

機関番号：17401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790733

研究課題名 (和文) 体性幹細胞を用いた糖尿病治療

研究課題名 (英文) Tissue stem cell therapy for diabetes

研究代表者

松本 志郎 (MASTUMOTO SHIROU)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70467992

研究成果の概要 (和文)：

難治性の糖尿病に対し膵臓移植・膵島移植が行われているが、拒絶反応や深刻なドナー不足など現行の移植治療には多くの問題点が残されている。そこで期待されている治療法の一つが幹細胞を用いた細胞移植治療である。当研究室では、これまでにマウス、ラット、ブタ、ヒト唾液腺組織から幹細胞を分離している。今回、ラット唾液腺由来前駆細胞をインスリン分泌細胞に分化誘導した後、糖尿病マウスへの細胞移植を行い、移植効果を検討した。その結果、全ての移植ラットで血糖値が改善した。また、分化したインスリン分泌細胞を選別する方法を開発した。この方法は他の体性幹細胞にも応用可能であり、幹細胞移植応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

[INTRODUCTION AND OBJECTIVE] Diabetes is a major public issue due to its high prevalence and long-term complications. The current treatment of exogenous insulin supply is not fully capable of achieving tight control of glucose regulation, leading to long-term complications. Therefore, therapies for diabetes remain a major challenge. Transplantation of pancreatic islets offers a direct treatment for type 1 diabetes. However, its widespread use is hampered by a shortage of donor organs. Many extant studies have focused on deriving β -cell progenitors from pancreas, somatic stem cells and pluripotent stem cells. In this study, we tried to stem cell transplantation for diabetes animals.

[Material and Method] We used diabetes models as Diabetes/ SCID mouse (Akita^{rag-/-} mouse, female, 6 to 8 weeks of age, Recipients 10, Control 3) and STZ treated pigs (Landress-Dyrock, bodyweights 7-10 kg, 8 to 10 weeks of age). The *Mody* mouse has a missense mutation of the insulin 2 gene (called Akita mice). Pigs are treated by STZ 4 weeks before transplantation. Salivary gland derived progenitors were differentiated into insulin producing cells by nicotinamide and GLP-1. Insulin producing cells were stained with Newport Green (NG) and purified by FACS. Purified cells were transplanted into subrenal capsule.

[Results] Blood glucose levels both in Akita mice and STZ pigs were improved (mice; 558 ± 68.7 vs. 323 ± 71.2 , $p < 0.001$, pigs; 486 ± 52.4 vs. 202 ± 21.1 , $p < 0.001$). Hypoglycemia was no detected in all examinations. After donor cells were removed, blood glucose levels were increased.

[Conclusion] In this study, salivary gland derived progenitor cells were differentiated into insulin producing cells, purified by FACS and improved blood glucose level. These findings will be helpful for transplantation with islet and other stem cells as iPS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

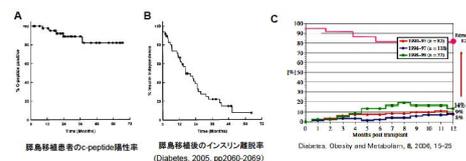
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：①移植・再生医療、②糖尿病、③細胞移植治療

1. 研究開始当初の背景

世界の糖尿病患者数は2億3000万人以上と報告されている（国際糖尿病連合発表、2006年）。糖尿病の大半は運動療法、食事療法、内服加療及びインスリン注射でコントロール可能である。しかし、小児の1型糖尿病、膵炎、手術による膵臓摘除などで完全にインスリン分泌能が枯渇した場合、インスリン注射ではコントロールできなくなることが知られている。このような場合、薬剤の適正な使用にも関わらず高血糖と低血糖を繰り返し、自宅などで気がつかれずに放置されると高血糖性ケトアシドーシス、低血糖性昏睡を引き起こし死に至る。このような急激な変化を何とか回避したとしても、慢性的な血糖コントロールの悪化は合併症を引き起こす。心筋梗塞、脳卒中、腎不全、網膜症、末梢神経障害が起こり、腎不全も透析開始後の予後が他疾患を原因とするものより不良である。このような患者に対し、膵臓移植・膵島移植が行われてきた。特に、カナダ、エドモントンのアルバータ大学のグループが確立したエドモントンプロトコールによる膵島移植法は従来の方法に比べて著しい移植後の血糖コントロールの改善を示した（下図C）。具体的には、複数（2人から3人）の脳死ドナー（組織提供者）から分離した膵島組織を短期間に、ひとりの1型糖尿病患者に移植するという膵島移植を7人の1型糖尿病患者に対して行い、その7人全員がインスリン離脱（インスリン注射が不要）となったとの結果が示された（2000年、New England Journal of Medicine）。この報告が発表されて以降、膵島移植は世界中に普及し、日本でも膵・膵島移植研究会を中心として膵島移植が進められてきている。2005年、2006年のDiabetes

