

データは平均 (Means) ±標準偏差 (S.D) で示し、各群間の比較は Student' s t-test 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

(2) 2 型糖尿病の統合的なパネルの構築 (安田)。

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。同一患者では、教育入院前後など、代謝状態が変化したと思われる 2 点で血清を採取するこ

とも試みる。

(倫理面への配慮)

研究に用いたヒト試料は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」に準拠し、倫理委員会の承認および本人の同意を得て使用した。動物実験については、各施設の実験動物委員会の規則に従い、動物愛護上の配慮をもって実験を行った。

図1 慢性疾患としての糖尿病の病態

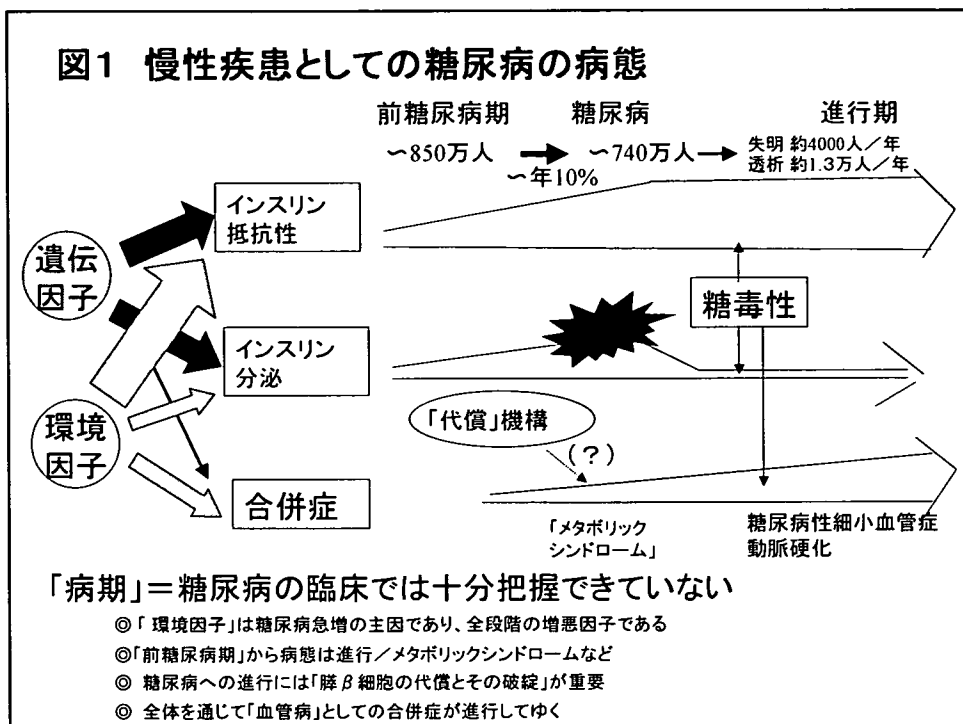
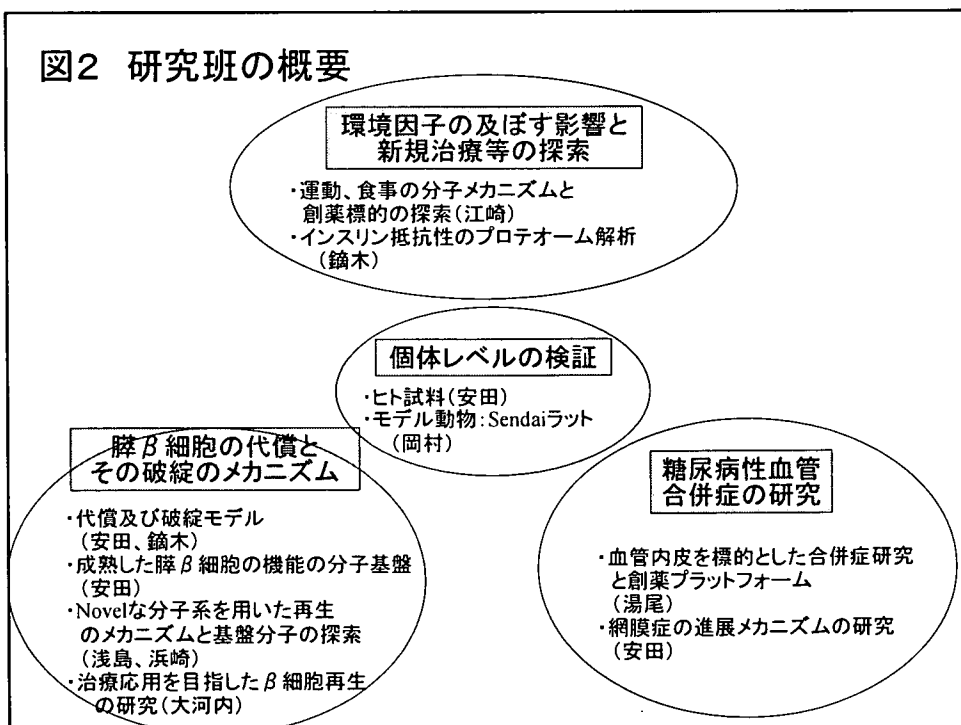


図2 研究班の概要



C. 研究結果

[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) 環境因子個体モデル (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 の役割

