

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

慢性疾患としての糖尿病の病期に注目した 病態の解析と、新たな診断・治療法の探索

平成17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 安田和基

平成20（2008）年3月

目 次

I. 総合研究報告	
慢性疾患としての糖尿病の病期に注目した病態の解析と、 新たな診断・治療法の探索 安田 和基	1
研究要旨	1
A. 研究目的	2
B. 研究方法	4
C. 研究結果	20
[1] 環境因子の分子メカニズムと糖尿病の効果的予防・治療法に関する研究	20
[2] 膵内分泌細胞の代償とその破綻の分子機序に関する研究	23
[3] 血管内皮細胞を標的とした糖尿病合併症の研究	33
[4] 個体レベルでの画期的な診断マーカーの開発研究	35
説明図	39
D. 考察	51
E. 結論	56
F. 健康危険情報	56
G. 研究発表	56
H. 知的所有権の出願・登録状況	72
II. 研究成果の刊行に関する一覧	73

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成17年度～19年度 総合研究報告書

**慢性疾患としての糖尿病の病期に注目した病態の解析と、
新たな診断・治療法の探索**

主任研究者 安田 和基 国立国際医療センター研究所・部長

研究要旨：糖尿病の発症・進展は、長い慢性の経過をたどるが、その間に生体内で生じている現象には未知の点が多い。本研究では、世界でもユニークな解析系を導入し、糖尿病の発症・進展の中でも、これまで特に解析が遅れていたA「環境因子の分子メカニズム」、B「膵代償機序とその破綻」、C「合併症」の3点に注目して解析を進めている。

Aについては、運動の抗肥満効果・代謝改善機序を発生工学的手法を用いて分子レベルで解明し、AMP キナーゼを介する作用と介さない作用があること、 β 受容体を介した交感神経作用が重要であること、などを見いだした。高脂肪摂取及び高スクロース（砂糖）摂取により生じる脂肪肝の、病態や治療方法の違い等、網羅的発現解析などで食事内容の効果の違いを解明した。またプロテオーム解析の手法を用いてインスリン・シグナル伝達経路に関与する新規の蛋白の同定を試みた。

Bについては、『量的代償』の立場から、膵 β 細胞の発生・分化・増殖について、膵発生の初期段階から、組織幹細胞まで、さまざまな分化系を構築し、分化条件や関与する分子の網羅的検索を行い、多くの新規分子を得た。対象としたのは、マウス ES 細胞からの膵分化系、アフリカツメガエル胚からの膵分化系、膵組織幹細胞候補としての SP(side population)細胞などである。また他臓器由来幹細胞からインスリン産生細胞を作製する試みをおこない、糖尿病動物への予備的な移植実験にて、部分的ながら血糖改善効果がみられるなど、将来的に治療目的に自己由来細胞を膵 β 細胞供給源とする可能性を開いた。一方『質的代償』の立場からは、脂肪酸による脂肪毒性モデルの分子解析をおこなったほか、保たれるべき『質』として、高度に分化した膵 β 細胞の分子基盤を解析した。具体的には、完全長 cDNA ライブラリーを作製して、転写開始点や新規転写産物の解析をおこない、機能的な全く新規の non-coding RNA 候補を同定した。また成熟した β 細胞の指標である「グルコース反応性インスリン分泌」を獲得してゆく生理的な系を確立し、網羅的解析からこの過程に関わる新規の機能分子を多数同定した。

Cでは、種々の臓器由来のヒト血管内皮初代培養細胞を用いて糖毒性の系の網羅的解析をおこない、内皮障害に関与する多くの分子を同定するとともに、霊長類 ES 細胞からの血管内皮分化系を確立した。また、網膜症に関与する可能性が高い新規候補分子を同定した。

これらを統合する「個体レベルでの解析系」として、新規動物モデル（Sendai ラット）の病態解析、網羅的発現解析及び量的遺伝子座(QTL)解析を行った。このラットは、肥満を伴わず、早期か

らインスリン低下型を示すため、日本人型の糖尿病にきわめて近い性質をもつことがわかった。またゲノム、蛋白（血清など）、臨床情報などを完備し、重層的な解析を可能にするヒト臨床パネルを構築した。

以上、本研究にて、診断・治療の標的となりうる多くのシーズや、有用な創薬スクリーニング系を得ている。今後、これらの成果が、成因と病期に基づく、糖尿病の真のオーダーメイド医療の実現に役立てられることを期待する。

分担研究者

<国立国際医療センター研究所>

代謝疾患研究部室長 鏑木 康志

細胞組織再生医学部長 大河内 仁志

細胞修飾生態反応研究室長 浜崎 辰夫

血液疾患研究部長 湯尾 明

ヒト型動物開発研究室長 岡村 匡史

<国立健康・栄養研究所>

基礎栄養プロジェクトリーダー 江崎 治

<東京大学>

大学院総合文化研究科教授 浅島 誠

A. 研究目的

糖尿病は生活習慣の西洋化に伴い日本でも急増しており、「予備軍」を含めると1,500万人以上と推定されている。無症状のまま経過することが多いので、患者の3分の2ほどは病院にて治療をうけていないと推定されるが、薬物反応性や病期、進行のスピードも患者により異なり、現時点では良好な血糖コントロールを得るには専門医でも試行錯誤を必要とする。その結果、さまざまな合併症を生じ、たとえば、年間4,000人が新たに失明し、1.2~1.3万人が