スリン離脱率は移植後1年では80%を越えているが3年経つとおよそ24%に減り、5年経つと約10%と報告された（下図B）。しかし、5年後の血中c-peptide陽性率は80%を維持し、インスリン治療と併用することで血糖コントロールに大きく貢献していることが示唆された。



現在では膵島移植は内因性のインスリン分泌が枯渇し血糖コントロールが不良の重症インスリン依存状態糖尿病患者にとって、非常に効果的かつ安全性の高い治療法であると考えられてきた。しかしながら、インスリン離脱を目標とした場合、現在の技術では、複数回の移植が必要であること、複数回の移植に必要なドナーの数に限界があること、長期間の維持が困難であるなどの解決すべき問題点がある。これらの問題点を解決する方法の一つとして幹細胞を用いた移植医療が挙げられている。幹細胞を用いた移植治療は、造血幹細胞を中心に進んできたが、現在では胚性幹細胞であるES細胞、体性幹細胞では骨髄間葉系幹細胞、MAPC、side population、膵臓前駆細胞、肝臓前駆細胞、神経幹細胞など様々な細胞が分離され応用のための研究が進められてきている。これらの幹細胞全てがインスリン陽性細胞への分化能を持つことが示唆されている。しかし、これまでの報告では膵臓以外の臓器から分離された幹細胞の中で膵島移植に代替しうる十分なインスリン分泌能を示す幹細胞の存在は示されていない。

唾液腺は肝臓、膵臓と同じ起源を有する内胚

葉系の臓器であり、生体内の組織の中で最も再生能力の高い臓器の一つである。当研究室では既に、マウス (Hisatomi et al. Hepatology, 2004)、ラット (Okumura et al. Hepatology, 2003)、ブタ (投稿中)、ヒト (投稿中) の唾液腺組織から肝臓細胞および膵内分泌細胞に分化することができる幹/前駆細胞を分離した。この唾液腺由来前駆細胞 (salivary gland derived progenitor cell; SGP) は、平板培養上で自立的に三次元構造を構築し、その部分に一致して分化細胞が見出された。また、スフェリカル培養、ゲル内培養を用いて強制的に立体構造を構築させることでも分化が誘導された。ラットでは CCl₄/部分肝切除モデルラットへの移植を行い、肝臓への生着と分化を確認した。マウスでは FAH^{-/-}マウスの細胞移植を行い肝臓への生着と分化を確認した。また、in vivo に膵内分泌細胞への分化能を示した。しかし、肝臓系細胞への誘導と膵内分泌細胞への誘導のコントロールは容易ではなく細胞の”自律性“に依存したものであった。そこで、最初に分離され解析が進んでいるラット SGP を用いてインスリン分泌細胞をより多く分化誘導できる条件の確立と純化をおこなった。まず、膵β細胞の分化、増殖に関わる因子及び細胞外マトリックスの条件を検証した。その結果、分化誘導した全細胞の 30%まで分化誘導することが可能であることがわかった。更に、分化した細胞を純化するために Zn イオンキレート蛍光レポータ試薬”Newport green”を用いた。Zn は、プロインスリンからインスリンが切り出され、インスリン結晶ができる際に取り込まれる。エドモントンプロトコルで使用されている試薬 Dithizone は、この Zn を指標として膵β細胞を分離する目的で使用されている。この Zn イオンキレート蛍光レポータ試薬”New port green”は、Dithizone よりもβ細胞障害性が少なく、蛍光を発色するためフローサイトメトリー法で分離できるというメリットをもつ (J Histochem Cytochem 2001)。この方法を持ちSGP からインスリン産生細胞を純化することに成功した。また、予備実験の結果、純化されたインスリン産生細胞は糖濃度感受性にインスリンを分泌する能力があることがわかった。さらに、糖尿病治療に応用可能な高濃度のインスリンを分泌する能力がある細胞集団が含まれていることも分かった。これは膵臓前駆細胞を除いた他臓器由来の体性幹細胞を膵β細胞へ分化させた細胞の分泌能としては前例のない報告となる。更に、我々の研究室ではヒト唾液腺由来幹細胞を

用いた実験を想定し、治療効果判定の実験系として糖尿病モデルマウスと免疫不全マウスを高配させて糖尿病/免疫不全マウスを作成した。

2. 研究の目的

1 年目; 本研究では、既に我々の研究室で分離された膵内分泌細胞に分化可能であるラット唾液腺由来前駆細胞(ラット SGP)をβ細胞に分化誘導し、これを糖尿病モデル動物に対し移植実験を行う。これにより唾液腺由来前駆細胞の糖尿病治療効果を判定する。