まず体脂肪量については、野生型マウスでは、高脂肪食を食べて運動をしないでいると、約 15g と、高炭水化物食群の約 3 倍の重量になったが、高脂肪食を食べていても running や swimming をしていれば、体脂肪は約半分減った。ところが、AMPK-DN マウスでは、運動をしても体脂肪減少効果は 2 ラインともほとんど消失していた。体脂肪率換算や、脂肪組織重量でも、同様の結果であり、運動の体脂肪減少作用には骨格筋での AMPK の活性が必要であることがわかった。

次に、空腹時血糖値やインスリン値は、野生型マウスでは、高脂肪食を食べて運動しないでいると高値となったが、高脂肪食を食べていても swimming をしていると血糖値は有意に低下し、高炭水化物食を食べている群と同じレベルになった。驚くべきことに、運動により体脂肪減少効果が認められない AMPK-DN マウスでも、運動により空腹時血糖及び血中インスリン濃度の低下、すなわちインスリン抵抗性改善効果が見られた。

このメカニズム解明のために、野生型マウスおよび AMPK-DN マウスに 1 ヶ月間 swimming をさせた後に、骨格筋における GLUT4 mRNA 発現量を調べたところ、両者とも運動により GLUT4 が約 1.4 倍に増加した。以上の結果より、AMPK-DN マウスで運動が糖代謝を改善した原因の一つとして、GLUT4 量の増加が考えられた。

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

β 2 受容体刺激薬 clenbuterol を投与すると骨格筋での PGC-1 α 発現量が用量依存的に増加した。この増加は β 受容体遮断薬 propranolol 前投与で抑制された。

45 分間のトレッドミル走行を行うと、運動終了 3 時間後をピークとして骨格筋の PGC-1 α の発現は増加したが、この増加は β 受容体遮断薬 propranolol 前投与で抑制された。同様の結果は、AMPK-DN マウスでも認められた。以上より、運動による骨格筋での PGC-1 α 発現増加に交感神経系の興奮が深く関与していること、AMPK の活性化はそれほど重要でないことがわかった。

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魚油の効果

コントロール群に比べ、「高スクロース食群」、「高脂肪食群」とともに肝

臓 TG 量が有意に増加し、いわゆる脂肪肝が誘導された。ここに魚油を添加すると、「高スクロース食群」の肝臓 TG 増加は抑制されたが、「高脂肪食群」の肝臓 TG 量は更に増加した。なお血糖値は、「高脂肪食群」で増加したが、魚油添加により減少した。

肝臓における遺伝子発現量について調べた結果、コントロール群に比べ、「高スクロース食群」では SREBP-1c, FAS, ACC1 遺伝子の発現が増加しており、魚油添加により、その増加は抑えられた。「高脂肪食群」では、PPAR γ 1, PPAR γ 2, CD36 の軽度な発現量増加が認められ、魚油添加によりさらに著明な増加が認められた。

なおこのほか、砂糖の多量摂取が肥満・糖尿病の罹患を増加させるメカニズムに関連して、高フルクトース摂取マウス、肝特異的 DGAT1 過剰発現マウスを用いて、高フルクトース摂取により、肝からの VLDL 分泌が増加し、血中の中性脂肪値が上昇すること、比較的少量の魚油の摂取がこうした砂糖多量摂取による血中中性脂肪値上昇を抑制すること、及び予想に反してその抑制効果に DGAT1 の発現量は関与していないこと、なども明らかにした。

1-1-D. 運動の肥満抑制作用への交感神経系の役割

高脂肪食負荷した安静群ではいず

れのマウスでも同じように体重や体脂肪は増加したが、運動による体脂肪減少効果は、野生型マウスでのみみられ、 β レスマウスではみられなかった。一方、 β レスマウスでも、運動食後時の血中脂肪酸、グリセロールの増加は野生型マウスと同程度認められ、lipolysis は障害されておらず、1回の運動による酸素消費量にも差は認められなかった。ただし、運動トレーニングにより野生型マウスでは安静時代謝量は亢進したが、 β レスマウスではその効果は認められなかった。エネルギー代謝に関与する遺伝子発現量の検討から、褐色脂肪細胞において運動トレーニング後に、脂肪燃焼関連遺伝子発現の増加が野生型でみられるが、 β レスマウスでは認められなかった。なお骨格筋においては両マウス間で著明な差は認められなかった。

1-1-E 骨格筋で GLUT4 の発現を増加させる薬剤の検討

PPAR α 活性化剤、fenofibrate を各種濃度で 1 週間投与した所、0.3% (wt/wt) 以上の濃度から有意な GLUT4mRNA の発現増加が認められ、濃度依存的に発現量は増加した。しかし、摂食量の減少が認められたため、pair feeding を行い、同じ摂取カロリーの条件で以下の実験を行った。Fenofibrate を 0.5% (wt/wt) で経口

投与した場合、GLUT4 の増加は投与 2 日後から認められ、1 週間でその値は安定した。投与 1 週間後の糖負荷テストでは血糖値の上昇が抑制され、インスリントレランステストではインスリン感受性の亢進が認められた。

GLUT4 の発現増加作用は他の PPAR α 活性化剤, gemfibrozil や wy14643 でも認められた。Fenofibrate の GLUT4 発現増加作用は雌の PPAR α knockout マウスでは認められず、雄の PPAR α knockout マウスでは 50%程度阻害された。

