

適しており、我々もこれまで、ブタ膵内分泌細胞を用いた研究を行ってきた。さらに、今回我々が注目した「新生仔ブタ膵」は、組織の個体発生の最終段階にあることから、盛んにβ細胞が供給されつつある、すなわち、細胞の増殖、分化の盛んな未熟な内分泌細胞や膵内分泌前駆細胞が、成体ブタに比べて豊富に存在している可能性がある。

インスリン分泌障害をともなう2型糖尿病の治療の理想は、内在する膵内分泌前駆細胞を増殖、分化、維持させ、機能的な膵内分泌細胞を十分保ち、生理的なインスリン分泌パターンを再現することである。

我々は、本体の不明なこうした「前駆細胞」「幹細胞」の候補として、ブタ膵におけるSP細胞の存在を確立し、長期増殖能、及び限定的だが分化能、をもつことを示してきた。今回のマイクロアレイによる細胞の性質検討では、細胞のidentityを必ずしも明確にすることはできなかった。他の固形臓器由来SP細胞での網羅的発現解析の結果をみても、傾向は一定せず、いわゆる

「stemness」「SPness」としての共通したマーカーは得られておらず、この領域の難しさを改めて浮き彫りにしたといえる。一方で、今回内胚葉系以外への分化が見られたことについては、こうした中胚葉系の細胞がSP細胞分画に含まれていた可能性のほか、中内胚葉系の境界域にいる細胞の存在、という、これまであまり想定されて来なかった細胞集団である可能性もある。この現象の意義や普遍性については慎重に解

釈するべきだが、組織内での増殖分化には、従来考えられているより複雑な調節機構が存在するのかもしれない。

膵β細胞における「グルコース反応性インスリン分泌 (GSIS)」は、成熟した膵β細胞の指標であり、糖尿病患者では発症前から異常が見られ病因上も注目されている。またES細胞、組織幹細胞からインスリン分泌細胞への*in vitro*分化誘導系など、膵β細胞の再生医学においても、このGSISを獲得するステップは、大きなハードルとなっている。GSIS障害を呈するモデル系は数多いが、こうしたGSISを獲得する生理的な経過を再現する系は、実はほとんど存在しなかった。今回我々が作製したモデルは、簡便で再現性がよく、かつ生理的な成熟過程をよく反映していると考えられるので、分子的解析に適していると考えられる。

GeneChipシステムを用いた解析から見つかった21遺伝子について、siRNA導入によりその発現量を低下させた際、半分以上の遺伝子においてグルコース応答性インスリン分泌の低下が見られた。これら遺伝子の中には、インスリン分泌との関係がこれまで報告されていないものも多くあり、GSIS研究における新しい知見を得たものと考えられる。膵β細胞の最終的な機能的成熟の鍵となる遺伝子がこのなかから特定できれば、基礎的にもまた応用分野でもきわめて有用な知見となる可能性が高い。

完全長 cDNA ライブラリーの一般的な有用性については、昨年度までの報告書でも論じたので省略するが、今回特記すべきは、タンパクをコードしない「non-coding RNA」の候補で、膵島でも発現がみられ、かつ機能的な意義が示唆されるものを発見したことである。短い microRNA などは、ほ乳類においても、発生・細胞増殖・がん化などの関係から生理的・病的意義が注目されているが、より長い、mRNA タイプの ncRNA については、ごく一部の例をのぞいて機能はほとんど不明で、分泌との関連が示唆されたのはおそらくこれが初めての例である。一方で、膵β細胞は、RNA ターンオーバーやタンパク合成が、栄養素代謝と細胞の機能維持との関連にきわめて重要であることが知られており、今回の発見は、さらにこれまで報告のなかった機能調節機構、代謝と「RNA world」の関係などが垣間みられて興味深い。

こうした ncRNA が、どのような機序で細胞の表現型に影響を与えるのかは、全くわかっておらず、今後の最大の課題である。この点で、今回ノックダウンした細胞でさらに網羅的な発現解析を進めつつあり、その系統的解析から、このジャンルの突破口が開かれるのではないかと期待される。また、*in vitro* 及び *in vivo* での発現調節機構、も重要なテーマである。

こうした解析により、膵β細胞における全く新規の遺伝子発現調節機構や新しい機能をもつ遺伝子・タンパクが明らかになれ

ば、糖尿病代謝疾患の本質の理解にも資すると期待される。具体的には、本研究期間中には果たせなかったが、当研究班の Sendai ラットでの経時変化や、ヒト SNP 解析などにより、病態における意義についても検討が期待される。たとえば、糖尿病遺伝因子としての SNP が、これまでの既知遺伝子が存在しないゲノム領域に同定された場合でも、こうした未知の「non-coding RNA」の発現調節を介した機能的意義を有する可能性もある。

以上の研究により、膵β細胞の量的、あるいは質的な調節機構、機能維持機構に関する、新たな知見を得たと考えられる。一方で残念ながら、本研究期間中には、こうした基盤研究の成果を臨床パネルで検証する段階まで至ることができなかった。ただし、糖尿病では、罹患した臓器そのものは得られず、ゲノム・血清・尿や臨床情報とあわせて統合的に解析する必要があるが、今回構築しているパネルは、こうした目的には大変有用なものと期待される。今後、本研究で得られた知見の、生体における意義、糖尿病の病態における重要性、さらに治療標的としての可能性等について、我々を含めて解析が続くことを期待したい。

