

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890150
 研究課題名（和文） 膵管上皮を起源とする膵ベータ細胞幹細胞の同定とその再生機構の
 解明
 研究課題名（英文） Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine
 beta-cells
 研究代表者
 稲田明理（Akari Inada）
 九州大学・医学研究院・特任准教授
 研究者番号：50448429

研究成果の概要：

本研究は、膵管上皮に存在する前駆細胞が 細胞に分化するメカニズムを明らかにすることが目的である。細胞に分化する前駆細胞は、様々な組織や細胞、あるいは膵臓内の細胞などに存在すると言われているが、申請者は、これまでの研究で膵管上皮にも前駆細胞があることを系統追跡実験により突き止めている。また再生時の膵管上皮は、膵臓発生に必須の転写因子が一過性に発現し、この発現が前駆細胞からインスリン陽性細胞になるために重要であることも他研究において知られている。

そこで本研究では、その転写因子を膵管上皮特異的にノックアウトし、機能解析を行って、膵管上皮に存在する前駆細胞から 細胞に分化するメカニズムを明らかにしていく。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：(1) 糖尿病 (2) 膵幹細胞 (3) ベータ細胞 (4) 再生 (5) インスリン産生

1. 研究開始当初の背景

周知の通り、日本では生活習慣病の一つである糖尿病が深刻な問題となっており、予備軍を含めると国民 6 人に 1 人

は糖尿病という大変高い割合で発症している。糖尿病の進行した重症患者に対しては同種膵ラ氏島移植術が必要であるが、深刻なドナー不足である上に、心

臓停止ドナーの膵臓から膵ラ氏島を回収しているため、膵ラ氏島の生存能力が低い等の限界がある。一方米国では、ドナー不足の問題は少ないが、長期成績が悪く、免疫抑制剤にも問題があり、やはり移植には限界があるとされている。そこで、幹細胞から新しい膵細胞を再生・増殖する「再生医療」が注目されており、膵細胞の供給源である幹細胞を同定することが最も重要であると考えられている。

新しい膵細胞の起源については、これまで様々な説があるが、Replication説とDuct説の二つに大別できる。Replication説は、胎児期に基になる膵細胞の数が決定され、その膵細胞が生後、膵島内で分裂を繰り返すことで増殖する(複製)というものである。対してDuct説は、上記の分裂・複製に加え、生後であれ必要に応じて膵管上皮(Duct)に存在する幹細胞で生産されるというものである。

Replication説は、その証明を試みた論文がMeltonらによって近年発表された(2004年Nature)。彼らは成体で一過性に膵島内の細胞をラベルしたところ、時間が経過してもその比率に変化がなかったことを根拠とし、新しい細胞は膵島内にある細胞以外からは生産・供給されないと結論づけている。しかし、膵島内にあるすべての細胞がラベルされた訳ではなく、一部の細胞のみがラベルされたため、膵細胞以外由来の細胞が膵島内の細胞数を増やすのに貢献していたとしても、最初から膵島内に存在していたがラベルされなかった細胞との区別は付けられなかった。また、膵島内の細胞数を分析するにあたって、比率を用いた間接的な分析と大まかな比率で結果を出した点で問題が残った。そのため、膵島内に存在する細胞以外から生産・供給されないことを証明できたとは言い難く、幹細胞の存在を完全に否定することはできなかった。

一方、Duct説は、膵島が膵管上皮細胞に隣接して出現・存在すること、急激に細胞数が増加する生後の成長期と成体の組織再生時の両時期で膵管上皮細胞にインスリン陽性細胞が出現すること、ヒトの膵管上皮細胞を長期間培養するとインスリン陽性細胞が得られることなどから、膵管上皮に前駆細胞が存在する可能性が示唆されてきた。但し、これらは別の細胞経路か、あるいは性質の違う細胞から分化した可能性を含んでおり、直接、膵管上皮から細胞に分化するという証明には至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、膵管上皮に存在する前駆細胞が細胞に分化するメカニズムを明らかにすることが目的である。細胞に分化する前駆細胞は、様々な組織や細胞、あるいは膵臓内の細胞などに存在すると言われているが、申請者は、これまでの研究で膵管上皮にも前駆細胞があることを系統追跡実験により突き止めている。また再生時の膵管上皮は、膵臓発生に必須の転写因子が一過性に発現し、この発現が前駆細胞からインスリン陽性細胞になるために重要であることも他研究において知られている。そこで本研究では、その転写因子を膵管上皮特異的にノックアウトし、機能解析を行って、膵管上皮に存在する前駆細胞から細胞に分化するメカニズムを明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) 追跡実験について

これまで、急激に膵細胞数が増加する生後の成長期と成体の組織再生時の両時期で膵管上皮細胞にインスリン陽性細胞が出現することや、ヒトの膵管上皮細胞を長期間培養するとインスリン陽性細胞が得られることなどが証明されてきたことから、申請者は、「既存の細胞そのものの分裂・複製に加え、必要に応じて膵管上皮に存在する前駆細胞からも細胞が生産されるのではないかと仮説を立てた。この仮説を直接的に証明するために、膵管上皮細胞をDNAレベルでラベルして膵管上皮から細胞への分化を追跡する実験(系統追跡実験)を行い、細胞を供給する前駆細胞が膵管上皮に存在することを証明しようとした。