新たに透析導入を受け、それぞれ後天的失明や透析導入の原因の第1位である。また虚血性心疾患や脳卒中など動脈硬化性疾患の発症リスクも高く、糖尿病患者の平均寿命は非糖尿病患者に比し、約10~13年短いとされる。このように糖尿病は生命予後やQOLに大きく影響するだけでなく、医療経済上も大きな問題となっている。したがって、糖尿病の進展予防、合併症の早期診断・画期的な治療法の確立が急務とされる。

糖尿病の特徴の1つは、生活習慣病の中でもその病像が多彩で、しかもきわめて長い経過を経て発症・進展し病態が変遷してゆくことである。すなわち糖尿病は、「成因」に遺伝的側面、環境因子の双方が強く関与し、かつ同一個人でも「病期」により全くことなる臨床像、治療反応性を示す。しかしながら、その数年~数十年に及ぶ長い経過の間に生じている病態については、最も重要なテーマであるにもかかわらず不明の点が多い。

本研究では、これまで進められてきた、ミレニアムプロジェクト、メディカルフロンティア、プロテオームファクトリーなど

の研究の成果や方法論を基盤として、新たな独自の解析系を導入し、こうした慢性の経過で生じている現象を解明する。またこれらの成果を統合して、糖尿病の病態に対する画期的な診断／治療法の開発に役立つ。

こうした目的に対し、本研究の特徴は、
① 先行するゲノム・ポストゲノムの大型研究（具体的にはメディカルフロンティア（以下 MF-4）、ミレニアムゲノムプロジェクト（以下 MPJ-4）、プロテオームファクトリー（以下 PF）、など）をふまえた、糖尿病病態解析の研究成果を活用し、
② ES 細胞からの分化系、独自の解析モデルを中心とした、世界でもユニークな研究リソースを集結し、
③ 分子から組織、個体レベルさらに臨床検体までの統合研究プラットフォームを利用して解析することである。

具体的には、国立国際医療センター及び独立行政法人国立健康・栄養研究所（以下 栄養研）で、糖尿病を専門として長年研究を続けてきたグループに、再生医学や血液学、実験動物学などの専門家、及びアクチビンの生理作用の解明などで長年世界の発生研究をリードしている東大浅島教授らのグループ、を加えて、多面的なアプローチをおこなう。

近年糖尿病患者数が 50 倍にも増加した事実は、「環境因子」の効果の大きさを示すものであり、その作用メカニズムの解明は急務である。またインスリン抵抗性に対

する膵β細胞の「代償とその破綻、進行性の機能低下」は糖尿病進展の根本であるにもかかわらず、メカニズムは不明であり、有効な診断治療法は全くない。さらに高血糖を中心とした長い経過において、細小血管障害を中心としたさまざまな「合併症」を生ずるが、無症状で経過する過程での確かな病期や予後診断は難しく、またその詳しい発生メカニズムもほとんど不明である（図 1）。

本研究はこのように糖尿病の病態の中でも特に慢性の経過の中で生じている現象のうち、上記 3 点に特に注目し、その発症進展のメカニズムに、ユニークなアッセイ系をもとに切り込む。さらにその成果から「病期」に注目した画期的な診断・治療法の開発を目指すものである。

これらにより、「成因」「病期」の両面から糖尿病患者をとらえることで、真のオーダーメイド医療を実現することが、目標である。

B. 研究方法

先に述べたように、糖尿病の発症・進展の中でも、これまで特に解析が遅れていたA「環境因子の分子メカニズム」、B「膵代償機序とその破綻」、C「合併症」の3点に注目して、世界でもユニークな解析系を導入してその分子機序に迫ろうとしている。

以下に、研究体制と研究方法を示す。

<研究体制と分担> (図2)

各研究分担者が担当した主な研究課題は、下記のようなものである。

《国立国際医療センター研究所》

代謝疾患研究部長 安田和基（主任研究者）：「研究の統括、インスリン分泌細胞の機能・分化増殖に関する研究、糖尿病網膜症に関わる新規分子の探索、および統合的解析のための臨床パネルの構築」

病態代謝研究室長 鎚木康志：「インスリン・シグナル伝達のプロテオーム解析」

細胞組織再生医学部長 大河内仁志：「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」

細胞修飾生態反応研究室長 浜崎辰夫：「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」

血液疾患研究部長 湯尾明：「ヒト血管内皮細胞、及び霊長類ES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」

ヒト型動物開発研究室長 岡村匡史：「糖尿病モデルを用いた個体レベルの

病態解析」

《独立行政法人国立健康・栄養研究所》

基礎栄養プロジェクトリーダー 江崎治：「モデル系を用いた環境要因の分子メカニズムについての解析」

《東京大学大学院総合文化研究科教授》

浅島誠：「膵臓形成に関する新規遺伝子群のクローニングと解析」

ただし、たとえば分担研究者が構築した解析モデル系について、安田がAffymetrixのGeneChipシステムで解析をおこなうなど、各課題について可能な限り手技や手法を共有し、協力して解析を行っている。