E. 結論

「インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償とその破綻」のメカニズムを解析するた

めの基盤的な系を構築した。新生仔ブタ膵からのSP細胞、膵β細胞の機能成熟系、膵β細胞に発現するncRNAなどについて、関与する分子メカニズムを解明するために網羅的解析などを行い、新規の知見を多く得た。今後、本研究で構築した臨床パネルなどを用いて、個体レベルの統合的な解析により、病態との関係が明らかにされ、診断や治療への応用されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) 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 Struct Funct** 32(1):69-78, 2007.
- 2) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Hasegawa R, Suzuki K, Yanagawa T, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Tohkin M, Sawada J-I. Genetic variations of the ABC transporter gene *ABCC3* in a Japanese population. **Drug Metab Pharmacokinet** 22 (2) 129-135, 2007.
- 3) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Kamatani N, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Sawada J-I. Genetic variations and haplotype structures of transcription factor *Nrf2* and its cytosolic reservoir protein *Keap1* in Japanese. **Drug Metab Pharmacokinet** 22(3):212-9,2007.
- 4) Yamashita R, Fujiwara Y, Ikari K, Hamada K, Otomo A, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y. Extracellular proteome of human hepatoma cell line, Hep G2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Mol Cell Biochem** 298(1-2):83-92, 2007.
- 5) Tsuchiya M, Yoshida T, Taniguchi S, Yasuda K, Maeda A, Hayashi A, Tanaka J, Shigemoto M, Nitta K, Tsuchiya K : *In vivo* suppression of *mafA* mRNA with siRNA and analysis of the resulting alteration of the gene expression profile in mouse pancreas by the microarray method. **Biochem Biophys Res Commun**, 356(1):129-135, 2007.
- 6) Takeuchi F, Yanai K, Inomata H, Kuzuya N, Kajio H, Honjo S, Takeda N, Kaburagi Y, Yasuda K, Shirasawa S, Sasazuki T, Kato N. Search of type 2 diabetes susceptibility gene on chromosome 20q. **Biochem Biophys Res Commun**357(4):1100-1106, 2007.
- 7) Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Yasuda K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Association of *TCF7L2* polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects. **J Hum Genet** 53(2) : 174-180, 2008.
- 8) Takeuchi F, Ochiai Y, Serizawa M, Yanai K, Kuzuya N, Kajio H, Honjo S, Takeda N, Kaburagi Y, Yasuda K, Shirasawa S, Sasazuki T, Kato N. Search for type 2 diabetes susceptibility genes on

chromosome 1q, 3q and 12q. *J Hum Genet* 2008, *in press*

2. 学会発表

(国内)

1) 岡村匡史、矢延理絵子、新矢恭子、谷口繁生、清水有紀子、安田和基、笠井憲雪：「非肥満型糖尿病モデル LEA/SENDAI ラットを用いた耐糖能異常関連遺伝子の探索」、第143回日本獣医学会学術集会、平成19年4月、つくば

2) 横内裕敬、山本修一、武田憲夫、鑑木康志、安田和基「高グルコース下で誘導されるヒト網膜色素上皮細胞由来血管新生促進因子の検討」第111回日本眼科学会総会、平成19年4月、大阪

3) 谷口繁生、土谷健、大河原久子、土谷まり子、尾山和信、鑑木康志、安田和基：「高グルコース存在下に培養した新生仔ブタ内分泌細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌と遺伝子発現」第50回日本糖尿病学会年次学術集会、平成19年5月、仙台

4) 横内裕敬、山本修一、武田憲夫、鑑木康志、安田和基：「高グルコース下で誘導されるヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) 由来血管新生促進因子の検討」、同上

5) 山下亮、井狩高平、安田和基、関原久彦、鑑木康志：ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用。第80回日本内分泌学会学術総会、ポスター発表、平成19年6月、東京

6) 山下亮、井狩高平、安田和基、鑑木康志：ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用。第30回日本分子生物学会・第8回日本生化学 合同大会、口演&ポスター発表、

平成19年12月、横浜

7) 高橋枝里、岡村匡史、井狩高平、平野久、安田和基、鑑木康志：LEA/Sendai ラット血清のプロテオーム解析。第30回日本分子生物学会・第8回日本生化学 合同大会、ポスター発表、平成19年12月、横浜

8) 安田和基「2型糖尿病発症遺伝子の最近の話題」第2回 四国先端糖尿病研究会、平成20年1月26日、松山

(国際学会)

1) Yokouchi H, Yasuda K, Takeda N, Kaburagi Y, Yamamoto S. Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) is induced in retinal pigment epithelial cells by high glucose and exhibits potent angiogenic activity on retinal endothelial cells. Annual Meeting for ARVO(The Association for Research in Vision and Ophthalmology), Fort Lauderdale (USA), May, 2007.

