-Cysteine; NAC (Sigma)は DCFH-DA を添加する 30 分および 1 時間前より添加した。

細胞内 GSH の測定は以下の如くである。5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EBM-2 (Cambrex)培地 (10% FBS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml VEGF) で培養した内皮細胞を Trypsin/EDTA で剥離し (ヒト臍帯静脈内皮細胞は day 6、ヒト微小血管内皮細胞は day 11、ヒト大動脈内皮細胞は day 6 で細胞を回収)、BIOXYTECH GSH/GSSG-412 assay Kit (OXIS International, Inc.)を用いて GSH の測定を行った。412 nm の吸光度を DU 530 Life Science UV / Vis Spectrophotometer (Beckman) により測定し、細胞 1 x 10⁶ 個に含まれる GSH の量を算出した。

細胞内 AGE の測定は以下の如くである。5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EBM-2 培地 (10% FBS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml VEGF) で培養した内皮細胞を Trypsin/EDTA で剥離し (ヒト臍帯静脈内皮細胞は day 6、ヒト微小血管内皮細胞は day 11、ヒト大動脈内皮細胞は day 6 で細胞を回収)、

SDS-PAGE を行い、AGE 抗体 (トランスジェニック) を用いたウエスタンブロットにより検出を行った。化学発光試薬には SuperSignal (PIERCE)を用いた。検出された AGE のバンドは Image J (National Institutes of Health)によるデンシトメトリーで定量解析を行った。

索状構造形成能は以下の方法にて行った。5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EBM-2 培地 (10% FBS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml VEGF) で培養した内皮細胞を Trypsin/EDTA で剥離し (ヒト臍帯静脈内皮細胞は day 5、ヒト微小血管内皮細胞は day 11、ヒト大動脈内皮細胞は day 7 で細胞を回収)、Cord formation assay を行った。24 穴プレートに 100 μl の Matrigel (BD Biosciences)を 30 分コートし、内皮細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞は 5 x 10⁴ 個、ヒト微小血管内皮細胞は 6 x 10⁴ 個、ヒト大動脈内皮細胞は 2.5 x 10⁴ 個) をまき、5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EGM-2 (Cambrex)培地(2%FBS)で培養 24 時間後に倒立顕微鏡 IX-70 (オリンパス)により観察を行った。

従来の初代培養ヒト血管内皮細胞の限界を打破するために、カニクイザル胚性幹細胞ならびにヒト胚性幹細胞から血管内皮細胞を分化誘導することを試みた。サル ES 細胞は、京都大学再生医科学研究所と田辺製薬で樹立された CMK6 株を用いた。ヒト ES 細胞は、京都大学再生医科学研究所で樹立された KhES-1、KhES-2、KhES-3 の 3 株を用いたが、血液細胞、血管内皮細胞の分化誘導は主に KhES-3 を用いた。未分化維持における無血清培養は 20%KSR (knockout serum replacement) を用いて行った。培養開始当初はマウス胎児線維芽細胞と共培養し、その後にマトリゲルコート培養皿において noggin、FGF2 を添加して無フィーダー培養を行った。最終的には noggin、FGF2 を添加せずに培養した。未分化状態の評価は、細胞形態、SSEA4、Oct4、Nanog により行った。血管内細胞の分化誘導を行う場合は、サル ES 細胞、ヒト ES 細胞いずれにおいても、当研究室において無血清で未分化維持継代した物を用いた。細胞凝集塊形成は、hanging drop 法で行った。すなわち、30 μl の水滴中に 3000 の ES 細胞を封じ込めて胚様体を形成させた。サイトカインは VEGF、BMP-4、SCF、Flt-3 リガンド、IL-3、IL-6 を用いて 3 日間培養した。その後、形成された胚様体をほぐさずにゼラチンコート培養皿にて平面培養を行った。血液細胞の形態

や同定は、ライトギムザ染色やその他の特殊染色により行い、造血コロニーアッセイは、市販のキットを用いた。VE-cadherin、PECAM-1等の血管内皮細胞特異的表面抗原はBD社のFACSCaliburにより解析した。これらの蛋白およびeNOS、von Willbrand factor (vWF)の免疫染色も行った。血管内皮細胞の機能測定は、索状構造形成能とAc-LDL取り込み能を検討した。