<研究方法の概略>

[1] 環境因子の分子メカニズムと糖尿病の効果的予防・治療法に関する研究

(1) 環境因子の中でも特に運動(不足)、食事(高脂肪食、高炭水化物食)、に注目し、個体モデルを用いて、それぞれ筋の糖取り込みやエネルギー代謝に関わる遺伝子発現変化、シグナル伝達関連タンパクの発現及び翻訳後修飾の変化を中心に糖脂質代謝・インスリン感受性変化の分子メカニズムを解明する(江崎)。

(2) インスリン作用の分子機序について、とくにIRS(インスリン受容体基質)タンパクのアイソフォーム特異的な作用や細胞内局在に注目し、主にプロテオーム解析の手法により重要な分子を同定する(鎚木)。

[2] 膵内分泌細胞の代償とその破綻の分子機序に関する研究

『量的代償』については、生理的な膵β細胞の増殖分化を再現するさまざまな細胞系を作成し、分子基盤を検討する（下記1、2、3）とともに、他臓器由来幹細胞から、治療目的で膵β細胞を補充できる系を作成する（下記4）。『質的代償』に関しては、脂肪酸がβ細胞機能へ与える影響を分子レベルで解析する（下記5）とともに、「質」を保つ基盤となる高度に分化した膵β細胞の分子基盤を、独自の系で解析する（下記6、7）。

（1）マウスES細胞からのin vitro膵分化系を確立し、その分子機序について解析する（浜崎）。

（2）アフリカツメガエル胚からの膵分化系を確立し、独自に作成したマイクロアレイを用いて発現遺伝子プロファイル解析をおこない、膵初期発生に重要な新規分子を同定する。特徴的なパターンを示した遺伝子について、whole mount in situ hybridizationを行う（浅島）。

（3）膵組織由来の幹細胞、内分泌前駆細胞として、新生仔ブタ膵由来 SP(side population)細胞を単離し、その分子基盤を解析するとともに、内分泌細胞への分化条件を検討する（安田）。

（4）皮膚の真皮や脂肪組織の細胞の可塑性に注目し、膵内分泌細胞へ分化させ、治療目的での膵β細胞の供給源となりうるかどうかを検討する。（大河内）。

（5）脂肪酸が膵β細胞機能に与える効果（特に脂肪毒性の系）をプロテオーム解析

の手法で検討する（鍋木、安田）。

（6）新生仔ブタ膵由来細胞を用いて in vitro でグルコース反応性インスリン分泌を獲得する系を作成し、膵β細胞の機能的成熟に関与する分子を同定する（安田）。

（7）膵β細胞由来完全長 cDNA ライブラリーを作成し、高度に分化した膵β細胞の転写調節の分子基盤を解明する（安田）。

[3] 血管内皮細胞を標的とした糖尿病合併症の研究

（1）様々な臓器由来のヒト血管内皮細胞を用い、高濃度グルコースなどによる細胞内の変化を解析し、糖尿病細小血管障害における内皮細胞の障害モデルを構築して、責任分子を同定する（湯尾）。

（2）また独自に開発した霊長類ES細胞からの血管内皮細胞分化系についても、分子的に解析する（湯尾）。

（3）糖尿病網膜症に関与する新規の候補分子を同定する。具体的には、網膜色素上皮細胞に注目し、高グルコース濃度で発現が調節される分子の網羅的解析を行い、血管新生促進活性を指標に、病態に寄与する新規な候補分子を同定する（安田）。

[4] 個体レベルでの画期的な病期診断マーカーの開発研究

（1）日本人に糖尿病に類似した、新規非肥満糖尿病モデルSendaiラットについて、個体レベル、臓器レベル、および膵ラ氏島のレベルで経時的に詳しく解析する（岡村）。

（2）2型糖尿病の「病期／ステージ」を

個体レベルで解析するために、患者ゲノム
および血清および詳しい臨床情報をあわ
せ持った統合的なパネルを構築する（安
田）。

<研究方法の詳細>

[1] 環境因子の分子メカニズムと糖尿病の効果的予防・治療法に関する研究

(1) 個体モデルを用いた環境因子の分子メカニズムの解明 (江崎)

1-1-A 運動の肥満およびインスリン抵抗性抑制作用への骨格筋 AMPK (AMP キナーゼ) の役割

骨格筋の AMPK 活性を抑制した AMPK-DN マウスを用いて、運動トレーニングの肥満・糖尿病予防効果 (慢性効果) への AMP キナーゼの役割について検討した。野生型と AMPK-DN マウス (C line と E line) にそれぞれ、脂肪エネルギー比 56.7% の高脂肪食を 1 ヶ月間与えて肥満にし、さらに 1 ヶ月以上の間、高脂肪食を与えながら、回転かごで飼育 (running) または 30 分間の水泳を 1 日 1 回 (swimming) の 2 種類の「運動をさせる群」と、特に運動を強くない「安静群」に分けて、体重変化、体脂肪率、脂肪組織重量や、インスリン抵抗性 (経口糖負荷試験、インスリントレランス試験) などを指標に運動の効果について調べた。コントロールには高炭水化物食を与えた「安静群」マウスを用いた。