(2) 再生時に膵管上皮中の幹細胞に発現する遺伝子について

本研究では膵管上皮細胞特異的に一過

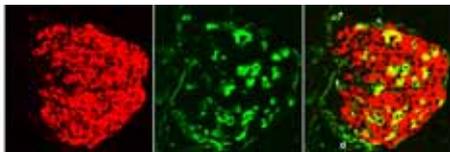
性に発現する転写因子をとらえてこれをノックアウトし再生時における役割を検討した。生後間もない時期と成体の両時期において検討した。生後間もない時期においては細胞の産生が著しいので、そのまま検討するが、成体の時期においては、薬剤と膵管結紮で組織を破壊した後に組織を再生させ、転写因子の発現を誘導した。

4. 研究成果

(1) 追跡実験について

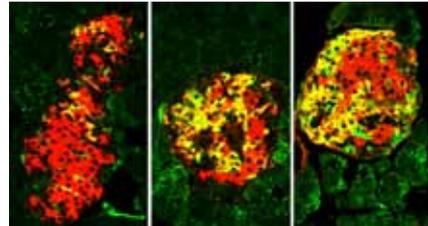
「生後、必要に応じて膵管上皮に存在する前駆細胞からも細胞が生産される」と仮説を立て、この仮説を直接的に証明するために、膵管上皮中の遺伝子 (Dev Dyn 2006) をラベルして膵管上皮から細胞への分化を追跡する実験 (系統追跡実験) を行った。そして、細胞の増加が最も急峻な成長期 (4週齢) に膵管上皮由来の細胞が膵島内に多く見られるという結果を得た。(写真: 赤インスリン、緑 -gal、黄ダブルポジティブ。膵管上皮由来の細胞は黄色で示される)。これは、成長期には膵管上皮からも細胞が生産されることを示唆し、加えて細胞を供給する前駆細胞が膵管上皮に存在することを証明したものである。

さらに、薬剤や injury model (膵切、duct



ligation) で再生を促進した場合、再生時に膵管上皮にインスリン陽性細胞が見られることから、「成体においても膵管上皮から細胞が生産される」と仮説を立て、成体において injury model (duct ligation) を作製し、上記と同様の方法で系統追跡実験を行った。結果、新しい組織が再生する時にも膵管上皮由来の細胞が膵島内に多く存在した。(写真: 赤インスリン、緑 -gal、黄ダブルポジティブ。膵管上皮由来の細胞は黄色で示される)。以上のことから、申請者は生後の成長期と成体の再生期の両時期において、膵管上皮から新しい細胞が膵島内へ供給される

ことを明らかにした (PNAS, 2008)。本研究は、2004年に大きな議論を呼んだ非幹細胞説の論文 (Nature, 2004) に真っ向から対立するもので、幹細胞説 (膵管上皮説) を直接的に証明した非常に重要なものと位置づけられる。



(2) 膵管上皮特異的に転写因子をノックアウトするマウスを作製し、解析した。ノックアウトマウスは2種類のマウスの掛け合わせで2世代目に生まれてくるが、仔が非常に少ない上、確率が8分の1と低いいため個体数を増やすことに苦労した。解析では、成長期と成体期に分けて週齢を追って生後の細胞数や血糖値の変化を検討した。通常発現しているものではないので、組織再生を促して一過性に発現させ正常血糖値を維持するなど工夫をした。その結果、膵管上皮に存在する前駆細胞からの供給が生体の正常血糖の維持に貢献していることが明らかとなった。

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)

[雑誌論文] (計2件)

(1) Inada A, Nienaber C, Katsuta H, Fujitani, Y, Morita R, Sharma A, Bonner-Weir S.

CA11 positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105: 19915-19919

(2) Bonner-Weir S, Inada A, Yatoh S, Li WC, Aye T, Toschi E, Sharma A. Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. Biochem Soc Trans 2008, 36: 353-356

〔学会発表〕(計4件)

稲田明理, Bonner-Weir S: 膵管上皮を起源とするベータ細胞再生機構

- (1) 分子糖尿病学会 2007年12月, 神戸
- (2) 日本糖尿病学会 2008年5月24日, 東京
- (3) 分子糖尿病学会 2008年12月8日, 東京
- (4) GCOE 2009年2月16日, シンガポール

〔図書〕(計1件)

稲田明理, 勝田仁, 永淵正法: 糖尿病治療の基本的な考え方と心理的アプローチ「トピックス: 膵島細胞の再生」2009
医学出版株式会社

〔その他〕

1. ホームページ等

(1)

http://www.med.kyushu-u.ac.jp/m_annai/topics/annai_back.php?id=119

(2)

http://www.med.kyushu-u.ac.jp/topics/topics/annai_back.php?id=114

2. 上記の成果(系統追跡実験)は新聞やインターネットに掲載され、九州大学ホームページでも取り上げられている。そして、女性科学者に贈られる奨励賞を受賞した(2009年6月授与式、東京)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲田明理 (Akari Inada)

九州大学・医学研究院・特任准教授

研究者番号: 50448429