2) Yasuda K, Taniguchi S, Tsuchiya K, Tsuchiya M, Oyama K, Kawaguchi M, Kaburagi Y, Okochi H, Ohgawahara H. Isolation and characterization of side population (SP) cells from neonatal porcine pancreas. EASD Islet Study Group Symposium 2007, Brussels (Belgium), September, 2007

3) Saito Y, Tohkin M, Fukushima-Uesaka H, Maekawa K, Sai K, Hasegawa R, Kamatani N, Suzuki K, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yanagawa T, Yasuda K, Sawada J-I. Haplotype structure of ABCC8 and KCNJ11 genes and their influence on glimepiride efficacy, 国際薬物動態学会 ISSX, Sendai, Oct, 2007.

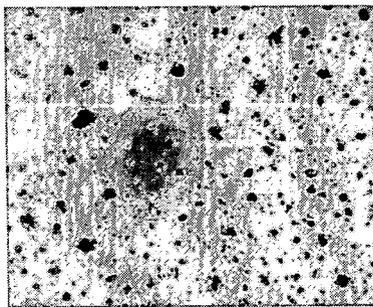
2007-325366) 出願日：平成19年12月
18日

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

- 安田和基、ほか8名「遺伝子多型を用いた2型糖尿病の検査方法」（特願

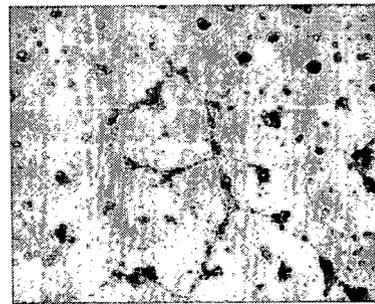
図1: SP細胞からの血管様索状構造の構築

条件A



索状構造(-)

条件B



索状構造(+)

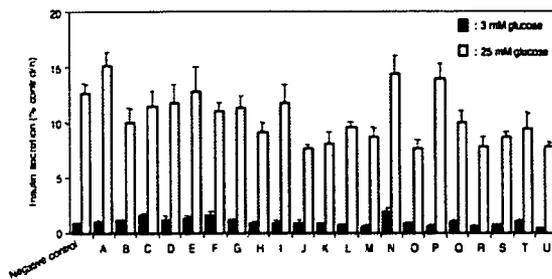
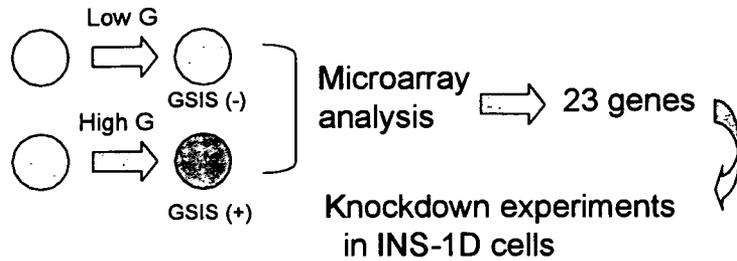
<可能性>

SPフラクシオンに内皮が存在!?

内胚葉と中胚葉の中間的形質をもつ細胞??

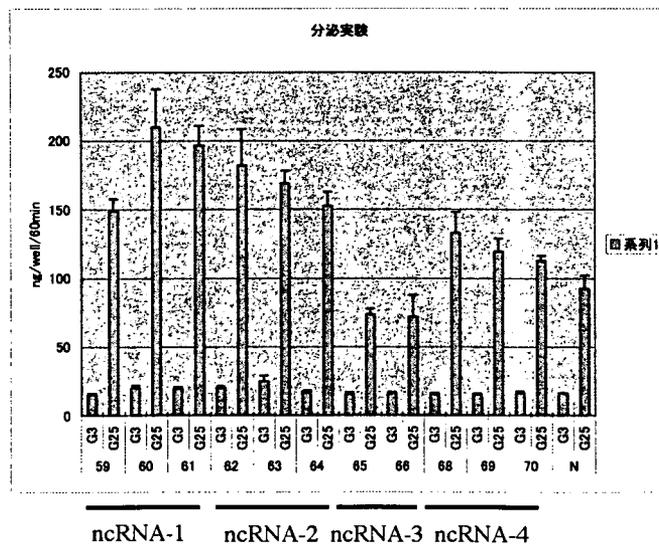
臓器特異的・時期特異的な内皮の役割?

図2: 膵β細胞機能成熟に関与する遺伝子の探索



siRNA によるノックダウンを行い、72時間後にグルコース反応性インスリン分泌に対する効果を検討した。Negative control siRNA 処理細胞を対照とした(左端)。反応性が低下したもの(HJKLMOQRSTUなど)がかなり見られている。

図3: ncRNAのGSISへ及ぼす効果: siRNAによる検討



4つのncRNAに対して、各3種のsiRNAをデザインし、INS-1D細胞に導入して72時間後にグルコース反応性インスリン分泌(GSIS)を検討した。ネガティブコントロールsiRNA導入細胞を対照とした(N)。

インスリン・シグナル伝達のプロテオーム解析
分担研究者 鏑木 康志 [国立国際医療センター・研究所・室長]

