

200706022A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療研究事業

膵上皮幹細胞による糖尿病細胞治療に関する研究

平成19年度 総括研究年度終了報告書

主任研究者 宮脇 一真

平成20(2008)年 5月

目 次

I. 総括研究年度終了報告	
腭上皮幹細胞による糖尿病細胞治療に関する研究	----- 1
宮脇一真	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 6

厚生労働科学研究費補助金（再生医療研究事業）
（総括）研究報告書

膵上皮幹細胞による糖尿病細胞治療に関する研究

（主任）研究者 宮脇 一真 神戸大学医学系研究科 助教

研究要旨

わが国における糖尿病患者数は約740万人、その予備軍も含めると約1620万人にも達するとされ、国民健康上の深刻な問題となっている。本研究では、糖尿病再生医療を実現するための基盤研究として、*in vitro*で自己複製可能な体性幹細胞を同定し、その細胞から膵β細胞を分化誘導する方法の開発を行った。

マウスの新生児膵から単離されたPES細胞は、未分化状態を維持したまま長期間増殖し、膵前駆細胞に特徴的な遺伝子プロファイルを有していた。遺伝子導入や低分子化合物添加によって膵内分泌ホルモンを発現し、膵内分泌細胞への分化能を示した。本研究は、糖尿病細胞治療の実現へ向け重要な進捗をもたらした。

分担研究者氏名・奥野 正顕
所属機関・神戸学院大学薬学部
職名・ 助教

分担研究者氏名・片山 弘一
所属機関・京都大学医学部附属病院
探索医療センター
職名・ 実験助手

A. 研究目的

2002年に実施された糖尿病実態調査によると、我が国における糖尿病患者数は約740万人、その予備軍を合わせると約1620万人にも達するとされている。さらに、長期的な糖尿病の罹患により重篤な合併症（網膜症、腎症、神経障害など）を発症する患者も年々増加しており、糖尿病は国民健康上の深刻な問題となっている。しかし従来のインスリン治療や食事療法、運動療法では、1型糖尿病患者や重度の2型糖尿病患者の血糖値を生理的範囲内にコントロールすることは困難であることから、糖尿病患者に対し失われた内分泌組織を補充、もしくは

復元する移植・再生医療の確立に期待が寄せられている。2000年にカナダのアルバータ大学において実施されたエドモントンプロトコールによって膵島移植が好成績を修めて以来、国内でも膵島移植が実施されるようになり、糖尿病に対する根本的な治療法として注目されるようになってきている。しかしながら、慢性的なドナー不足が解消される見通しは立たないことから、多くの糖尿病患者に幅広く適用することは現実的に困難である。

本研究の目的は、糖尿病移植医療におけるドナー不足の問題を解決するため、*in vitro*で長期間自己複製可能な体性幹細胞を同定し、その幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導法を開発することである。本研究の遂行により、*in vitro*で膵幹細胞からインスリン分泌細胞を分化誘導する基盤技術が提供できれば、将来的に1型糖尿病や重度2型糖尿病患者への移植ソースとして、膵幹細胞を臨床応用することが可能になると考えられ、より多くの糖尿病患者が移植・再生医療の恩恵を享受できる。

B. 研究方法

Pancreatic Epithelial Stem(PES)細胞の樹立および培養

生後1日から2日のマウス新生児からピンセットにより膵臓を摘出し、コラゲナーゼD (Roche) 20 mgを3 ml のHBSSに溶した溶液中で20分間、37℃で振盪し消化した。分散した細胞は、PES細胞に最適化した培地中で、35 mm dishあたり10000細胞になるように播種した。10日後にはPES細胞のみが出現してくるので、TrypLE (GIBCO) を用いて継代した。その後は1週間おきに、35 mm dishあたり50000細胞になるように継代を続けた。PES細胞の凍結保存にはセルバンカー (日本全業工業) を用い、-130℃のディープフリーザーで保存した。

テロメア長の測定

テロメア長の測定にはテロメアレングスアッセイ (Roche) を用いた。PES細胞の精製ゲノムDNAを、制限酵素ミックスで切断し、DNA断片をゲル電気泳動で分離した。電気泳動したDNAをナイロンメンブレンにトランスファー後、DIG標識TAGGGプローブとハイブリダイズし、AP標識抗DIG抗体とインキュベートした。固相化されたテロメアプローブをアルカリホスファターゼ化学発光基質CDP-Starで発光させ検出した。