1-1-B 運動による骨格筋での PGC-1 α 発現増加機序の解析

運動による PGC-1 α 発現増加に交感神経系の興奮が関与しているのか調べた。マウスに、 β 2 受容体刺激薬の clenbuterol を皮下投与し、投与 4 時間後の骨格筋での PGC-1 α 発現量を調べた。また、マウスに

β 受容体遮断薬の propranolol を皮下投与し、投与 1 時間後よりトレッドミル運動を 45 分間させ、運動終了 0, 3, 6, 9 時間後の骨格筋における PGC-1 α 発現量を調べた。また、 β 1, 2, 3 受容体ノックアウトマウス (β レスマウス) に運動を 45 分間させた。それぞれの群に対するコントロールマウスを同じトレッドミル上で走らせ、運動終了 3 時間後に骨格筋における PGC-1 α 発現量を調べた。

1-1-C 高スクロース摂取及び高脂肪食による脂肪肝に対する 10en% 魚油の効果

マウス (♂、7 週齢) をスターチ食 (10en% 脂肪 (全てサフラワー油) を含むエサ、飲み物は水) の「コントロール群」; 「高スクロース食群」 (10en% 脂肪 (全てサフラワー油) を含むエサ、20% スクロース水); 「高脂肪食群」 (60en% 脂肪 (全てサフラワー油) を含むエサ、飲み物は水) の 3 群に分け、それぞれに対し、10en% 魚油を添加した群、添加しない群、合計 6 群を設定し、11 週間飼育した。体重や種々の血中濃度、各組織重量や遺伝子発現量 (特に肝臓での SREBP1c、PPAR γ 、PPAR α 及びそれらの target 遺伝子) について調べた。

1-1-D 運動の肥満抑制作用への交感神経系の役割

8 週齢の雄性野生型と β レスマウスにそれぞれ、高脂肪食 (脂肪エネルギー比 57%) を与えながら、「運動トレーニングをさせる群 (運動群)」と特に運動を強くない「安静群」に分けて、体重変化、体組成変化、

脂肪組織重量などを測定した。また、各群マウスについてエアタイトトレッドミルを用い、1回の運動時の酸素消費量と二酸化炭素排出量を間接カロリーメトリー法により測定し、呼吸商を算出した。一回の運動時の脂肪組織での脂肪分解の程度を調べるため、運動直後の血中 FFA と glycerol の濃度を測定した。

1-1-E 骨格筋で GLUT4 の発現を増加させる薬剤の検討

臨床でよく使用されている PPAR α 活性化剤、fenofibrate を各種濃度で1週間（濃度依存性）、0.5% (wt/wt) の濃度で投与期間（期間依存性）を変えてマウスに投与し、筋肉で GLUT4 発現量を測定した。0.5% (wt/wt) の濃度で1週間投与後、経口糖負荷テスト、インスリン感受性試験を行った。他の PPAR α 活性化剤の効果、PPAR α ノックアウトマウスでの効果も検討した。

(2) インスリン作用のプロテオーム解析（錦木）。

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探索を、インスリン受容体チロシン・キナーゼの基質である IRS と相互作用する蛋白 (A)、IRS 高発現が核内での発現に影響を与える蛋白 (B)、IRS のインスリン刺激前後での翻訳後修飾 (C)、アディポネクチン処理した HepG2 細胞 (D)、について行

う。(A) については、既に作製済みの IRS 高発現肝細胞を用いて IRS-1, IRS-2 と相互作用する蛋白を pull-down 法により網羅的に解析する。(B) については、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、蛋白プロファイルの 2D-DIGE による二次元電気泳動ゲル上のディファレンシャル解析を行い、有意な変化を有する蛋白を LC-MS にて同定する。

(C) については、多次元 LC-MS/MS を用いたリン酸化、グリケーション等の翻訳後修飾を受けたペプチドの解析する系を確立し、IRS のインスリン刺激前後での翻訳後修飾を網羅的に解析する。(D) については、同様に AMP キナーゼ活性化を生じるアディポネクチンとメトフォルミン（ビグアナイド剤）で比較する。

[2] 膵内分泌細胞の代償とその破綻の分子機序に関する研究

(1) マウス ES 細胞からの in vitro 膵分化系確立と、その分子機序の解析（浜崎）。近年、マウス ES 細胞からインスリンを発現・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、ごく限定的である。ある。本研究では、ES 細胞から形成し

た胚様体様凝集塊 (embryoid body-like spheres, 以下 EBSs) をレチノイン酸とアクチビンで処理することによって、膵臓のβ細胞単独ではなく、膵臓組織や器官への分化誘導の可能性を検討した。