C. 研究結果

①初代培養ヒト血管内皮細胞も用いた糖毒性の系の開発

糖毒性の検定のために、血管内皮細胞をnormal glucose (NG : 5.5 mM)とhigh glucose (HG : 30 mM)の条件で培養して、細胞内reactive oxygen species (ROS)を測定した(図1)。本年度はヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞を用いて測定し、培養期間はそれぞれ6日間、11日間、6日間である。その結果、何れの内皮細胞においてもhigh glucoseで高い値を得ることができた。このようなhigh glucoseによる細胞内のROSの蓄積は活性酸素消去剤のNAC (N-acetyl-Cysteine)によって抑制された(図2)。このような高ブドウ糖濃度による細胞内ROSの増加に関しては、その由来に関してミトコンドリアであるという説と細胞膜のNADPH オキシダーゼであるという2種類の学説が存在する。そこで、我々の観察した細胞内ROSがこれらのいずれであるかを明らかにするために、それぞれの阻害剤での検討を行った。しかしながら、ミトコンドリアの阻害剤(CCCP、TTFA)、NADPH阻害剤(Apocynin)のいずれによってもROS産生は阻害されなかった。また、アルドース還元酵素阻害剤もROS産生は阻害されなかった。

次に、ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞を用いてGSHの測定を行い、細胞内酸化還元状況を検討した。その結果、ROSの上昇に呼応して、いずれの種類の血管内皮細胞においてもGSHの有意な低下が認められ(図3)、細胞内ROS発生による酸化ストレスによって細胞内が酸化方向へシフトしていることが確認できた。

次に、ヒト臍帯血静脈内皮細胞とト微小血管内皮細胞を用いてAGE (advanced glycation

end-product)の測定を行い、high glucoseで高い値を得ることができた(図4)。

血管内皮細胞の機能に対するhigh glucoseの影響を明らかにするために、high glucoseの索状構造形成能に対する作用を検討した。培養期間はヒト臍帯血静脈内皮細胞は5日間、ヒト微小血管内皮細胞は11日間、ヒト大動脈内皮細胞は7日間である。図5に示すように、いずれの血管内皮細胞においてもhigh glucoseで索状構造の形成が低下しており、糖毒性が血管内皮細胞の重要な機能に影響を与えていることが示された。

最後に、以上のようなヒト血管内皮細胞の糖毒性における発現変化遺伝子を同定して合併症発生進行機序を解析して合併症診断マーカーを開発するために、cDNAマイクロアレイを駆使した網羅的発現解析を行った。ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞の各培養期間においてhigh glucoseによって共通して発現誘導される遺伝子を検討したところ、図6の如く、Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) やインテグリンファミリーの分子(ITGb4)、凝固線溶系の分子(tPA、TFPI2)等が発現上昇することが明らかとなった。

②サル及びヒト胚性幹細胞細胞の無血清・無フィーダー・無サイトカイン環境下での未分化維持継代培養とそこからの無フィーダー血管内皮差億分化誘導

サルES細胞を用いて、無血清・無フィーダー・無サイトカイン培養を行ったところ、40継代以上の未分化維持培養が可能であった。凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能であった。奇形腫形成も確認した。次に、ヒトES細胞を用いて、ヒトES細胞を用いた無血清・無フィーダー・無サイトカイン培養を試み、KhES-1、KhES-3の2株において25継代以上の未分化維持培養が可能であった。凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能であった。奇形腫形成も確認した。

サルES細胞を3日間の胚様体形成に引き続き、平面培養を行うと、フラスコの底に接着した胚様体は次第に平坦となり周囲に広がり、約2週間後には胚様体が存在した中心付近から嚢状の構造物が出現した。その嚢状構造物の中には球状の細胞(血液細胞)が充満していた(図7)。この血液細胞のライトギムザ染色形態は、

