

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007～2008 年度
課題番号：19790631
研究課題名（和文） 骨髄幹細胞からのインスリン産生細胞の分化誘導の試み
研究課題名（英文） A study for Induction of Insulin-producing Cells from Bone Marrow Stem Cells
研究代表者 浜本 芳之
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号 50390787

研究成果の概要：本研究では、骨髄細胞に PDX-1 など膵β細胞の発生・分化に関わる転写因子の遺伝子を導入し、インクレチンの一つである GLP-1 刺激を加えることにより、幹細胞からのより効率の高いインスリン産生細胞の発現を目指し、その分化プロセスに関わる転写因子発現などの解析を行った。その結果、PDX-1 の強制発現より GLP-1 アナログの投与の方が、よりインスリン産生細胞の出現率を増加させ、双方の刺激を加えると相加的効果があることが示された。また、得られたインスリン産生細胞はβ細胞に特異的な insulin-1、insulin-2、PDX-1、GlucoseTransporter2、glucokinase、GLP-1 受容体等の遺伝子の発現が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1900000	0	1900000
2008 年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	420000	3720000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病学・再生医学・インクレチン・PDX-1・インスリン産生細胞

はしがき

平成 19～20 年度の 2 年間にわたり「骨髄幹細胞からのインスリン産生細胞の分化誘導の試み」の課題に対し、文部科学省より科学研究費補助金（若手研究 B）をいただきま

した。ここに研究成果を報告致します。本研究を実施するにあたり、ご協力頂いた技術補佐員、事務補佐員の方々に深謝致します。

1. 研究開始当初の背景

近年の糖尿病患者の劇的な増加は、急激な医療資源の消費、医療費の増加につながり、

その対策は喫緊の問題となりつつある。しかし、再生医療により、体内でインスリン産生細胞を再生したり、膵島移植用の膵島を作成し移植することができれば、糖尿病は完治可能となる。膵島移植治療は、既に我が国においてもインスリン分泌が廃絶した1型糖尿病患者を対象に、複数の施設において臨床実施されているが、法律上組織移植となり条件の悪い心停止ドナーのみであること、ドナーの絶対数が少ないことなど社会的な問題に加え、膵島の単離から移植に至る間の機能低下の問題、移植後の免疫抑制の問題のほか、長期的成績がよくないことなど医学的な問題も多い。インスリン産生細胞の再生医療が実現すればこれらの問題は解決可能であり、1型糖尿病のみならず、全糖尿病患者の90%を占める2型糖尿病患者に対しても根本的治療法となり得る。

研究代表者は、分化多能性を持つことが報告(Jiang Yら Nature. 418, 2002)されている骨髄幹細胞よりインスリン産生細胞を誘導することに着目し、骨髄幹細胞よりインスリン産生細胞を誘導する再生医療の実現を目的に研究を実施してきた。そして、腸管より分泌されインスリン分泌促進作用を持つインクレチンの一つで、β細胞の増殖や抗アポトーシス作用が報告されている GLP-1 が、骨髄幹細胞からのインスリン産生細胞の分化誘導効率や、インスリン合成を増加させる可能性を見いだした。最近では、膵外分泌腺からβ細胞への分化転換が報告され、GLP-1がその分化誘導を促進することも示唆されている。

2. 研究の目的

以上の背景から本研究では、GLP-1 アナログを用いて、臨床応用可能なインスリン産生細胞の再生の可能性を模索することを目的とし、産生された細胞の遺伝子・転写因子の発現状態を調べることにより、インスリン産生細胞の誘導に関わる因子の検討を行い、より効率の高いインスリン産生細胞の誘導を目指した。

3. 研究の方法

(1)細胞は採取が簡単で、培養による増殖能にも優れることから再生細胞のソースとして理想的である。そこで、本研究では骨髄幹細胞を再生細胞のソースとし、膵外分泌細胞からβ細胞への分化転換との遺伝子発現などの差異を検討し、より分化誘導効率を高める検討を行った。

(2)実験方法

①骨髄細胞単離

4-8週齢のC57BL/6マウスを使用し、ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔下で、両側大腿骨および頸骨を単離し、21ゲージ針

により2% Fetal Calf Serum (FCS)を添加したHank's Balanced Solution (HBSS)を骨髄内に還流し、骨髄細胞を単離した。骨髄細胞塊はピペッティングにより分離したのち、RBC lyses buffer (Sigma)を用いて赤血球を溶解し、メッシュフィルター (Fisher)により濾過を行った。得られた骨髄細胞は、各条件の培養液にまいて primary cultureとした。培養液には Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を使用し、最大42日まで培養した。