(2) インスリン作用のプロテオーム解析

IRS と相互作用する蛋白 (A) 及び IRS のインスリン刺激前後での翻訳後修飾の解析 (C) については、解析条件を吟味検討し、タンパク同定を試みた。

CHO-IR 細胞での IRS 高発現による細胞周期制御の検討 (B) の結果、IRS-1 高発現では細胞周期に変化は見られなかったが、IRS-3 高発現ではインスリン依存性の S 期及び G2/M 期への移行が有意に抑制された。IRS-3 高発現では、IRS-1 高発現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く、免疫染色での解析結果では 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 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) にて解析した。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」に関与する蛋白であったが、細胞分裂に関与する RhoGDI 等のシグナル蛋白も同定された。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、特に TCTP の変化については、核内に固有のシグナルであることが示唆された。

また、アディポネクチン・シグナル伝達機構の予備的な解析 (D) では、リコンビナント・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とで、HepG2 細胞を 24 時間処理し、2D-DIGE を行ったところ、前者特異的な蛋白スポット数個

を認め、同定へ向けて解析中である。

[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 (浜崎)。

2-2-A. レチノイン酸、アクチビン処理による膵臓分化マーカーの発現

EBSs 形成から 4 日後にレチノイン酸 (0, 0.1, 1 mM) およびアクチビン (0, 10, 25 ng/ml) を含む培養液中に移してさらに 2 日間培養した後、接着させて培養を続けた。すると、レチノイン酸・アクチビン処理終了から 6 - 8 日後、レチノイン酸およびレチノイン酸とアクチビンで共処理した EBS の一部において管状ないしドーム状の構造の形成が観察され、平滑筋によるぜん動運動様の動きが認められた。さらに処理終了から 9 - 12 日後 (EBS 形成から 15 - 18 日後) レチノイン酸およびレチノイン酸とアクチビンで共処理した EBS の一部において、黒い斑点状の部分を含む組織の形成が観察された (図 3A, B)。

膵臓発生の調節遺伝子、および膵臓のマーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法によって調べた (図 3C)。レチノイン酸とアクチビンで共処理した EBSs においては、インスリン 2、グルカゴン、

アミラーゼ 2、膵臓発生の調節遺伝子である Pdx-1、Ptfla/p48 はいずれも発現が著しく上昇していた。これらの遺伝子は処理をしていない EBSs では発現がみられなかった。アミラーゼは処理後 6 日後から経時的に大きな発現量の上昇を示したが、インスリン 2、グルカゴン、PDX-1、Ptfla-p48 は処理終了直後から発現量の上昇がみとめられた。shh は無処理の EBSs においてはすべての時期で発現していたのに対し、レチノイン酸とアクチビンで共処理した EBSs においては処理終了後、遺伝子発現が抑制されていた。

以上より、レチノイン酸とアクチビンで処理した EBSs では、形態学的に消化管および関連組織への分化がみられ、膵臓マーカー遺伝子の発現量が上昇する。

分化した組織の超微細構造的な解析

前記レチノイン酸とアクチビンで共処理した EBSs について、誘導処理終了後 11 日後 (EBS 形成後 17 日) に顕微鏡で観察した。切片で観察すると管腔に隣接した部分にトルイジンブルーによって濃く染まる細胞をふくむ、房状の組織 (図 4A)、及びそれに隣接した導管様構造が認められた。電子顕微鏡による観察から大量の分泌顆粒 (zymogen granules) を含む細胞 (図 4C, D) が観察された。この細

胞は発達した小胞体と、暗色で、均質な大量の分泌顆粒を含んでおり、これは膵臓の外分泌細胞（腺房細胞）の特徴と一致している。またこれに接する狭い管状の部分：介在部がみられる点でも膵臓の腺房と非常に類似している。これとは別に、低い円柱上皮に囲まれた膵臓の導管に類似した構造(図 4B) も観察された。

また、外分泌細胞とくらべて少数ではあるが、膵臓の内分泌細胞に類似した形態をもつ細胞(図 4E, F) も認められた。この細胞は外分泌細胞(図 4C, D) とは形態の異なる分泌顆粒を多数含んでいる(図 4F)。暗く染まる中心部分と、外側の膜とのあいだに広い間隙があり、これは膵臓の β 細胞の顆粒の特徴的な形態と一致している。

以上形態学的な解析より、レチノイン酸とアクチビンで共処理した EBS において導管・内分泌細胞・外分泌細胞を含む膵臓組織が形成されていると解釈される。

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

レチノイン酸およびアクチビンの処理濃度の膵臓誘導効果への影響を、Real-time PCR 法によって検討した(図 5A-D)。いずれも無処理の EBSs における発現を 1 とした場合の相対値

を示す。shh の発現量はレチノイン酸処理、アクチビン処理、レチノイン酸・アクチビン共処理いずれによっても減少した(図 5C)。レチノイン酸のみで処理した EBSs においては無処理の EBSs と比較してインスリンおよびアミラーゼの発現量がともに増加する一方、アクチビンのみで処理した EBSs においてはインスリンの発現量には大きな変化がなく、アミラーゼの発現量は減少した(図 5A, B)。

更に興味深いことに、レチノイン酸の処理濃度を一定(0.1 mM)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ー(アミラーゼおよび ptf1a/p48) の発現量が著しく増加してインス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 では逆に、インス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には変化がなかった。