未分化な芽球とマクロファージで、ミエロペルオキシダーゼ染色、ナフチルブチレート染色が陽性であった。

一方、嚢状構造物の壁とその他の接着細胞を継代培養するとヒト臍帯静脈内皮細胞と形態が類似した細胞に均一に分化した(図8、図9)。この細胞は、血管内皮細胞に特有の細胞内 VE-cadherin、細胞内 N-cadherin が全て陽性であり、血管内皮(前駆)細胞と考えられた。FACSによる細胞表面の抗原解析では VE-cadherin と PECAM-1 が両方陽性の細胞が 20-60%程度認められ、血管内皮細胞であることが確認された(図11)。これらの細胞は、索状構造形成能陽性、Ac-LDL 取り込み能陽性で(図12)、eNOS、von Willbrand factor (vWF) も陽性の成熟内皮細胞であった(図13)。

次に、ヒト ES 細胞を同様の方法で分化誘導した。サル ES 細胞の時とほぼ同様の経過(胚様体形成、胚様体接着拡散、嚢状構造物)を経て、血液細胞と血管内皮細胞が産生された(図14)。この血液細胞のライトギムザ染色形態は、未分化な芽球とマクロファージであった。また、コロニーアッセイにおいて少数の顆粒球コロニーと多数のマクロファージコロニーが観察された。血管内皮細胞は VE-cadherin が 40%程度陽性(図15)、PECAM-1 は約 15%陽性で、索状構造形成能陽性(図15)、Ac-LDL 取り込み能陽性であった。

D. 考察

今回用いた3種類のヒト初代培養血管内皮細胞、すなわち、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞のすべてにおいて、数日間(同じヒト血管内皮細胞種により異なり 6-11 日間)の高ブドウ糖濃度負荷によって細胞内の活性酸素が上昇することが明らかにされた。この結果は、ウシ大動脈を用いての Brownlee らの報告やヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた他の研究グループからの報告と一致する成果で、高血糖が酸化ストレスに結びつくことが確認できた。このような酸化ストレスは活性酸素消去剤である NAC で抑制されることも確認されており、実験系の妥当性が示されている。高ブドウ糖濃度によって細胞内の酸化ストレスが増大していることは、細胞内酸化還元状態を制御する重要分子である GSH が、高ブドウ糖濃度

において減少していることから支持されており、この減少も検討した3種類のヒト血管内皮細胞すべてにおいて確認された。

高血糖の際の細胞内 ROS がどこから発生するかに関しては、ミトコンドリア由来という学説と細胞膜 NADPH オキシダーゼ由来という学説が混在している。両者の機構は全く異なり、機序の解明と分子標的の探索のためにはどちらであるかを解明することが必須である。しかしながら、今回の検討においてはミトコンドリアの阻害剤によっても NADPH 阻害剤によっても高ブドウ糖濃度誘導 ROS 上昇は阻害されず、どちらの経路を介しているかの特定は今後の課題となった。ミトコンドリア阻害剤は2種類の阻害剤を検討しており、異なる機序の NADPH 阻害剤の検討を予定している。

本年度の検討により、ヒト臍帯静脈内皮細胞とヒト微小血管内皮細胞において、高ブドウ糖濃度培養による AGE (advanced glycation end-product)の増加を明らかにした。AGE は直接、又は、その受容体を介してさまざまな細胞内の代謝に影響する事が想定されており、今回の成果は幅広い意味を有すると考えられる。とりわけ、近年の研究によってアンジオテンシン II 受容体拮抗薬が AGE の形成を抑制して糖尿病生腎症を軽減させると報告されている。アンジオテンシンそのものの我々の系に対する影響やオルメサルタンなどのアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の我々の系に対する影響を検討する必要がある。

索状構造形成能は、血管内皮細胞機能の測定系の1つとして多くの研究者に用いられており、今回、この機能が高ブドウ糖濃度培養によって、検討した3種類の血管内皮細胞すべてにおいて阻害されたことは注目すべき結果である。高血糖による血管内皮障害の1つの系として意義深いものと考えられる。現在、ROS の阻害や細胞内刺伝達の阻害によって、高ブドウ糖濃度誘導の索状構造形成障害が回復するか否か検討中である。