アデノウイルスベクターの作製および感染

マウス膵ラ氏島からtotal RNAをRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、Random Primer法を用いてcDNAを作製した。作製したcDNAをテンプレートとして、膵発生上重要な役割を担う11種類の転写因子 (Pdx1、NeuroD1、Ngn3、Pax4、Pax6、Isl-1、MafA、Hlx9、Nkx2.2、Nkx6.1、Ptf1a) のcDNAをPlatinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) を用いてPCRで増幅し、pENTRベクターにサブクローニングした。シーケンスを確認後、ViraPowerアデノウイルス発現システム (Invitrogen) を用いてアデノウイルスを作製した。得られたアデノウイルスは、-80℃のディープフリーザーで保存し、必要量を溶解して100 moiになるようにPES細胞に感染させた。

GeneChip解析

Mouse insulin promoter-1下でEGFPを発現するトランスジーンをホモに持つトランスジェニックマウス (ICRバックグラウンド) を野生型マウスのC57/BL6と一度戻し交配してヘテロトランスジェニックマウスを作製し、前述の方法によりPES細胞を樹立した。数回継代したのちtotal RNAをRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。他方、同じヘテロトランスジェニックマウスの膵島を、コラゲナーゼP (Roche) を用いて単離し、Trypsin-EDTA (GIBCO) で単細胞化した。単細胞化した細胞をフィルターにかけた後、FACS Aria (Becton Dickinson) でEGFPを発現する膵β細胞のみを回収し、同様にtotal RNAをRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。このように回収したPES細胞と膵β細胞 (コントロール) のtotal RNAを用いてGeneChip解析 (Affymetrix) を行った。

siRNAの作製および導入

siRNAは17種類の遺伝子 (HES1、Id1、Id2、Id3、RBP-J、Jagged1、Jagged2、delta1、Notch2、Notch3、Shh、Ihh、Dhh、HNF6、Cdx2、Sox17、Smo) 対してデザインした。1つのターゲット遺伝子につきデザイン済みsiRNA (Dharmacon) 100 pmolをLipofectamine siRNA MAX (Invitrogen) により1x10⁵細胞にトランスフェクションした。siRNA導入によるターゲット遺伝子発現抑制効果は、Taqman probe (ABI) を用いたReal-time RT-PCR法により検討し、70%以上の抑制効果が得られたものについて解析した。

分化誘導細胞の生理的解析

PES細胞を35 mmディッシュに播種し、分化誘導の後に、インスリン分泌能の検討を行った。3 mMグルコースを含むKRBバッファーで30分間、37℃でインキュベーションした後、3 mMもしくは20 mMグルコース存在下で、2時間、37℃でインキュベーションし、インスリン分泌を測定した。インスリンの測定には、レビスインスリンキット (シバヤギ) を用いた。

電気生理学的検討では、Patchクランプ法によりPES細胞と電極とのギガシールを形成後、Whole cell configurationにより電位依存性カルシウムチャネルの活性を測定した。

免疫染色

PES細胞を4%パラホルムアルデヒドにて20分間固定後、10%ヤギ正常血清、0.2% Tween20を含むPBSで20分間インキュベートし膜の透過性を確保した。次に、rabbit-anti-Pdx1抗体(1次)を室温で2時間、続いてgoat-anti-IgG-Alexa488標識抗体(2次)を室温で1時間反応させることにより免疫染色を行った。核染色にはDAPIを用いた。

C. 研究結果

膵上皮幹細胞の未分化性の解析

主任研究者らがマウス新生児膵から単離したPES細胞は、最適化された培養条件下で長期にわたり旺盛な増殖力を保持した。このPES細胞は非常に小型で、高い核/細胞質比を持ち、未分化細胞に共通してみられる形態学的特徴を有する。この細胞は膵発生において中心的な役割を担う転写因子Pdx1が強く発現していることが免疫染色で確認されたほか、HNF1 α 、HNF3 β 、Nkx2.2、Nkx6.1といった生体内の膵前駆細胞と同じ転写因子発現プロファイルを示した。加えて、膵前駆細胞のマーカーとして知られているHes1やHNF6、ATP感受性カリウムチャネルを形成するKir6.2、インスリン顆粒の開口分泌機構であるVAMP2やSyntaxin 1A、膵内分泌ホルモンの一つであるソマトスタチンなどを発現しており、これらの遺伝子プロファイルはPES細胞が膵発生の系譜上にあることを示すものであると考えられた。次に、マウス胎児膵由来PES細胞とマウス成体膵由来PES細胞の成長曲線を描いたところ、両細胞とも約48時間のダブルタイムを持ち、これを少なくとも30週間以上維持していた。テロメアの長さを胚性幹(ES)細胞や膵外分泌細胞と比較したところ、PES細胞のテロメアはES細胞とほぼ