抗インスリン抗体および抗アミラーゼ抗体をもちいた二重染色の結果もこの Real-time PCR の結果を裏付けている(図 6)。

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。

移植のための糖尿病モデルマウスの作成

C57/BL6, Balb/c およびヌードマウスに STZ 腹腔内注射をおこなって糖尿病モデルを作成した。投与量を検討した結果、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。STZ 処理 14 日後の組織学的検討では、調べてみると、 β 細胞だけでなく、膵島細胞は全く観察できなかつた。

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 (図 7)。

(2) アフリカツメガエル胚からの膵臓分化系

2-2-A. ツメガエルアニマルキヤップからの膵臓誘導系の確立

我々はまず、高効率にアニマルキヤップから膵臓を誘導するための条件検討を行った。その結果、以下の方法でアニマルキヤップを処理すること

によって膵臓が高効率に誘導することができた。

まず、後期胞胚期 (ステージ 9) でアニマルキヤップを切除し、400ng/ml アクチビンを含む生理食塩水中でアニマルキヤップを 1 時間処理する。さらに、生理食塩水中で 5 時間培養した後、 10^{-4} mol のレチノイン酸溶液で 1 時間処理する。以上の方法により、約 70% の効率でアニマルキヤップから膵臓を誘導することが出来た。実際、処理したアニマルキヤップの組織像を、薄切切片のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により観察すると、膵臓組織に特徴的な組織像が見られた (図 8-(1))。さらに、膵臓特異的に発現するマーカー遺伝子の発現を RT-PCR で確認したところ、内分泌細胞特異的マーカー X1Hbox8, 外分泌細胞特異的マーカー carbA 共に、400ng/ml アクチビン処理したアニマルキヤップで最も強い発現を示した (図 8-(2))。以上の結果から、膵臓特異的な新規遺伝子を単離するために必要不可欠な高効率の膵臓誘導系が確立できた。

2-2-B. 膵臓特異的な新規遺伝子の単離

次に、我々はディファレンシャルスクリーニングにより、膵臓特異的に発現する新規遺伝子の単離を試みた。ま

ず、上記で述べた膵臓誘導条件 (400ng/ml アクチビン 1 時間処理、生理食塩水 5 時間処理、 10^{-4} mol レチノイン酸 1 時間処理) で処理したアニマルキャップ由来の mRNA から DNA 合成し、cDNA ライブラリーを構築した。一方、プローブは 400ng/ml アクチビン・ 10^{-4} mol レチノイン酸処理したアニマルキャップ由来 mRNA から 400ng/ml アクチビン処理したアニマルキャップ由来 mRNA をサブトラクション法により差し引いたものを用いて作成した。これを用いて上記 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、155 の陽性クローンを得ることが出来た。そのうち、未知の遺伝子は 40 個存在した。

得られた 155 の遺伝子が膵臓特異的に発現しているかどうかを解析するため、既知の遺伝子も含め in situ ハイブリダイゼーションによって検討したところ、膵臓特異的に発現する遺伝子が 39 遺伝子見出された。その中で代表的な 3 遺伝子について図 9 に示す。carboxyl ester lipase, pancreatic elastase 2, placental protein 11 はいずれも、ステージ 40 以降で予定膵臓領域で発現が確認できた。また、未知の遺伝子のうちの 1 つ (54H) は、ステージ 33 で弱く予定膵臓領域に発現する。ステージ 40 では、予定膵臓領域だけでなく、

内胚葉全体で強い発現が観察された。

2-2-C. 膵臓組織誘導系の改良

網羅的な膵臓形成関連遺伝子の同定を効率よく進めるためには、誘導組織の高純度化を実現するための実験系の改良が必要と思われたので、もう少し限定的に作用する処理を行う、あるいはある遺伝子のみを胚に直接微量注入する方法によって、より膵臓形成率が向上するような誘導系を検討した。

Xnr (Xenopus nodal-related) 5、Xnr6 は TGF-beta スーパーファミリーに属し、アクチビン様の構造を持つタンパク質である。Xnr5, 6 は中胚葉・内胚葉誘導活性を持つ。実際、Xnr5, 6 を過剰発現すると、中胚葉および内胚葉の組織が濃度依存的に形成される。そこで、これらの因子を注入した胚を用い、さらに、いくつかの因子を初期胚に作用させることにより、膵臓組織を肥大化させることを試みた。

(1) 塩化リチウムはツメガエル初期胚において超背側化することが以前から知られている。実際、塩化リチウムは背側化抑制因子 glycogen synthase kinase (GSK)-3beta の作用を阻害する。この塩化リチウムでツメガエル胚を作用させた結果、本来胚の中の一部

に過ぎない膵臓組織が体軸のまわりに沿ってリング状に誘導された（図 10、左から 2 列目）。次に、ツメガエル胚をレチノイン酸で処理し、膵臓組織の広がりを観察した。その結果、レチノイン酸処理でも、膵臓組織の広がりが観察された（図 10、左から 3 列目）。更にこれら二つの処理を組み合わせたと、膵臓組織の胚における比率の向上が観察された（図 10、左から 4 列目）。同時に心臓マーカーの発現を調べると、処理を多重にするに従って発現の消失が観察された。このことは、今回改善した膵臓誘導系が高純度化に成功していることを支持している。