研究要旨

インスリンと同様の効果を持つ内服可能な薬剤の分子標的になりうるシグナル蛋白を同定するために、プロテオーム解析の手法を用いてインスリン受容体チロシン・キナーゼの主要な基質であるIRSを介したシグナル伝達に関与する蛋白を網羅的に解析する。今年度はIRS3固有の細胞増殖抑制機構解明のために、IRS高発現細胞からの核抽出液を二次元電気泳動でのディファレンシャル解析(2D DIGE)にて解析し、各細胞間あるいはインスリン刺激により有意に変動する蛋白を50個以上同定した。同定された蛋白の多くは、細胞骨格、RNA代謝、蛋白合成を制御する蛋白であった。また、長鎖飽和脂肪酸による短時間刺激にて膵β細胞でのインスリン分泌が亢進するため、この分子機構に関与しうるパルミチル化蛋白を精製する実験系を、Acyl-biotinyl exchange法を改良して確立した。HEK293細胞での予備解析では、パルミチル化蛋白の候補分子を数個同定した。また、インスリン抵抗性改善を促進するアディポカインであるアディポネクチンについて、低分子量で高活性のリコンビナント蛋白を大腸菌から合成する系を確立し、ヒト肝細胞由来HepG2細胞にてアディポカイン刺激下で発現される蛋白プロファイルを2D DIGEにて解析した。これらの一連のプロテオーム的手法による網羅的解析を用いて、インスリン作用あるいはアディポネクチ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。

A. 研究目的

I: インスリン・シグナル伝達

多くの成長因子の受容体の細胞内の情報伝達機構では、受容体自身のチロシン・キナーゼ活性によって自己リン酸化した受容体のホスホチロシン残基へのシグナル伝達蛋白の結合が重要と考えられているが、インスリンやIGF-1による情報伝達ではシグナル伝達物質がチロシンリン酸化したIRS (insulin receptor substrate)等の細胞内基質に結合するのが特徴であり、これがインスリン作用に特異的な代謝作用の分子生物学的基盤の一因と考えられてきた。IRS knockout mouseの解析結果から各臓器にてシグナル伝達に果たす役割は、各IRSによって大きく異なることが判明したが、その分子生物学的基盤についてはほとんど明らかにされていない。

本計画では、各IRSのインスリンによる生物学的作用での役割の違いを培養細胞にて詳細に検討し、その原因となるIRSの各ドメインと相互作用する分子、シグナル蛋白を二次元電気泳動、pull-down法等のプロテオーム解析の手法を駆使して同定する。IRS下

流の経路は癌細胞の増殖やアポトーシス抑制といった代謝以外の生命現象をも制御しているため、本研究では糖尿病に関連した代謝作用と、癌細胞の増殖等の代謝以外のインスリン作用を詳細に比較検討し、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の発見を目指す。

II: インスリン抵抗性

糖尿病患者の90%以上を占める2型糖尿病はインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併することで発症する多因子性疾患であり、その患者数は戦後30年間で2.5倍以上に急増している。この短期間に糖尿病関連遺伝子の頻度が急上昇したとは考えにくく、食生活の欧米化、生活の都市化等のライフスタイルの変化といった環境因子の変化が原因と考えられている。特に近年の食生活上の変化としては、摂取カロリーの増加よりも脂肪摂取の比率の上昇(エネルギー比にて25%以上)が特徴である。このため、高脂肪食によるインスリン抵抗性の原因の解明が、2型糖尿病及びこれに起因した糖尿病性合併症、大血管障

害の克服のために必須である。

インスリン抵抗性の病態には、加齢によるエネルギー代謝の変化として筋における糖取り込みの低下、肝での糖新生及び糖放出の亢進、脂肪組織での糖取り込み亢進及び脂肪蓄積が関与している。近年、遊離脂肪酸が全身でのインスリン抵抗性を亢進させるメディエーターとして着目されているが、長鎖脂肪酸は短期的に膵β細胞からのインスリン分泌を促進することでも知られている。本研究では、膵β細胞での長鎖脂肪酸による短時間処理によるインスリン分泌促進、長時間処理によるブドウ糖応答性インスリン分泌低下(GSIS)について、これらの現象に関与する蛋白をプロテオーム解析による網羅的な検索にて同定し、長鎖脂肪酸による膵β細胞での相反する生理作用の分子機構の解明を目標とする。

B. 研究方法

I: インスリン・シグナル伝達

・IRS高発現CHO細胞での細胞周期制御の分子機構の解析

インスリンと同様の効果を持つ内服可能な薬剤の分子標的になりうるシグナル蛋白を同定するために、プロテオーム解析の手法を用いた新規シグナル蛋白の網羅的同定の実験系を用いて、IRS高発現が核内での発現に影響を与える蛋白を検索する。本研究室で既に作製したインスリン受容体とIRS-1またはIRS-3を高発現したCHO-IR細胞で核抽出液を精製して、核内蛋白発現プロファイルの変動を2D-DIGEによる二次元電気泳動ゲル上でディファレンシャル解析し、有意な変化を有する蛋白をLC-MSにて同定し、それらの翻訳後修飾の変化についてもプロテオーム解析の手法で解析する。