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 等を添加した DMEM (high glucose, with L-glutamine, with pyruvate, GIBCO 11995-065) 中で培養し、3 日後、ES 細胞のコロニーをフィーダー細胞上から浮遊させて EBSs を形成させ、15 % KnockOut Serum Replacement (KSR, GIBCO) を添加した DMEM 中で浮遊培養した。4 日後から 15 % KSR およびアクチビン A (10, 25, 50 or 100 ng/ml と all-*trans* レチノイン酸 (RA) (0.1 or 1 mM) (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。

免疫染色および顕微鏡観察

4 % パラホルムアルデヒド溶液で固定し、LR Gold Resin System (Structure probe) を用いて包埋し、切片を作製した。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 Fluor 488、および Alexa Fluor 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。

(なお、電子顕微鏡による観察の試料処理については省略する)

RT-PCR

EBSs から ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出し、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いて cDNA を合成して以下の遺伝子について RT-PCR を行った [Amylase 2、Glucagon、insulin II、Pdx1、Shh、GAPDH]。

Real-time PCR

Real time PCR は QuantiTect™ SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN) と ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector (Perkin Elmer) を使用して、以下の遺伝子についておこなった。 [Amylase 2、insulin II、IPF-1/Pdx-1、Ptfla、Sonic Hedgehog、GAPDH]

病態モデルマウスの作製および移植実験

1 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。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、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、インスリン欠乏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、1-2 日おきに尾の先端から血液を採取して血糖値の変化を観察した。

(2) アフリカツメガエル胚からの膵分化系の解析 (浅島)。

1. 器官誘導実験に用いるツメガエル初期胚由来の細胞群

膵臓組織を誘導するためのもとなる組織としては、ツメガエル (*Xenopus laevis*) の中期胚から外科的手法により取り出した外胚葉片 (いわゆるアニマルキャップ) を用いた。

2. アニマルキャップの各種誘導因子による処理

胚から切除したアニマルキャップは、実験に応じて誘導因子で処理した。具体的には、中胚葉誘導因子アクチビン、あるいは後方化因子として広く知られているビタミン A 誘導体レチノイン酸を含むスタインバーグ氏液 (生理食塩水) 中で室温、適当な時間培養した。リチウム処理に関しては、胚を 32 細胞期に 0.3M 塩化リチウム / 100% スタインバーグ氏液で 8 分間処理することでこれを行なった。

3. 細胞形態の評価

誘導された組織の形態に関しては、培養したアニマルキャップを薄切し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を施した後顕微鏡下で観察した。

4. 遺伝子発現のモニター

膵臓が誘導されたアニマルキャップ 20 個程度から totalRNA を抽出し、cDNA を合成した。これをテンプレートに用い、膵臓特異的な遺伝子の発現を PCR 法によって、解析した。

5. 膵臓特異的な新規遺伝子の単離

(a) ディファレンシャルスクリーニング

前述の系を用いて誘導した膵臓組織から mRNA を抽出した。cDNA は SMART PCR cDNA 合成キット (invitrogen) により行い、cDNA ライブラリーを構築した。プローブはサブトラクション法により、膵臓誘導条件から膵臓非誘導条件のものを差し引いたものを準備し、ハイブリダイゼーションにより上記 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによって目的クローンを単離した。

(b) マイクロアレイ

マイクロアレイはアジレント・テクノロジー社のマイクロアレイシステムを使用した。マイクロアレイは、当研究室で作成したツメガエル 8K、あるいは 22K スポットのものを使用した。

膵臓誘導条件、あるいは非誘導条件のアニマルキャップからそれぞれ RNA を抽出し、Cy3, Cy5 でラベリングした cRNA を合成し、ターゲット RNA を作成した。これを用い、

ハイブリダイズ・洗浄を行い、陽性スポットを解析した。

6. 単離した新規遺伝子の発現領域解析

単離した新規遺伝子は、genbank 等の配列情報を元に PCR クローニング等の方法によって DNA 断片を得た。さらに、遺伝子の空間的な発現パターンを調べるため、プラスミドに連結後、ディゴキシジェニンラベルされたアンチセンス RNA を SP6, T3, T7RNA ポリメラーゼを用いて in vitro 合成し、これをプローブに用いて in situ ハイブリダイゼーションを行った。

7. 初期胚へのマイクロインジェクション

インジェクションすべき mRNA は、対応するプラスミドを鋳型に用いて in vitro 転写により合成した。これらを、ツメガエル胚の 4 細胞期にマイクロインジェクターを用いて注入し、必要な時期まで培養した。

(3) 膵内分泌前駆細胞候補としての新生仔ブタ膵由来 SP (side population) 細胞の解析 (安田)。

2-3-A. 新生仔ブタ膵由来 SP 細胞の単離

近年、Hoechst33342 色素の高排出能を指標として分離される SP (side population) 細胞群に、多分化能を有する組織幹細胞が多く含まれると報告され、抗体を用いない簡便で高効率な幹細胞回収法として注目されている。そこで、新生仔ブタ(生後 3 日以内)膵から、SP 細胞を回収してその性質を検討した。具体的には、リベラーゼ、