同等の長さを有し、また膵外分泌細胞のテロメアより長かった。以上のことから、PES細胞は未分化な膵幹(前駆)細胞であると考えられた。

低分子化合物、siRNAを用いた分化誘導

PES細胞と膵 β 細胞のGeneChip解析比較を行った結果、PES細胞ではNotchシグナル(Notch、Hes1、Jagged1、Jagged2)やヘッジホックシグナル(Shh、Ihh、Dhh、Smo、Patched)などの分化抑制機構が非常に強く働いていることが明らかとなった。そこでNotchシグナルの阻害剤である γ -secretase inhibitorを添加したところ、インスリン2遺伝子のわずかな発現誘導を認め、またShhのシグナルをsiRNAによって遮断することによりグルカゴン遺伝子の発現誘導を認めた。このことは、これらの分化抑制機構がPES細胞の未分化状態維持に重要な役割を担っていることを示す証拠であると考えられた。

転写因子を用いた膵 β 細胞への分化誘導

膵発生学上重要な役割を果たす転写因子(Pdx1、NeuroD1、Ngn3、Pax4、Pax6、Isl-1、MafA、H1xb9、Nkx2.2、Nkx6.1、Ptf1a)11種類を、PES細胞に様々な組み合わせで導入し遺伝子発現変化を検討した。

PES細胞と膵 β 細胞の遺伝子プロファイル比較の結果、膵 β 細胞の発生に必要なNeurogenin3、NeuroD、Pax4、H1xb9、Isl1等の発現が欠如していることが明らかとなった。そこでアデノウイルスによりNeuroDをPES細胞に導入したところ、ATP感受性カリウムチャネル(Kir6.2、SUR1)、電位依存性カルシウムチャネル(Cav1.2、Cav1.3)、インスリンプロセッシング酵素(PC1/3、PC2)、開口放出関連因子(Rab3、Chromogranin A/B)の発現が誘導された。さらに、NeuroDに加えて、MafA、Isl1を同時に導入することにより、インスリン2遺伝子が強く誘導された。しかしながら、インスリン1遺伝子は誘導されなかった為、さらなる組み合わせを検討した結果、NeuroD、MafA、Isl1、H1xb9、Nkx2.2、Nkx6.1、Pax6を同時

に導入することにより、インスリン1、2の遺伝子が誘導され、より膵β細胞に近い遺伝子プロファイルを示す細胞に誘導することが可能であった。

分化誘導したPES細胞の機能評価

NeuroD、MafA、Isl1を同時に導入したPES細胞の電気生理学的興奮性をPatch Clamp法により検討したところ、電位依存性カルシウムチャネルのカレントを確認することができた。一方、バッチインキュベーション法により同細胞のグルコース応答性インスリン分泌を検討したが、こちらは検出限界以下であった。これらは、PES細胞が膵β細胞に特徴的な性質を部分的に獲得したものの、その分化度がまだ十分でないことを示唆しているものと考えられた。

ヒトPES細胞樹立の試み

ヒト組織からPES細胞を樹立するため、膵ガン患者のオペ時に摘出されるガン組織に含まれる僅かな正常組織を材料として、培養条件の検討を行った。しかしながら、高齢者からの組織であったことが原因と考えられるが、3回の樹立の試みはすべて不首尾に終わった。

D. 考察

本研究では、マウス新生児膵より膵発生学上の系譜に乗ったPES細胞を樹立し、膵発生に重要な転写因子導入や、シグナルを遮断する低分子化合物、分化を抑制する因子をsiRNAなどによって膵内分泌細胞に分化誘導する試みを中心に行った。この結果、インスリンやグルカゴンといった膵分泌ホルモンをPES細胞から誘導することに成功した。インスリン以外にも、グルコース感知機構関連分子や調節性開口分泌関連分子などの誘導も認められ、分化刺激によってカスケード的に膵β細胞を特徴づける因子が発現することが明らかとなった。このことはPESが未分化な膵幹細胞としての特徴を有していること、PES細胞が膵β細胞へ分化するポテンシャルを有していることを示す証拠であると思われる。しかし一方で、今回の検討では完全に機能な成熟膵β

細胞への誘導には至っておらず、またヒトPES細胞の樹立においては高齢者からの組織では困難であった。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物愛護管理法および京都大学・動物実験に関する指針に基づき、動物実験計画書を作製して承認を受けている。ヒト組織の使用に関しては、心停止ドナー由来の膵組織は使用せず、膵臓ガン摘出手術時の組織を使用する予定である。本計画は、京都大学・医の倫理委員会から承認を受けている。いずれも両委員会において、厳正かつ慎重な審査が行われており、倫理面には問題がないものと考えられる。

E. 結論

PES細胞が、膵β細胞へ分化する可能性を秘めていることは示唆されたが、転写因子のみの誘導法では限界があると考えられた。より分化度の高い膵β細胞を作製するためには、さらに多くのサイトカインの組み合わせや分化抑制因子の解除による分化誘導法の検討が必要であると考察された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Generation of insulin-secreting cells from pancreatic acinar cells of animal models of type 1 diabetes.

American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism

292(1):E158-65

2. 学会発表

なし。

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。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

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
なし					