II: インスリン抵抗性

・短時間長鎖脂肪酸処理による膵β細胞でのインスリン分泌亢進の分子機構の解析

膵β細胞では短時間の脂肪酸処理によって膵β細胞からのインスリン分泌が促進される。この分子機構については、蛋白のアシル化を阻害するCeruleninがパルミチン酸などの長鎖飽和脂肪酸刺激によるインスリン分泌刺激作用を抑制することから、蛋白のアシル化が関与していることが想定された。実際に、放射性パルミチン酸を用いたラベル実験では、膵β細胞からブドウ糖刺激で特異的にパルミチル化される24kDaの蛋白の存在が示唆されたが、パルミチル化された蛋白の精製法が未確立であったため、同定には至らなかった(Yamada et al. *Endocrinology* (2003) 144, 5232-5241)。そこで、最近酵母での実験結果(Roth et al. *Cell* (2006) 125, 1003-1013)が報告されたAcyl-biotinyl exchange (ABE)法により細胞内

におけるパルミチル化された蛋白を特異的に精製する系を確立する。ABE法とは、蛋白のシステイン残基上のfreeのSH基をN-ethylmaleimid (NEM)でブロック(Step 1)、タンパク質のシステイン残基に結合しているパルミチル基をHydroxylamine (HA)で除去(Step 2)、Step 2で新たに作られたfreeのSH基をbiotinでラベル後にstreptavidin-agaroseでパルミチル化蛋白を特異的に回収(Step 3)の三段階の反応から構成される。既に細胞内でパルミチル化されることが証明されているSNAP25及びパルミチル化部位の欠失変異有するSNAP25を指標として、まずCos-1細胞にてパルミチル化蛋白精製の実験系を確立し、これを用いてヒト由来HEK293細胞にて1D-PAGE, 2D-PAGEゲルからのLC-MS/MSを用いたパルミチル化蛋白の網羅的同定を試みる。

・アディポネクチン・シグナル伝達機構の解析

脂肪細胞から分泌されるアディポカインの一つであるアディポネクチンは、その血中濃度が肥満者や2型糖尿病患者で低下して、インスリン抵抗性や動脈硬化の進展を促進することが知られている。アディポカインの受容体は、筋肉を含む全身の組織に広く分布するAdipoR1に加えて、肝臓に高発現するAdipoR2が報告されているが、受容体下流のシグナル伝達機構の詳細は明らかにされていない。そこでAdipoR1及びAdipoR2の両者を発現する肝細胞由来細胞株HepG2を用いて、大腸菌から精製したリコンビナント・アディポネクチンにて処理後の蛋白発現プロファイルを2D-DIGEによりディファレンシャル解析し、有意な変化を有する蛋白をLC-MSにて同定する。

C. 研究結果

I: インスリン・シグナル伝達

・IRS高発現CHO細胞での細胞周期制御の分子機構の解析

フローサイトメトリーでの解析結果では、IRS-1高発現はインスリン依存性の細胞周期進行に影響を与えなかったが、IRS-3高発現はG1/S期及びG2/M期への進行を有意に阻害した。一方、IRS-3高発現細胞では、IRS-1高発現細胞と比較してインスリン刺激によるAkt, MAP kinaseの活性化に変化はないが、免疫染色の結果ではIRS-3がIRS-1と比較して選択的に核に局在していることから、核内でのIRS-3特有の経路が細胞周期抑制に関与すると考えられた。このため、各IRSが核内で相互作用する蛋白が異なると推測して、各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よるディファレンシャル解析(2D-DIGE)を試みた。その結果、インスリン刺激前後あるいは各細胞間で有意に変動する蛋白スポットを総計約150個検出し、50個以上の蛋白を

LC-MS/MSにて同定した。同定された蛋白を gene ontologyにて機能分類した結果では、最も多かったのは細胞骨格に関係した蛋白であり、2番目に多かったのはhnRNP K等のRNA代謝に関与する蛋白、3番目はTCTP等の翻訳調節に関与するであった。これらの蛋白の中で、hnRNP K及びTCTP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。後者については、細胞質分画ではインスリン刺激による同様なスポットパターンの変化はないことから、核内のIRSに固有のシグナルであることが示唆された。

II: インスリン抵抗性

・短時間長鎖脂肪酸処理による膵β細胞でのインスリン分泌亢進の分子機構の解析

まず、既知のパルミチル化蛋白であるSNAP 25及びそのパルミチル化部位を欠損した変異SNAP25の発現ベクターを作製し、COS-1細胞に高発現させた。その細胞抽出液をABE法にて処理し、原法から蛋白沈殿法等を改良してパルミチル化SNAP 25のみを回収可能な実験系を確立した。

次にヒト由来HEK293細胞を用いてパルミチル化蛋白の同定を試みた。COS-1細胞にて確立した方法で精製した蛋白を1D-PAGEにて分離し、ゲルをSYPRO Rubyにて染色した結果では、パルミチル化蛋白か由来ではない非特異的なバンドが多数観察された。ところが、グラディエントゲルでの泳動等を行うことによって、パルミチル化蛋白に固有なバンドを数本得ることができた。これらのバンドを切り出してトリプシン消化後に抽出したペプチドをLC-MS/MSにて解析することによって、数個のパルミチル化蛋白の候補を同定することができた。