および Histopaque 1077 を用いた密度勾配遠心をかけて得られた、内分泌細胞が豊富な集団から、セルソーターを用いて SP 細胞を得て回収した。Hoechst33342 色素の濃度やインキュベーション時間も最適条件を検討し、SP 細胞の判断基準の一つである、Verapamil 処理によりその集団が消えるかどうかも検討した。回収した SP 細胞は、1 コもしくは数十コずつ、何種類かのコーティングされた培養プレートにまき、DMEM/F-12 (1:1) 混液をベースとした培養液中で培養を行った。

2-3-B. SP 細胞の分化、増殖の検討

SP 細胞について、20 個ずつ、あるいは単一細胞の状態での長期培養を試みた。また、さまざまな増殖因子や化合物 (EGF、bFGF、activin A、betacellulin、GLP-1、HGF、IGF-I、retinoic acid、nicotinamide、forskolin など) を添加した条件や、コーティング素材の異なるプレートを用いて、ホルモン産生内分泌細胞への分化条件を検討した。ホルモンあるいは内分泌系転写因子マーカーなどについて、ブタプライマーを用いた RT-PCR を用いて発現を検討した。また、後述する GeneChip の結果をもとに、SP 細胞について、培養条件を工夫することにより、ホルモン産生内分泌細胞以外への分化の可能性を検討した。

2-3-C. SP 細胞の網羅的な遺伝子発現解析

SP 細胞、ソーティングにかけなかった non-SP 細胞、および培養 SP 細胞からそれぞれ RNA を抽出したのち、T7 による増幅反

応を利用した two-cycle labeling kit を用いて cRNA プローブを作製し、Affymetrix 社の GeneChip システムを用いて、Porcine Genome Array (約 23,250 コのブタ転写産物を含む) にて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(4) 可塑性を持つ他組織由来細胞による、膵内分泌細胞への分化の検討 (大河内)。

皮膚の真皮と脂肪組織に間葉系幹細胞の存在が示唆されているので、幹細胞の分離を行い、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。

皮膚から多能性幹細胞の分離・培養

術前に承諾の得られたヒト臍出皮膚 (n=5, 40-75歳) およびマウス (CD57BL/6J) の皮膚を用いた。皮膚は細切し、トリプシン処理を経たのち中和し、フィルター濾過、遠心ののち回収した。培養には 2% B27 supplement を含む DMEM/F12 培地を使用し、表皮細胞増殖因子 (epidermal growth factor:EGF) を最終濃度 20ng/ml、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor:bFGF) を 10ng/ml となるように添加し、浮遊系培養皿で 2 週間培養した。スフェアの形成数およびスフェア 1 個当たりの大きさを検討した。

また、幹細胞マーカー CD133 に注目し、抗 CD133 抗体を用いて MACS により細胞を分取し、後述と同様に分化能を検討した。

脂肪組織から多能性幹細胞の分離・培養

脂肪組織はコラゲナーゼ処理を行い、遠心すると脂肪細胞は浮遊するので沈殿分画の間葉系幹細胞を分離した。まず FBS 添加 DMEM 培地で T25, T75 の培養皿に培養した。1-3 回継代後、前述の無血清培地で sphere を形成させた。

分化条件下における分化マーカーの検討

形成したスフェアを、EGF、bFGF を除いた 1%ウシ血清を含む DMEM/F12 培地で 1-2 週間培養して分化を誘導し、ニューロンのマーカーの β III Tubulin、MAP2、平滑筋のマーカーの α SMA、脂肪滴を染色する Oil red O を用いて免疫染色を行い各種抗体の陽性細胞の割合を検討した。脂肪由来の幹細胞に対しては市販の骨芽細胞誘導培地や脂肪細胞誘導培地を用いた。

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。

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、chicken beta-actin promoter をもつ別の発現ベクター pCAG-cHA-IP (丹羽仁史先生より提供) に組み込んで、pCAG-Pdx1 プラスミドを作成した。組み換え体はアデノウイルスまたはレトロウイルス発現ベクター (pMSCV) に組み込み、細胞へ導入後は puromycin 耐性による選別を行った。

なお、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も構築したが、本研究期間では予備的データにとどまっているので省略する。

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。

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。

(5) 脂肪酸の膵 β 細胞に対する効果のプロテオーム解析 (鍋木、安田)

ラット膵 β 細胞株 INS-1 を長鎖飽和脂肪酸 (パルミチン酸) にて短時間、あるいは長時間 (120 時間) 処理することにより、インスリン分泌が促進、あるいはグルコース反応性インスリン分泌の低下 (脂肪毒性) した系を作成する。処理した細胞の total cell lysate, 細胞質分画及びミトコンドリア分画を二次元電気泳動により解析し、長鎖飽和脂肪酸により発現量の変動する蛋白を網羅的に検索する。有意に変動するスポットから LC-MS/MS にて蛋白を同定する。

(6) 膵 β 細胞におけるグルコース反応性インスリン分泌獲得系 (in vitro 成熟系) の解析 (安田)