ただ、これでもまだ膵臓組織の胚全体に占める割合は十分に大きいとは言えない。そこで、あらかじめ初期胚に Xnr5 を 10pg マイクロインジェクションしておいて胚を内胚葉しておき、その上でリチウム処理及びレチノイン酸処理を行った。すると、膵臓マーカー pdx1 の発現領域はほぼ胚全体に広がった（図 11）。この結果は、アクチビン-レチノイン酸処理法に比べて劇的に膵臓領域の存在比率が上昇したことを示している。

2-2-D. 改良法によって誘導された膵臓組織からの新規因子同定

前項に沿って処理した初期胚について、実際に膵臓特異的に発現する遺伝子の発現量増加が見られるかどうかマイクロアレイによって解析した。その結果、GATA4-6、HNF-1, 3, 4 など、膵臓を含む前方内胚葉で発現する遺伝子の発現量の大幅な増加が見られた。これらの結果は、in situ ハイブリダイゼーションで検証した Pdx-1 だけでなく他の遺伝子についても実際に発現量を上昇していることを示しており、改良誘導系によって膵臓領域の拡大が効率よく起こっていることを示唆している。

次に、非誘導条件と比較して誘導条件で 2 倍以上 mRNA の存在量が多い遺伝子群の抽出を行った。その結果、約 22000 遺伝子の中から、約 550 個の該当する遺伝子を同定した。これらについて、遺伝子の空間的な発現パターンを知るために whole-mount in situ ハイブリダイゼーションを行った。その結果、すべてではないが、一部の遺伝子について膵臓を含む前方内胚葉で特異的に発現するものが存在した（図 12）。

(3) 新生仔ブタ膵由来 SP 細胞の単

離と解析

2-3-A. 新生仔ブタ膵からの SP 細胞の単離

SP 細胞を回収する際の色素をインキュベートする時間や濃度について条件検討を行い、再現性よく SP 細胞を得ることができた（収量は約 0.1%-0.5%）。また 150 μ M 以上の濃度の Verapamil により、SP 分画の消失効果が見られた。

2-3-B. SP 細胞の増殖・分化能

得られた SP 細胞は、培養により増殖させることも可能であり、特に type I collagen をコートしたプレートで、高い増殖能を確認した。10% に満たない確率ではあるが、SP 細胞 1 コから増殖するものも見られた、一般に 2 ヶ月以上継代培養可能であり、増殖能の高いものでは、3 年以上の継代が可能であった。

RT-PCR により、単離したばかりの SP 細胞群について発現遺伝子を調べたところ、まず、SP 細胞としての性質を示す要因と考えられている *abcg2/bcrp1* (ABC トランスポーター) の高い発現が確認できた。また、分化した細胞の存在を示唆する内分泌ホルモンの発現も見られた。さらに、何度かの発現遺伝子解析の結果、大部分のものに *pdx-1* の発現が見られなかったものの、およそ半分の割合で、

neurogenin3 の発現が見られた。

培養により増殖する細胞は、*insulin* や *glucagon* のようなホルモンの発現は見られなくなったが、多くの細胞において *pdx-1* の発現が見られるようになり、*neurogenin3* の発現も見られた。ただ、ほぼ全ての細胞群において、*somatostatin* (δ 細胞のマーカー)、*pancreatic polypeptide* (PP 細胞のマーカー)、*amylase* などの発現も見られたことから、一部に継代培養の過程において分化してしまう細胞が存在すると予想された。さらに、培養期間が 6 ヶ月を超える細胞においては、大部分で内分泌ホルモンの発現は見られなくなる。現在、*insulin* 発現細胞への分化誘導はまだ成功していない。

2-3-C. SP 細胞の網羅的遺伝子発現解析

SP 細胞と non-SP 細胞の比較解析の結果、SP 細胞において発現が 3 倍以上増加している遺伝子が 114 コ、1/3 倍以下に減少している遺伝子が 80 コ見出された。ヒト、マウス、ラットなどの遺伝子から得られる情報をもとに、この 194 コを Gene Ontology の「Biological process」により分類したところ、細胞の接着、増殖、分化、シグナル伝達に関わる遺伝子に発現の変化が多く見られた。し

かしながら、従来「stemness」との関係の可能性が示唆されている遺伝子には、ほとんど変化が見られなかった。

1 コの SP 細胞から増殖した細胞と non-SP 細胞の比較解析の結果、増殖した SP 細胞において発現が 3 倍以上増加している遺伝子が 186 コ、1/3 倍以下に減少している遺伝子が 60 コ見出された。Gene Ontology によると、「Biological process」では、細胞の増殖やシグナル伝達に関わる遺伝子が、「Molecular function」による分類では、DNA 結合、転写因子活性、ATP や GTP 結合能を持つ遺伝子に発現の変化が多く見られた。

SP 細胞 1 コから培養により増殖した細胞と non-SP 細胞との間に発現変化が見られた遺伝子と、新鮮な SP 細胞と non-SP 細胞との間に発現変化が見られた遺伝子では、ほとんど一致するものがなかった。

前述の結果を受けて、SP 細胞が中胚葉系へ分化しうる可能性を考えた。管腔形成能の有無で検討したところ、ある条件で、SP 細胞からはやや弱いながらも管腔形成と思われる像がみられ、血管内皮細胞への分化可能性が示唆された。