②遺伝子導入

プラスミドを用いた遺伝子導入のために、Lipofectamin2000 (Invitrogen)を使用し、8-20μg/DishのプラスミドをOPTI-MEM (Gibco)に懸濁して、培養液をOPTI-MEMで洗浄した培養細胞に添加し、4-6時間後に10%FCSを添加したDMEM溶液を追加した。翌日に培養液は通常の培養液に交換した。

③培養液の調整

Exendin-4(Ex4) 10nMを培養10日目より42日目まで加えた群とPBSを加えた群を作成し、それぞれについて検討した。

④mRNA、蛋白の回収

培養細胞をスクレーパーにより回収し、Phosphate Buffered Serine (PBS)にて洗浄した後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)によりmRNAを回収した。得られたmRNAはRT-PCRキット(Invitrogen)によりReverse transcriptionし、cDNAを作成した。

蛋白の回収には、回収した細胞を低張HBSSに懸濁し、ソニケーションにより細胞膜を破壊して行った。

⑤PCR

得られた各群のcDNAを用いて、β細胞に特異的な、Insulin1、Insulin2、Pdx-1、Glucose transporter 2 (GLUT2)、Glucokinase (GK)、NeuroD、GLP-1受容体についてそれぞれPCR法により、発現を検討した。用いられたプライマーはTable1の通り。

Table 1

	Sense	Anti-sense
PDX-1	5'-CGGACATCTCCCATACG-3'	5'-AAAGGGAGCTGGACGCGG-3'
Insulin1	5'-CAACCGTGTAAATGCCACTG-3'	5'-AGGAGCAGTTCCTGAGGTT-3'
Insulin2	5'-CAGGAAGCCTATCTCCAGGTT-3'	5'-CACTTGTGGGCTCCCACTT-3'
GLUT2	5'-GGATAAATTCGCCTGGATGA-3'	5'-TTCCCTTTGGTTCTGGAAC-3'
NGN3	5'-ACTCCAAGACCCAGAACTGTC-3'	5'-ACTGGTAGGAGTAGGGATGCAC-3'
GK	5'-GAAAAGATCATTGGCGGAAA-3'	5'-CCCAGAGTGCTCAGGATGTT-3'
GLP-1R	5'-CCACCCAGTCTGAGGTTACAGTG-3'	5'-GTAGGGTGGGGTCTCCAGCCGTG-3'

⑥インスリン測定

培養液を回収し、インスリン測定キット

(ELISA、シバヤギ)によりインスリン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) プラスミドの作成、確認

CMV プロモーター下流に GFP、PDX-1 の coding gene を持ち、その下流に抗生剤耐性遺伝子を持ったプラスミドを作成した。これらのプラスミドを用いて、それぞれ非β細胞、β細胞の cell line である HEK293 細胞、および HIT 細胞を使用してリポフェクション法により細胞に遺伝子導入を行い、RT-PCR 法により mRNA レベル、および Western Blot 法により蛋白レベルでの発現を確認した(図 1)。

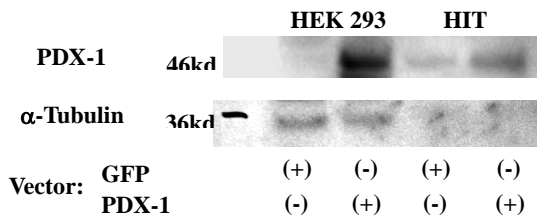
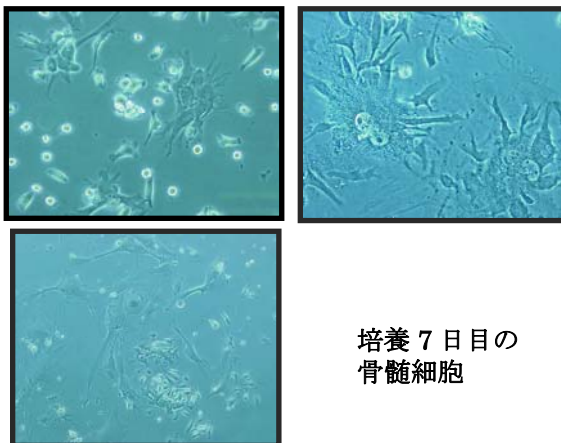