網羅的な遺伝子発現解析は、高ブドウ糖濃度によって酸化ストレスが増大して内皮機能が低下している細胞の状態の分子機構を解明する上で極めて有用な手段で、さらには治療の分子標的や血管内皮からみた合併症の診断マーカーの探索にも貢献しうる解析手法である。本年度は、ヒト臍帯静脈内皮細胞とヒト

大動脈内皮細胞に関して、その培養期間中の遺伝子発現変化を解析して、幾つかの発現増加遺伝子を明らかにした。中でも、2種類のヒト内皮細胞に共通して高ブドウ糖濃度において著明に発現増大していた分子は

Thioredoxin-interacting protein と呼ばれる分子である。この分子は、Thioredoxin の作用を阻害して細胞内の酸化抑制作用を低下させる方向に働き、既に高ブドウ糖濃度との関連も示唆されている。すなわち、高ブドウ糖濃度による酸化ストレスの1つの機序として注目すべき分子である。今後は、蛋白レベルでの発現増加とその特異的阻害実験を行う予定である。

今回の研究においては、3種類のヒト初代培養血管内皮細胞、すなわち、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞を用いて研究を進めた。複数のヒト初代培養血管内皮細胞を用いている研究は少なく、今回の成果の意義は大きい。今後は合併症が惹起される臓器（網膜、腎臓）のヒト初代培養血管内皮細胞を入手して研究を広げることが必要である。また、ヒト初代培養血管内皮細胞の限界を考慮して、霊長類胚性幹細胞から分化誘導された血管内皮細胞を用いて極めて独自の研究を進めることも重要である。現在、サル胚性幹細胞のみならずヒト胚性幹細胞からも安定して高効率に血管内皮細胞が分化誘導できる段階に至った。今後は、培養液中のブドウ糖濃度を下げて、現在の系に使用できるようにする予定である。

E. 結論

糖尿病の予後を決定する合併症の発生と進展の分子機序を解明して、合併症発生の初期の変化をとらえるマーカーやパラメーターを探索すると共に、特異性の高い分子標的療法の開発を目指して研究を進めた。具体的には、糖尿病の合併症の病態を「細小血管症」としてとらえ、高血糖による血管内皮細胞などの傷害（「糖毒性」）の研究を行った。血管内皮細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞を用い、測定する細胞内パラメーターは、細胞内 reactive oxygen species (ROS)、GSH（グルタチオン）、AGE (advanced glycation end-product)、血管内皮細胞機能としては索状構

造形成能を用いた。さらに、網羅的な解析として、各種血管内皮細胞のブドウ糖濃度変化による遺伝子発現変化をマイクロアレイによって検討した。その結果、細胞内 reactive oxygen species (ROS)は、いずれの内皮細胞においても高ブドウ糖濃度負荷によって増加し、活性酸素消去剤である NAC (N-acetyl-Cysteine) によって阻害された。また、このような ROS の上昇（酸化ストレス）に関連して細胞内酸化還元状態の指標である GSH の減少がいずれの血管内皮細胞においても認められた。また、高ブドウ糖濃度による AGE (advanced glycation end-product)の上昇と索状構造形成能の低下が観察された。以上より、ヒト血管内皮細胞を用いて、ブドウ糖濃度の上昇に伴う細胞障害につながる細胞内機構が再現され、糖毒性の *in vitro* 解析系が確立された。このような系を用いて網羅的な解析を行ったところ、Thioredoxin-interacting protein を初めとする遺伝子の高発現が認められ、酸化ストレスの関与が一層明らかとなった。さらに、以上のような初代培養ヒト血管内皮細胞の限界を補うために、霊長類胚性幹細胞からの、従来よりも極めて効率の高い継代可能な血管内皮細胞を得て、我々の系に使用すべく準備を行っている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K, Yuo A: Peroxisome proliferator-activated receptor α ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells. *Dev Growth Differ* 48:177-188,2006.
2. Doshi M, Koyanagi M, Nakahara M, Saeki K, Saeki K, Yuo A: Identification of human neutrophils during experimentally induced inflammation in mice transplanted with human umbilical cord blood CD34-positive cells. *Int J Hematol* 84:231-237,2006.