以上より、新生仔ブタ臍由来 SP 細胞は非常に不均一であり、内胚葉系以外の系統の細胞マーカーも強く発現しているなど、古典的な組織幹細胞の

概念で理解し切れない可能性もある。

(4) 他の組織由来幹細胞からの臍β細胞分化の可能性 (大河内)。

2-4-A. 皮膚から多能性幹細胞の分離・培養

マウス皮膚より浮遊培養系を用いて、sphere を形成させ、半年以上の長期継代に成功した。ヒト真皮由来の細胞はマウスに比べると増殖が遅く、sphere の形成率も低かった。10%FBS 添加 DMEM 中で接着培養して細胞数を増やした後に浮遊培養にしたところ、sphere の形成はみられたが、継代により増殖力の低下がみられ、4-5 代で増殖が停止した。幹細胞マーカー CD133 に注目すると、毛周期の影響を受け成長期に一過性に CD133 陽性細胞が見られ、これを MACS により分取し、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た。ただ初代培養においては、紡錘形の間葉系幹細胞に混じって、内皮細胞の可能性のある敷石状の細胞増殖もみられた。ヒト脂肪組織由来の細胞は真皮由来の細胞に比べて、高齢者由来の場合でも長期継代が可能であった。多分化能については、骨芽細胞誘導培地にてアル

カリフォスファターゼ陽性細胞及びカルシウム沈着、脂肪細胞誘導培地にてOil Red Oに染まる脂肪滴を含んだ脂肪細胞、neurosphereの培養条件にてNestin遺伝子発現、神経分化条件にて β III Tubulin、MAP2陽性細胞が出現した。

脂肪由来間葉系細胞にアクチビンを追加して30日間培養すると、アクチビン100 ng/ml処理では、30日間後に明らかにPdx-1の発現が認められた。

2-4-B. 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遺伝子をアデノウイルスで一過性に導入したところ、導入2、3日目に確かに外因性のPdx1の発現が確認された。またレトロウイルスで恒常的に導入したところ、導入10日目に外因性の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。ただ陽性になったのは1度だけであり、再現性に問題がある。

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。

2-4-C. 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 処理により5日後には600 mg/dL以上の高血糖を示す糖尿病マウスに、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細胞数を増やして移植すると、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)。

(5) 膵 β 細胞の脂肪毒性の系など
(安田、鎬木)

2-5-A. 脂肪酸によるインスリン分泌低下の分子機構

膵 β 細胞株INS-1Dと脂肪酸(パルミチン酸)を用いて、まずグルコース反応性インスリン分泌(GSIS)が低下するがアポトーシ

ス増加しないような、「可逆性脂肪毒性」の系を構築した(0.35mM パルミチン酸, 120時間処理)。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。なお、この脂肪毒性系

では、アディポネクチンがそのβ細胞機能を改善させることも示した。

2-5-B. 短時間脂肪酸処理によるインスリン分泌亢進の分子機構

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、INS-1細胞に対する60分間のパルミチン酸(0.6mM)刺激と、これにさらにアシル化阻害剤であるCeruleninを加えた場合を、INS-1 total cell lysateを用いた2D DIGEによる解析にて比較し、有意に変動を認めるスポットとしてcofilinを同定した。しかし、cofilinに対するsiRNAによる発現抑制もインスリン分泌に変化をみなかった。

パルミチル化による膜親和性の増大によってtranslocateする蛋白を検索するために、パルミチル化蛋白をビオチンラベル後に精製するABE法を用いた系を検討した。COS-1細胞やHEK293細胞を用いた予備実験により、原法から蛋白沈殿法等を改良し、グラディエントゲルを併用することで、パルミチル化蛋白を同定するメドをつけることができた。

(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

2-6-A. グルコース反応性インスリン分泌獲得系 (in vitro 膵β細胞成熟系) の確立

生後24時間以内の新生仔ブタ膵から分離した内分泌細胞について、11.1mM グルコース (11.1G) および2.8mM グルコース (2.8G) 培地で平面培養したところ、培養7日目で、後者のみ GSIS が見られた。詳細は省略するが、ほかの分泌刺激に対する反応も、11.1G 群のほうが軒並み亢進していた。

2-6-B. 遺伝子発現プロファイル

上記モデルについて、7日目の2.8G 群、11.1G 群で、候補遺伝子および網羅的な遺伝子発現を検討した。GSIS やインスリン分泌に関係する機能遺伝子について、個別で検討した。グルコースセンサーとされるグルコキナーゼをはじめ、これまでGSISに関係するとされた分子については、あまり変化がなかった。

マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析の結果、インスリン、および調節性分泌経路の成熟に関係すると考えられるプロセッシング酵素 PC1/3 が、GSIS を獲得する 11.1G 群で発現が増加しており、「機能的成熟」との関連は示唆された。このほかホルモン分泌調節、シグナル伝達などに関与する興味深い遺伝子(全部で

23 コ)に発現の変化が見られた。

2-6-C. 遺伝子発現抑制による GSIS への効果の検討

前項23 遺伝子のうち、インスリン、およびラットにおけるカウンターパートの見つかっていない遺伝子1 コを除く、残りの21 コの遺伝子について、ラットに対する siRNA をデザインした。INS-1D 細胞に導入して、十分な遺伝子ノックダウンを確認できた siRNA を用いて、該当遺伝子抑制下でインスリン分泌、特に GSIS を検討した。その結果、半分以上の遺伝子において、いわゆる negative control に比べ高濃度 (25 mM) グルコースで刺激した際のインスリン分泌反応に、明らかな低下が見られた(図13)。