図 1 Western Blot 法による発現確認

(2) PDX-1 遺伝子の強制発現、及び Ex4 による細胞形態への影響

PDX-1 プラスミドをリポフェクション法により骨髓細胞に遺伝子導入し培養した。また、培養液中に Ex4 を添加し、細胞の形状の変化について検討した。

骨髓細胞は培養開始時は紡錘形で線維細胞様の形状をしていたが、徐々に円形に変化するものが観察され、細長い線維芽細胞の他、比較的小型で棘状の突起を持つ細胞、比較的円形の細胞、神経細胞様の棘突起をもつ細胞など様々なタイプの細胞へと分化した(図 2)。やがて一部の細胞は集簇して細胞塊を形成し、培養 14 日・21 日には比較的円形の細胞塊から大きさは小さいものの膵島様の形状を示すものが出現した(図 3)。



培養 7 日目の
骨髓細胞

図 2 骨髓細胞の形状変化

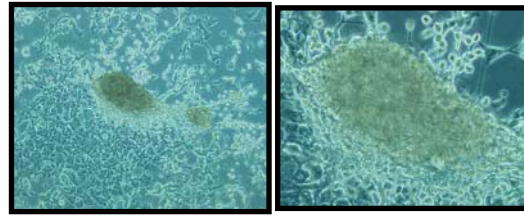


図 3 膵島様細胞塊の形成

(3) インスリン産生細胞の誘導

形成された細胞を回収し、PDX-1 発現ベクターをリポフェクション法により遺伝子導入した群(PDX-1 群)と非導入群(対照群)、および Ex-4 投与群(Ex4 群)と非投与群でそれぞれのカルチャーディッシュにおけるインスリン陽性細胞出現率を検討した。インスリン陽性細胞は、PDX-1 群のみならず非導入群にも認められ、出現率は $62.5 \pm 28.5\%$ と $40.0 \pm 27.1\%$ で有意な差を認めなかった(図 4)。

Ex4 の投与によりインスリン陽性細胞の出現率は約 1.5 倍増加し、PDX-1 の発現と Ex4 投与両方を行うと、80%以上のインスリン陽性細胞出現率が得られ、Ex4 シグナルの添加がインスリン産生細胞の発現を誘導することが示唆された。

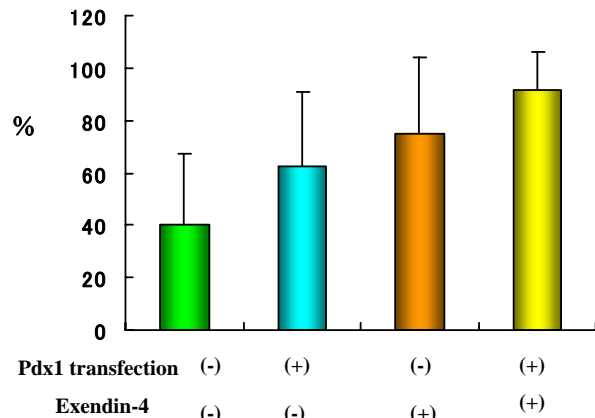


図 4 インスリン陽性細胞出現率

(4) β細胞特異的遺伝子の発現

インスリン産生細胞の mRNA を回収して cDNA を作成し、RT-PCR 法により β細胞に発現する PDX-1、Insulin1、Insulin2、Glucokinase (GK)、Glucose transporter 2 (GLUT2)、NeuroD、GLP-1 受容体(GLP-1R) の mRNA 発現について検討した。

インスリン陽性細胞ではいずれの遺伝子の発現も認められ、β細胞と同様の細胞機構を持っていることが示唆された。しかし、PDX-1 は強制発現群では、強い発現が得られたものの、遺伝子非導入群では弱い発現しか認められなかった。Ex4 によりインスリン産生細胞の発現が増加した状況下においても、

PDX-1 の発現は同様に僅かしか認められなかった。

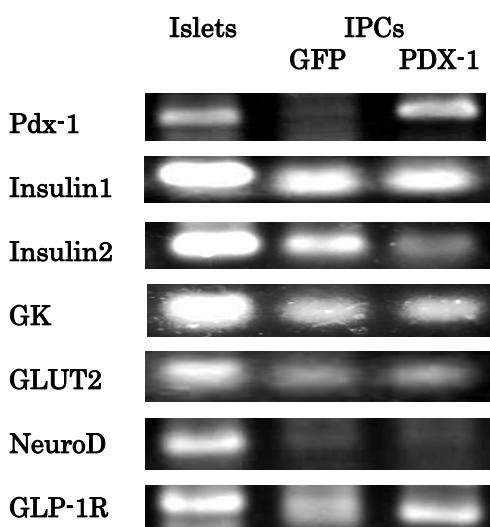


図5 mRNA 発現

(5)PDX-1、GLP-1R の発現時期の検討

インスリン産生細胞誘導の際、早期に一時的に PDX-1 の発現している可能性を検討するため、培養 1 週間後の PDX-1 発現を検討した。また、Ex4 の効果が発揮されるためには GLP-1 受容体の発現が必要であるため、GLP-1R が発現しているかについても検討した。その結果、PDX-1 は培養 1 週間目においてもほとんど発現が認められなかったが、GLP-1R は培養 1 週間で弱いものの発現がみとめられた(図 6)。