・アディポネクチン・シグナル伝達機構の解析

大腸菌に発現させたリコンビナント・アディポネクチンをニッケルビーズにて精製した。我々の実験系では市販品と異なり、高活性アディポネクチンのコンスタントな作製が可能であった。このリコンビナント・アディポネクチンにてHepG2細胞を処理し、アディポネクチンと同様にAMPKを活性化させる薬剤であるメトホルミンをコントロールして、それぞれで刺激した。予備的な解析結果では、24時間刺激にてメトホルミンと比較してアディポネクチン処理にて変動する蛋白スポット数個を認め、解析中である。また、我々が作製したリコンビナント・アディポネクチンが非編成条件での泳動で低分子量であったにもかかわらず、AMPKリン酸化を指標として判定した範囲では高活性であったため、この蛋白のglycation等について解析中である。

D. 考察

I: インスリン・シグナル伝達

今回我々は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、有意に変動する50個以上の蛋白を同定したが、これらの蛋白の多くは細胞骨格、RNA代謝、翻訳調節に関与する蛋白であった。これらの蛋白の中でhnRNP K、TCTP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、後者についてはIRS3高発現により阻害される核内に固有なIRSを介したシグナルであることが示唆された。今後、IRSあるいは細胞周期を制御する分子との相互作用、インスリン依存性の翻訳後修飾の変化等について解析し、インスリンによる細胞増殖への意義を検証する必要がある。

II: インスリン抵抗性

我々は短時間の脂肪酸曝露によるインスリン分泌促進のターゲット蛋白を同定すること目的として、ABE法による培養細胞でのパルミチル化蛋白精製法を確立し、人由来HEK293細胞株にてパルミチル化蛋白を同定した。現時点でHEK293細胞にて同定された蛋白は数個にとどまるが、2D-PAGE、2D LC-MS/MS等の方法を組み合わせてパルミチル化蛋白を分離することによって、より多数の蛋白の同定を試みる。パルミチル化によるインスリン分泌促進については、最近パルミチル酸をリガンドとするG蛋白結合受容体(GPR40)の存在が報告されている。ところが、アシル化阻害剤のCeruleninがグルコース応答性のインスリン分泌刺激作用を抑制することから、GPR40以外にパルミチル化されてインスリン分泌を制御する蛋白の存在が示唆されている。今回確立したパルミチル化精製法を用いて、今後膵β細胞株からパルミチル化蛋白を網羅的に同定することは、2型糖尿病の成因解明や新たな糖尿病治療薬の開発へとつながることが期待される。

・アディポネクチン・シグナル伝達機構の解析

今回のアディポネクチン刺激肝細胞株の解析にて、同様にAMPKを活性化させるアディポネクチンとメトホルミンでは異なる蛋白発現プロファイルを呈することから、アディポネクチンに固有なシグナル伝達経路の存在が示唆された。今後、これらのアディポネクチン・シグナル伝達蛋白を同定することにより、インスリン抵抗性の新たな分子ターゲットが発見される可能性がある。また、我々の確立した系では大腸菌を用いて高活性のアディポネクチン合成が可能であったため、培養細胞等を用いない安価で簡便なアディポネクチン合成法として有用と考える。

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、インスリン作用あるいはアディポネクチ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* (2007) 32: 69-78

総説

鏑木康志 脂肪細胞におけるインスリン作用 カラー版 糖尿病学 基礎と臨床 からだの科学 西村書店、145-148, 2007

学会発表

山下亮:ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用、第3回メタボリズムネットワーク研究会、ポスター発表、2007年3月、大磯

山下亮、井狩高平、安田和基、関原久彦、鏑木康志:ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用、第80回の日本内分泌学会学術総会、ポスター発表、2007年6月、東京

浜田圭子、山下亮、井狩高平、安田和基、鏑木康志: IRS 高発現 CHO 細胞の核抽出液でのプロテオーム解析、日本ヒトプロテオーム機構第5回大会、ポスター発表、2007年7月、東京

山下亮、井狩高平、安田和基、鏑木康志:ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用、第30回日本分子生物学会・第8回日本生化学

合同大会、口演&ポスター発表、2007年12月、横浜

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（創薬基盤推進研究事業）
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間葉系細胞に Pdx1 を一過性あるいは持続性に発現させたところ、Pax4 と Pax6 の遺伝子発現が見られたので、今年度は脂肪組織由来の培養細胞においてテトラサイクリンによって Pdx1 の発現量をコントロールできる系を作成した。1 型糖尿病モデルとして STZ 障害性マウスに、脂肪由来の Pdx1 を持続発現する細胞を移植したところ、血糖降下作用がみられた。また脂肪由来の間葉系細胞にアクチビンを追加して内胚葉系への分化を検討したところ、高濃度において Pdx1 の発現がみられた。

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。

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。

テトラサイクリンによる Tet-off の系を構築するために GFP マウス由来のソケイ部から皮下脂肪を採取し、ヒトと同様に処理して、間葉系幹細胞を培養して継代した。

CD133 陽性細胞の取得と多能性の検討

造血幹細胞や神経幹細胞に発現がみられる CD133 に注目し、皮膚での発現を検討したところ、毛乳頭部に特異的な発現が認めら

れた。そこで抗 CD133 抗体を用いて MACS (磁気ビーズ法) にて陽性細胞を分取した。分化培地にて多能性を検討した。

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。

テトラサイクリンによる発現制御機構を用いたベクターシステムの構築

まず Tet-off のコンストラクト (5'LTR- ϕ -Neo-PCMV-tTA-3'LTR) をもつウイルス (pRevTet-Off) を PT67 細胞に作らせた。GFP マウス由来の脂肪由来幹細胞 (ASC) に感染させて G418 で選択した。