2-6-A. グルコース反応性インスリン分泌獲得系の構築

一般に新生児の膵 β 細胞は、グルコース反応性インスリン分泌 (以下 GSIS) が十分発達しておらず、生後急速に GSIS を獲得するとされている。そのメカニズムは不明であるが、この「生理的成熟」過程を in vitro で再現できれば、膵 β 細胞機能の分子基盤の解明に役立つと考えられる。生後 24 時間以内の新生仔ブタ膵から得られた内分泌細胞を、10% FBS、10mM nicotinamide を含み、グルコース濃度が 2.8mM (2.8G) または 11.1mM (11.1G) の RPMI 培地で、7 日間培養したのち、インスリン分

泌実験を行った。

2-6-B. GSIS 獲得系の網羅的遺伝子解析

上記の2種類のメEDIUMで培養した新生仔ブタ膵内分泌細胞について、RNAを抽出し、Affymetrix社 GeneChip システムを用いて網羅的な遺伝子発現解析をおこなった。GSIS 獲得系(11.1G)でのみ変化の見られた遺伝子について、ラットホモログの配列から siRNA をデザインした。膵β細胞株 INS-1D 細胞 (Dr Wollheim、及び東京大学関根信夫博士より供与) へ、リポフェクション法により導入した。48時間後に TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法にて遺伝子発現量を定量した。ネガティブコントロール siRNA 投与と比較して当該遺伝子発現のノックダウンが確認できた siRNA について、24穴プレートで改めて細胞に導入し、72時間後にインスリン分泌アッセイをおこない、GSIS への効果を検討した。

(7) 膵β細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの作成と解析 (安田)。

高度に分化した膵β細胞の機能調節の分子基盤を解明するために、INS-1D 細胞から Vector-capping 法 (DNA Res 12:53-62, 2005) にて、完全長 cDNA ライブラリーを作成し、そのクローンの解析を行った。ラット INS-1D 細胞から抽出した total RNA 10 μg から、完全長 cDNA ライブラリーを作成し、ランダムピックした約 1.1 万クローンについて、5'-側 one pass

シーケンス解析を行った。日立ハイテクノロジーズの協力を得て、クローンをクラスタ化したのち、既報の転写産物や転写開始点との比較を行った。

新規クローンのうち、いわゆる polyA 型の「non-coding RNA」(以下 ncRNA)の候補で、in situ hybridization (ISH)にて膵における発現を確認したものについて、それぞれ3種の siRNA をデザインし、INS-1D 細胞でノックダウンを行い、GSIS に及ぼす影響を検討した。

[3] 血管内皮細胞を標的とした糖尿病合併症の研究

(1) ヒト生体由来血管内皮細胞を用いた高濃度グルコースによる内皮細胞障害モデルの解析 (湯尾)

血管内皮細胞は、由来臓器により若干異なる性質を持つことが知られている。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の他に、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞も用いて、できるだけ普遍的な結果を出すように試みた。

5.5 mM(NG)あるいは 30 mM(HG)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5-7日培養した内皮細胞について、細胞内 reactive oxygen species (ROS)、細胞内 GSH を、また細胞の機能について索状構造形成能の測定を行った(詳細は省略)。細胞内 ROS の由来がミトコンドリアか細胞膜

のNADPH オキシダーゼであるかを検討するために、それぞれの阻害剤（前者は CCCP、TTFA、後者は Apocynin）での検討も行った。

（2）霊長類 ES 細胞からの血管内皮細胞分化系（湯尾）。

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。

血管内皮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。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。in vivo 内皮機能としては、コラーゲンプラクアッセイを行った。分化した血管内皮細胞を、honeycomb コラーゲンスポンジに封入して、SCID マウスの腹腔中に移植した。35 日後に、FITC デキストランを尾錠注して、マウス腹腔中の移植部分を取り出して固定し、HE 染色、免疫染色を行った。それぞれ、正立顕微鏡と蛍光顕微鏡により観察して評価した。

（3）糖尿病網膜症に関与する新規の分子の同定（安田）。

3-3-A. 糖尿病網膜症に関与する新規分子探索系の構築

糖尿病網膜症は、特に局所における新生血管が重要であり、血管新生の促進因子と抑制因子のアンバランスが重要と考えられている。今回網膜症に関与する新たな生理活性物質を探索する目的で、網膜色素上皮細胞（Retinal pigment epithelial cell：以下 RPE 細胞）に注目した。RPE 細

胞のモデルとして汎用されているヒト ARPE-19 細胞 (ATCC, No. CRL-2302) を、140mg/dℓ (LG)、315mg/dℓ (HG) と異なる濃度のグルコースを含む DMEM/F12 培地で 48 時間培養した後、その培養上清をヒト網膜血管内皮細胞 (Cell System RE cells, 大日本製薬: Lot RI-181) に添加して、血管新生作用を検討した。具体的には、管腔形成 (BD バイオコートアンギオジェネシス血管内皮細胞 tube 形成アッセイシステム (354149)) を用い、MetaMorph にて定量化して検討した。

3-3-B. 新規網膜血管新生促進活性の同定

Affymetrix 社 GeneChip システム Human Genome U133A, B アレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析により、ARPE-19 細胞において HG 培地で発現が誘導される遺伝子をスクリーニングする。分泌因子から血管新生因子候補を探索し、今回 ANGPTL4 に注目した。市販のリコンビナントヒトタンパクを用い、ヒト RE 細胞に対する血管新生作用を検討した。先の、管腔形成のほか、増殖、遊走、浸潤、透過性の 5 項目について検討した。ポジティブコントロールとして、ヒト VEGF タンパク (293-VE: R&D Systems) を用いた。