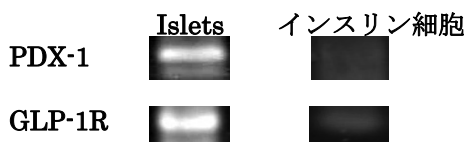


図6 培養 1 週間目の mRNA 発現

(6)培養 1 週間の mRNA 発現の検討

培養 1 週間におけるインスリン産生細胞のその他の遺伝子発現についても検討したところ、Insulin1 と insulin2 は発現が認められたが、GLUT2 や GK、NeuroD の発現は認められなかった(図 7)。

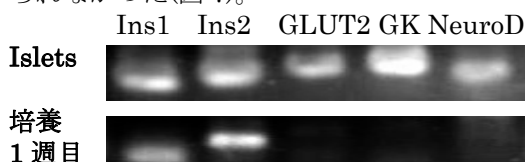


図7 培養 1 週目の mRNA 発現

(7)インスリン陽性細胞のインスリン分泌

インスリン産生細胞の 24 時間の培養液中

へのインスリン分泌量について検討した (Table2)。Ex4 はインスリン産生細胞を増加させるだけでなく、インスリン分泌量も増加した。

Table2

Insulin secretion into culture medium

Ex4(-)	0.18±0.04 ng/ml/24hr
Ex4(+)	2.27±1.30 ng/ml/24hr
P value	0.019

<考察>

骨髄に存在する、分化多能性を持った幹細胞からインスリン産生細胞の分化誘導について検討した。骨髄幹細胞からのインスリン産生細胞誘導に関して、膵β細胞の発生・分化に関わる転写因子である PDX-1 の強制発現は、インスリン産生細胞の出現率に大きな影響を及ぼさず、むしろインクレチンの一つ、GLP-1 アナログの Ex4 によりインスリン産生細胞の誘導率が上昇することが示唆された。PDX-1 は膵内分泌細胞の発生におけるマスターキー遺伝子と考えられているが、インスリン産生細胞の誘導には単一の転写因子の発現は不十分であるか、あるいはあまり関わっていない可能性も考えられた。Ex4 によりインスリン産生細胞の誘導が増加したことから、インスリン産生細胞の誘導にはインクレチンシグナルの方がより効率が高いことが考えられる。

[今後の展望]

GLP-1 アナログは、膵β細胞の分裂促進・アポトーシスの抑制作用が期待されており、ES 細胞や間葉系幹細胞などからインスリン産生細胞を誘導したことが報告されており (Surgery 138, 2005, J Endocrinol. 186, 2005)、今回の我々の検討でも単一の転写因子である PDX-1 の強制発現よりインクレチンシグナルを増強する方が、インスリン産生細胞の誘導効率は高いことが示された。

PDX-1 の遺伝子導入にインクレチンシグナルを併用することにより、さらに高いレベルでインスリン産生する再生細胞を作成することが可能なことが示唆されたことから、今後のインスリン産生細胞の誘導にインクレチンシグナルを併用することの有用性について、さらなる検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 浜本 芳之、稲垣 暢也

Pancreatic duodenal homeobox 1 expression
is not essential for differentiation of
mouse bone marrow mesenchymal stem cells
into insulinproducing cells

第 44 回 欧州糖尿病学会 (EASD)

2008 年 9 月 10 日

ローマ、イタリア

(2) 山根俊介、浜本芳之、原田範雄、豊田健
太郎、清野裕、稲垣暢也

GLP-1 receptor activation attenuates beta
cell damage in Akita mice

第 44 回 欧州糖尿病学会 (EASD)

2008 年 9 月 9 日

ローマ、イタリア

〔図書〕 (計 2 件)

(1) 「GLP-1アナログとは? GLP-1アナログ
の効果と副作用について教えてください」

肥満と糖尿病 216-218頁 2009年8巻2号

(2) 「再生医療におけるGLP-1の位置づけ」

Diabetes Frontier 特集:インクレチン-そ
の新しい展開と臨床応用

メディカルレビュー社 670-675 頁 2007 年

6 巻 18 号

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜本 芳之

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 50390787

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者