(7) 膵β細胞由来完全長 cDNA ライブラリー

2-7-A. 膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの作成

膵β細胞特異的な遺伝子発現調節の分子機序解明のために、Vector-capping 法を用いて、INS-1D 細胞から、世界で初めて膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリーを作成し、ランダムピックした約1.1万クローンの5'側 one-pass 配列解析を行った。シーケンスが得られた約9000クローンのうち、インサートが確認さ

れたものは89%、本法の原理を応用して（転写開始点のGが付加などから）完全長 cDNA と判定されるクローンは約70%にのぼった。もっとも頻度が高かったクローンはインスリン1であり、アミリン、タンパク変換酵素（PC1/3、PC2）なども多かった。全体は3329 クラスターに分類され、うち singleton は約2200であった。

2-7-B. 新規転写開始点、新規クローンの解析

既存のデータベースに対するBLASTサーチなどの検討を行うと、既知遺伝子だが、既報より上流に転写開始点が存在するクローン、いずれの遺伝子とも明らかな相同性を有さない新規遺伝子と思われるクローンなども存在した。インスリンなど発現量が高くクローン数の多い遺伝子の転写開始点については、「microheterogeneity」も見られた。

このうち、600bp以上のインサートをもち、明らかなORFをもたないと見られる non-coding RNA(ncRNA)の候補も存在した。これらのうち、ISHにてラット膵島に発現することを確認した3クローンを含む4クローンについて、siRNAをデザイン合成し、INS-1D細胞に導入することにより、インスリン分泌、特にGSISへの影響をみた。図14に示すように、同一ク

ローンに対する複数のsiRNAで、ノックダウンによりGSISが増強するもの(ncRNA-1,2)及び減弱するもの(ncRNA-3)が見られた。現在さらにこのノックダウンした細胞から抽出したRNAを用いた網羅的発現解析を行っている。

[3] 血管内皮細胞を標的とした糖尿病合併症の研究

(1) ヒト成体由来の内皮細胞。

3-1-A. 初代培養ヒト血管内皮細胞を用いた糖毒性の系の開発

糖毒性のモデル系として、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) を測定したところ、何れの内皮細胞においてもHGで高い値を得ることができ、この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。また、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、それぞれの阻害剤での検討を行った。ミトコンドリアの阻害剤(CCCP、TTFA)ではヒト大動脈内皮細胞におけるROS産生が、NADPH阻害剤(Apocynin)は、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞におけるROS産生が

阻害され、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は細胞種によって一定でないことが示唆された。

次に、GSH の測定を行い、細胞内酸化還元状況を検討したところ、いずれの血管内皮細胞においても GSH の有意な低下が認められ、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。

いずれの血管内皮細胞においても HG 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。

3-1-B. 糖毒性モデルにおける発現遺伝子プロファイルの検討

上記糖毒性モデルについて、マイクロアレイを駆使した網羅的発現解析を行った。HG 培養にて、ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞で共通して発現誘導される遺伝子を検討したところ、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。TXNIP の増加は、蛋白レベルでも確認できた。

(2) 霊長類 ES 細胞からの血管内皮

細胞分化系の解析

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囊状の構造物が出現した。囊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。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。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、eNOS、von Willbrand factor (vWF) も陽性の成熟内皮細胞であった。また、in vivo

でも内皮細胞機能を発揮した。

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、血管内皮細胞が産生された。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、eNOS、von Willbrand factor (vWF) も陽性の成熟内皮細胞であった。また、in vivo でも内皮細胞機能を発揮した。

(3) 網膜症に関連する新規分子の同定 (図 15)

高グルコース下で培養した ARPE-19 細胞の上清は、ヒト RE 細胞に対して、明らかに血管新生（管腔形成）促進活性があり、高グルコース下の培養上清や、高グルコース単独、などの RE 細胞への効果より遥かに大きい。したがって、ARPE-19 細胞について、グルコースにより発現・分泌が誘導される血管新生促進因子の存在が示唆された。

低グルコース、および高グルコース下で培養した ARPE-19 細胞のトランスクリプトーム比較で、高グルコース下で発現が亢進している 19 プロブのうち、分泌タンパクであり、血管新生作用を持つ可能性のあるものとして、ANGPTL4 に着目した。リコンビナントの ANGPTL4 タンパクは、ヒト RE

細胞に対して、管腔形成だけでなく、増殖・遊走・浸潤作用があり、驚くべきことに、VEGF とほぼ同等の活性を持っていた。ちなみの、透過性については、十分な検討ができず、今後の課題である。

ANGPTL4 が、ARPE-19 細胞の培養上清にみられた血管新生促進活性の主体であるかどうかについて、あらかじめ ANGPTL4 をノックダウンした ARPE-19 細胞では、高グルコース下で培養しても、その上清の活性が 70% 程度低下したため、ANGPTL4 が活性の主体であろうと結論づけた。ただし、同時に寄与度はやや小さいながらも、他の因子の関与も予想された。

最後に、in vivo で同様の現象がみられるかどうかを、網膜症が進展する SDT ラットの、高血糖初期の動物（17 週齢）網膜で、ISH で検討した。正常対照とした SD ラットの網膜と比較すると、内顆粒層ではともに発現が見られたが、RPE 細胞では、SD ラットで全く発現が見られないのに対し、SDT ラットでは、明らかに発現が亢進していた。