さらに、ARPE-19 細胞に、ANGPTL4 の siRNA またはネガティブコントロールの siRNA をトランスフェクションした状態で、HG 培地で培養した上清について、前期(1)のようにヒト RE 細胞に対する血管新生 (管腔形成) 促進作用を定量化し、先の血管新生促

進活性の責任分子であることを確認する。

3-3-C. 糖尿病 in vivo モデルでの解析

糖尿病網膜症を発症することが知られている SDT (Spontaneous Diabetic Torii) ラットおよびコントロールの SD ラットの網膜において、in situ hybridization (ISH) を施行した。

[4] 個体レベルでの画期的な病期診断マーカーの開発研究

(1) 日本人糖尿病に類似した、新規非肥満糖尿病モデル Sendai ラットの解析 (岡村)。

動物

LEA/Sendai ラットは、1996 年東北大学医学部 (現大学院医学系研究科) 附属動物実験施設にて飼育されていた Long-Evans Agouti (LEA) ラットコロニーから多飲多尿個体として発見された。その後、このコロニーのラットに対し糖負荷試験を行い、120 分血糖値が 200mg/dl 以上の雄ラットを選び、兄妹交配により系統化した。2005 年に国立国際医療センター研究所動物実験施設に導入し、以後も同様に兄妹交配により系統維持している。対照系統として、Brown Norway (BN)、F344 および Wistar ラット (Japan SLC Inc.) を用いた。

経口糖負荷試験および血中インスリン濃度の測定

16-17 時間絶食させたラットに、グルコース 2 g/kg 体重になるよう経口投与し、0、30、60、90 および 120 分後にそれ

ぞれ尾静脈から採血した。血糖値はグルテ
スト R 血糖測定機 (Sanwa kagaku kenkyusho,
Co., Ltd) で測定した。血中インスリン濃
度は遠心により血漿を分離後、インスリン
測定キット (Morinaga Milk Industry Co.,
Ltd) を用いて、ELISA 法により同定した。

組織病理学的解析

ラットをジエチルエーテル麻酔したラ
ットから、4%のパラホルムアルデヒド
/PBS 固定液で灌流固定した組織を摘出し、
4°Cで一晩固定後、常法に従ってパラフィン
包埋し、切片を作成した。インスリンお
よびマクロファージの検出は、それぞれ抗
ブタインスリン・モルモットポリクローナ
ル抗体 (DAKO) および Mouse Anti Rat
macrophage 抗体 (ED1, Serotec Ltd) を用
い、3,3'-Diaminobenzidine
Tetrahydrochloride (DAB; Nacalai Tesque
Inc) 溶液 (0.03%DAB、0.02%過酸化水素、
0.05M Tris-HCl, pH7.6) で発色させた。
対比染色としてヘマトキシリンを用いた。
インスリン陽性細胞の面積は画像解析ソ
フト WinROOF (MITANI CORPORATION) を用
いて測定し、インスリン陽性面積/膵臓全
体面積 (%) として算出した。

量的形質遺伝子座解析

LEA/Sendai ラットと非糖尿病の BN ラッ
トを交配し、F2 世代 207 匹を作成した。生
後 8 週齢の個体に対し、16 時間絶食後経口
糖負荷試験を行い、血糖値を測定した。F2
個体の遺伝子型は、201 個のマイクロサテ
ライトマーカーを用いて遺伝子型を決定

し、糖負荷後の血糖値および血糖曲線下面
積を量的形質として Map ManagerQTX を用
いて QTL 解析を行った。有意水準は
Permutation test (1-cM steps for 5,000
permutations) により求めた。likelihood
ratio statistics (LRS) score を 4.61 で
割り、LOD score に変換した。

遺伝子発現解析

ラット各組織から、QIAGEN RNeasy
Micro (膵臓; 約 200 個) および Mini (肝臓、
腎臓; 10mg) kit を用い、プロトコールに
従って Total RNA を抽出した。膵臓はコラ
ゲナーゼ法を一部改良した方法により単
離した (Ohara-Imaizumi, M. et al.,
Biochem. J., 2004)。発現遺伝子の網羅
的解析は、Affimetrix 社 GeneChip システ
ムのプロトコールに従い、GeneChip Rat
Expression Array 230 2.0 を用いて解析し
た。Applied Biosystems 社 TaqMan プロー
ブおよび 7900HT を用いたリアルタイム
RT-PCR により、遺伝子の発現量を定量した。

血中脂質解析

3-4 時間絶食後、ラット尾錠脈から血
液を採取し、遠心により血清を分離した。
血清中の遊離脂肪酸は、NEFA C-テストワ
コー (Wako Pure Chemical Industries,
LTD.) にて測定した。血中コレステロール
およびトリグリセリドプロファイルは、ゲ
ルクロマトグラフィー法を用いて分析し
た (Hara, I and Okazaki, M. Methods in
Enzymology, 1986)。

統計解析