ヒトと野生型マウス用コンストラクトとして Pdx1-IRES-EGFP/pRevTRE (5'LTR- ϕ -Hyg-(tet0)7/PCMV-Pdx1-IRES-EGFP-3'LTR) GFP マウス用コンストラクトとして Pdx1/pRevTRE (5'LTR- ϕ -Hyg-(tet0)7/PCMV-pdx1-3'LTR) を作成した。

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。

ヒト脂肪組織由来の細胞は増殖能にばらつきがみられたため、一部マウス由来の脂肪組織からも細胞を採取した。特に移植用にドナー細胞の区別をしやすい GFP マウスを使用した。マウスは皮下脂肪が少ないのでソケイ部の脂肪を採取した。ヒトと同様にレトロウイルス pMSCV-puro ベクターを脂肪組織由来の細胞に添加した。PCR にて確かに外因性の Pdx1 の発現を確認した。

GFP マウス由来の脂肪由来幹細胞 (ASC) に pRevTet-Off を感染させて G418 で選択した。さらに Pdx1/pRevTRE を感染させて Hygromycin で選択した。コロニーを形成した細胞を回収した。

移植のための病態モデルマウスの作成と移植実験

分担研究者の浜崎らが I 型糖尿病モデルマウスの作成を目指し、C57BL/6 マウスに

100-300 mg/kg のSTZ腹腔内注射をおこなった。血糖値を2-3日おきに測定した。細胞移植実験においては尾静脈から10万-100万個の細胞をゆっくり注入した。

脂肪由来間葉系細胞に対するアクチビンの効果

マウス脂肪由来間葉系細胞にアクチビンを添加した(10 ng/ml と100 ng/ml)。30日間培養した後、RNAを抽出してRT-PCRを施行した。

「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。動物実験は当センターのバイオセーフティー委員会ならびに動物実験委員会の指針に則り、審査の上動物愛護上の配慮をもって行った。

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、内皮細胞の影響が少ないと考えられる3-5代継代した細胞を用いた。

CD133陽性細胞の取得と多能性の検討

CD133陽性細胞は毛周期の影響を受け、成長期に一過性に発現していた。MACSによりCD133陽性細胞を分取し、検討したところ、神経細胞やグリア細胞、平滑筋細胞、脂肪

細胞などに分化することを確認した。

脂肪組織由来の細胞へのPdx1遺伝子導入
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10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。そこで3日間浮遊培養した後、接着培養すると一部の細胞に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Tet-Offの系を確立したが、ヒト細胞の場合は増殖が遅いので、途中からマウスの細胞も使用して、平行して実験を進めた。テトラサイクリンの量と投与期間を検討している段階のため、まだ確定的な結果は得られていない。

移植のための病態モデルマウスの作成と移植実験

STZ 250 mg/kg の処理で最初の処理から5日後には600 mg/dL以上の血糖値を示した。このマウスに、Pdx-1を恒常的に発現する脂肪由来間葉系細胞を10万個から100万個尾静脈から移植したが、2週間の経過中に血糖値の低下傾向は認められなかった。しかし、細胞を移植してから3週間後に血糖値の降下するマウスが出現した。そこで

より Pdx-1 の発現の高い細胞を移植すると移植後、2週間で 2-300 mg/dL 以上の血糖値の降下が認められた (6/8匹)。

脂肪由来間葉系細胞へのアクチビンの効果
アクチビンを添加して30日間培養したにおいてアクチビン10 ng/mlではわずかであったが、100 ng/ml処理では、明らかにPdx-1の発現が認められた。

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。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が、再現性に乏しい結果であった。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。

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。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、ベクターの作成を行った。分化のマーカー遺伝子の検討をしている段階であり、まだ結論的なことはいえない。

Pdx-1 を恒常的に発現する脂肪由来間葉系細胞を移植すると STZ 障害モデルマウスにおいて血糖降下作用がみられた。Pdx-1 の発現レベルによって効果がみられるまでの時間が違うことを確認した。移植細胞が膵臓β細胞になってインスリンを産生したのか、移植細胞の放出した因子の刺激で残存する細胞にポジティブな影響を及ぼしたのかについては今後の検討課題である。今回の結果から細胞移植療法において、必ずしも最終分化した細胞でなくても効果が期待できることが示唆された。

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いる。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し、アンモニアを解毒する細胞への分化を確認している (*Hepatology* 46:219-228, 2007)。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かと思われる。実際にアクチビンを添加しただけで Pdx1 遺伝子の発現が確認されたので、内胚葉への分化転換が生じたのではないかと考えられる。一方、脂肪由来の間葉系幹細胞にアクチビンを添加すると肝臓の細胞への分化が短期間ですすむことも確認しているため、今後アクチビンの効果を生かした治療法につなげられるのではないかと考えている。

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

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た。移植する時点で膵臓β細胞に最終分化していない細胞でも、in vivoにおいて血糖降下作用を期待できる可能性が示された。またアクチビンは脂肪由来の間葉系細胞を内胚葉系の細胞に転換することが示された。

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** 46:219-228, 2007
- 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.** 127:1052-60, 2007
- 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.