[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) Sendai ラットについて(岡村)。
4-1-A. LEA/Sendai ラットの糖尿病発症とインスリン分泌不全

LEA/Sendai ラットでは、雄では生後2ヶ月齢ですでに耐糖能異常(IGT)個体が現れ、6ヶ月齢で10.0%、12ヶ月齢で61.5%、14ヶ月齢で86.6%が糖尿病を発症した(図16)。これに対し雌では14ヶ月齢で33%の個体が耐糖能異常を示すものの、糖尿病発症個体は見られなかった。雌雄いずれも肥満は認めない。

経口糖負荷試験では、雄では、経口糖負荷後30分値の血糖値は8週齢で既に有意に高く、耐糖能は加齢と共に悪化し、48週齢では糖負荷後120分血糖値が200-300mg/dlであった(図17)。一方雌では、8週齢では雄と同様耐糖能異常が見られるものの、加齢に伴う耐糖能の悪化は観察されなかった(図17)。雄ラットでの糖負荷後の血中インスリン濃度は、24週齢では15分値で正常コントロールに比べ有意に低く、48週齢では30および60分測定値が正常コントロールに比べ有意に低かった(図18)。これらの結果から、LEA/Sendai 雄ラットは、肥満を伴わず、インスリン分泌不全が原因で、耐糖能が悪化すると考えられた。

4-1-B. 膵臓における組織病理学的検査

LEA/Sendai 雄ラットの膵島の病理学的変化を経時的に観察すると、12

週齢では、雄の膵島の一部で好中球を主体とした軽度の「炎症」像が観察され、加齢と共に膵島の線維化が進行し、マクロファージ主体の浸潤が見られた(図19,20)。CD4およびCD8陽性細胞は観察されなかった。膵島の数およびサイズは加齢と共に減少していた。膵島の炎症性反応は6ヶ月齢で消失し、それ以降は線維化が起こっていた。加齢と共にインスリン陽性細胞の分布が乱れており、インスリン陽性部位の面積も減少していた。線維化を起こした膵島と異なり、線維化が全く認められず形状も非常に小さい膵島が8ヶ月齢頃から多く見られた。

4-1-C. LEA/Sendai ラットの初期病態解析

4週齢のLEA/Sendai ラットに経口糖負荷試験を行ったところ、すでに耐糖能低下が見られ、特に糖負荷後30分血糖値の上昇が顕著であった。8週齢でも同様の傾向が観察され、これらの週齢では、糖負荷後の血糖値に雌雄差は見られなかった。8週齢雄ラットでは、糖負荷0および15分後の血中インスリン濃度が有意に低下していた(図21)。しかしながら、8週齢の膵島では膵β細胞の割合も含め病理学的な変化は観察されていない。膵臓のインスリン含量も、BNとの比較では有意に低下しているが、F344系

統とは差がないことから、顕著なインスリン含量の低下はないと判断した。

これらの結果から、LEA/Sendai ラットのインスリン分泌不全病態は、膵島の量やインスリン含有量の減少前から生じており、膵β細胞の質的な機能障害が示唆された。

4-1-D. 糖負荷後血糖値の量的形質遺伝子座解析

LEA/Sendai ラットのインスリン分泌能低下は、優性あるいは半優性遺伝子が関与していることが示唆されたので、LEA/Sendai ラットと BN ラットの F2 個体を作成し、糖負荷後血糖値に関する QTL 解析を行った。8 週齢の F2 個体群の 30 分血糖値は連続した量的形質であり、複数の遺伝子が関与した多因子疾患の特徴を示した。

30 分値血糖値で、第 1 染色体上にピーク LOD 値 4.6 を示す QTL が同定された(図 22)。この領域は、マウス第 7 番染色体とシンテニーがあり、糖尿病およびインスリン分泌に関わる Gipr (gastric inhibitory polypeptide receptor)、Ffar1 (Free fatty acid receptor 1, GPR40, (G-protein coupled receptor 40)、Kcnj11 (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J,

member 11; Kir6.2) および Abcc8 (ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8; SUR1) 遺伝子が存在していた。これらの遺伝子は有力な候補遺伝子となるため塩基配列を決定したところ、Gipr 遺伝子において、アミノ酸置換を伴う塩基置換を同定した。Ffar1 および Kcnj11 遺伝子の変異は同定されなかった。さらに QTL 近傍に糖尿病モデル OLETF および GK ラットで変異が報告されている G-protein-coupled receptor 10 (GPR10) 遺伝子の塩基配列を調べたところ、これらの糖尿病モデルラットと同様、転写開始コドン ATG が ATA に変異していた。

4-1-E. 網羅的遺伝子発現解析および血中脂質プロファイル解析

LEA/Sendai ラットの糖尿病病態から類推される候補遺伝子の発現量を TaqMan プローブを用いた定量的 RT-PCR 法により検討した。30 遺伝子の発現を膵島、肝臓または腎臓で検索したところ、7 遺伝子で発現量の増加が見られ、2 遺伝子では減少していた。

さらに GeneChip により、LEA/Sendai ラットの膵島、肝臓および腎臓の遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、膵島、肝臓および腎臓で共通して、変動している遺伝子が