学会発表

(国外)

(国内)

- 1) 徳原真、福田沙月、今野雅允、梶山弘光、枝元良広、斉藤幸夫、清水利夫、浜崎辰夫、大河内仁志 肝障害に対する脂肪組織由来幹細胞を用いた細胞治療の検討 第7回日本再生医療学会 3月、名古屋、2008

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

マウス ES 細胞等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： 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膵 β 細胞へと分化誘導を試みた。それらの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効率的な作成、およびそのモデルマウスを用いて、移植部位や移植方法の確立を目指して予備的な移植実験を行った。その結果、腎皮膜下に移植した ES 細胞由来の膵臓組織は、現在のところ若干の効果は得られたものの、病態改善には至らなかった。しかし、尾静脈から注入された脂肪肝細胞由来 *Pdx-1* 導入細胞は、その遺伝子導入量に依存して、糖尿病モデルマウスの血糖値の減少傾向を示すことがわかった。

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産現・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 ES 細胞を用いた研究は、膵臓の β

細胞の誘導に焦点を合わせたものであり、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示唆されている)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移植部位や移植方法を検討した。

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。

病態モデルマウスの作製

I 型糖尿病病態モデルマウスを作成するため streptozotocin (STZ)を 8-12 週齢の C57/BL6,

Balb/c およびヌードマウスにストレプトゾトシン (STZ) 腹腔内投与量と投与回数の検討をした。STZ の 1 回投与量を 100, 200, 250, 300, 400 mg/kg とした。また 50 mg/kg の STZ を複数回に分けて投与した。1 日おきに 6 回、または 100 mg/kg を 3 回投与し、1 日おきに体重および血糖値をワンタッチウルトラ (LifeScan) を用いて測定した。

1 度目の投与で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

移植のための病態モデルマウスの作成

C57/BL6, Balb/c およびヌードマウスに 100, 200 mg/kg の STZ 腹腔内注射をおこなったところ、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+100+100 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。しかし、この量では十分なモデルは得られないと考え、1 回処理の量を 250, 300

および 400 mg/kg 投与したところ、最初の 5 日間で 400-500 mg/dL の血糖値に達する事がわかった。しかし、400 mg/kg の STZ 処理したものは殆ど投与後、数日間で死亡 (n=8/10) し、また 300 mg/kg 投与したものは、糖尿病自然発症 AKITA マウスと比較して、毛並みも良くなく、明らかに活動性を欠くものも観察されたため、C57/BL6 マウスでは、250 mg/kg の STZ 処理が最適であり、Balb/c およびヌードマウスでは 300 mg/kg の STZ 投与で、安定して (90% 以上の効率で) 高血糖の糖尿病モデルマウスが得られることが分かった。膵臓組織を STZ 処理 14 日後調べてみると、膵島細胞は、全く観察できず STZ 処理により β 細胞は勿論のこと、内分泌系の細胞はほぼ壊滅していることが確認できた。

移植実験

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 コロニーずつ腹腔内に移植した群では、移植直後の 4-8 日間の間、短期的に血糖値の低下が認められた。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、高血糖状態に戻ってしまうことが分かった。

一方、*Pdx-1* 遺伝子を導入したマウス脂肪

細胞を尾静脈から投与(1×10^5 細胞)した場合、投与後 3 週間は高血糖値 600 弱または 600 mg/dL 以上を示したが、それ以降は若干の減少傾向を示し、それが 2 週間以上持続した。更に、*Pdx-1* 遺伝子発現の強い脂肪前駆細胞を、細胞数を増やして(5×10^5 細胞)尾静脈より注入した個体では、移植後 10-12 日後に血糖値の低下傾向が認められた。

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に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。

本実験において予備的な移植実験を行った結果、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場合、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、C57/BL6、Balb/c および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、1 回投与で 90%以上のマウスが目標である 400 mg/dL の高血糖値を示し、大部分は 10 – 15 日後には検出限界濃度である 600 mg/dL 以上血糖値を示した。この結果、安定して糖尿病モデルマウスの作成が可能となったため 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。予備的な実験結果ではあるが、*Pdx-1* 遺伝子導入した脂肪前駆細胞

胞をこのモデルマウス移植した結果、遺伝子導入していない脂肪前駆細胞移植群と比べて移植後 3 週間と時間はかかるものの、血糖値の減少傾向が認められたことは意味のある結果であると考えられる。更に、*Pdx-1* 遺伝子発現を強化した脂肪前駆細胞を移植した場合、移植後約 10 日目にこの傾向が認められたため、この現象が何を意味するのか検証して行きたいと考えている。

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進展させて、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。

これらの実験事実を踏まえて、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、臨床的な見地から脂肪前駆細胞を含む組織幹細胞から誘導されたβ細胞や誘導途中の細胞を、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

Kuwano Y, Fujimoto M, Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Komine M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H. (2007)

The involvement of Gab1 and PI 3-kinase in beta1 integrin signaling in keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 361(1): 224-229.

Osada A, Iwabuchi T, Kishimoto J, Hamazaki TS, Okochi H. (2007)

Long-term culture of mouse vibrissal dermal papilla cells and de novo hair follicle induction. *Tissue Eng.* 13(5): 975-982.

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):1-11.

Ito Y, Hamazaki TS, Ohnuma K, Tamaki K,