2 年目; 分化誘導効率、純化効率、移植方法、移植部位、移植後生着率、血糖維持期間、補助治療について検討を行い、技術改善をおこなう。

2、3 年目; 更に、既に得られているマウス SGP、ブタ SGP についても応用可能な移植実験系の確立を目指す。具体的には糖尿病モデルマウスと免疫不全マウスを高配させて糖尿病/免疫不全マウスを作出し、これに対し 1、2 年目で得られた技術を用いて異種細胞移植実験を行うことで糖尿病治療効果を判定する。

3. 研究の方法

[移植モデル動物の確立]

移植後の急性免疫拒絶反応の抑制が移植効果に大きな影響を及ぼしていることは既によく知られたことであり、通常免疫抑制剤の投与がおこなわれている。本研究では、①免疫抑制剤によるコントロールは個体差が大きく実験評価にバラツキを回避する、②免疫抑制剤自体が腎毒性、β細胞毒性を示すことによるバイアスを回避する、③移植ドナー細胞の生着率を一定にすることで細胞移植効果を安定して評価する、ことを目的として免疫不全マウスを用いることとした。これにより、細胞の種を問わずにある一定の移植評価が可能となる。

更に、糖尿病モデル動物として AKITA マウス (C57BL/6-Ins2 AKITA/J) を用いる。糖尿病モデルは薬剤誘発性 (ストレプトゾトシン etc)、膵摘除、I 型糖尿病モデルなどが存在するが、①免疫不全マウスとの交配により I 型糖尿病モデルは糖尿病を発症しないあるいは病状が改善する、②ストレプトゾトシンは我々の予備実験から自然改善群が 50%以上あり適応には単体では十分でない、③膵摘除は 5%の残存膵臓があると糖尿病を発症しない、などの諸問題を回避するために様々なモデルマウスを検証した結果、この AKITA マウスを用いることとした。AKITA マウス (ヘテロ) は生後 6 週目までにはほぼ全てのマウ

スで血糖 500 以上を示し、多飲多尿、水腎症、糖尿病性腎症を呈する。1 年生存率は 50% である。移植後の症状、組織病変の変化、生存率についても評価可能である。また、末梢のインスリン抵抗性はないことが示されており、移植後の血糖改善効果の評価を簡素化するものと考えられる。実際に出生した AKITA/SCID マウス（作出後 1 年経過）の症状、腎病変、生存率に差を認めない。AKITA/SCID マウスは現在、出生数が少なく、AKITA/SCID マウスを移植に必要な数まで繁殖する。

[唾液腺由来幹細胞の維持培養]

ラット唾液腺由来幹細胞の樹立、維持培養を行う。具体的には硫酸アトロピン、ペンタバルビタール麻酔下に、下顎から頸部を正中切開し、片側の顎下腺の導管を確認し、4 号絹糸で二重結紮する。結紮 1 週間後、同様の麻酔下に脱血し、下顎から頸部を正中切開し、顎下腺を摘出する。採取した顎下腺は氷冷した Williams' E 培養液 (FCS 無添加) へ保存し、培養フードにて滅菌はさみで唾液腺を 1-2 mm 大に細切する。遠心管に入れた EGTA buffer 20ml に懸濁して、37°C で 20 分間、10 回/分の速度で回転震盪する。組織細片液は遠心 (100 xg、5 分、室温) し、上清は捨てる。ペレットを collagenase/hyaluronidase buffer に懸濁し、37°C で 40 分間、回転震盪する。100 xg、5 分、室温にて遠心分離し、ペレットを dispase solution に懸濁し、37°C、60 分間、回転震盪する。懸濁液を細胞濾過器にかけ、遠心分離 (100 xg、5 分、室温) する。細胞ペレットを Williams' E medium (serum free) に懸濁し、同培養液で 3 回洗浄する。上記の細胞ペレットを維持培養液に懸濁し細胞数を計測し、細胞浮遊液を Type I コラーゲンコート dish (IWAKI) に $1 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ cells/100mm dish の細胞密度で播種し、幹細胞をクローニングする。維持培養は Williams' E medium (10%FBS, ABF, EGF) を用いる。

[分化誘導]

維持培養中のラット SGP に対し、当研究室で合成した特殊無血清培地を用いて培養する (この培地組成は明らかにできない)。これにより、前駆細胞に β 細胞へ分化誘導する。予備実験からはこの分化効率は前細胞の 30% 程度である。

[インスリン産生細胞の純化]

分化誘導した細胞を 0.05% Trypsin-EDTA を用いて分散し、HBSS (without Ca^{2+} and Mg^{2+} , with HEPES, 2.5mM BSA, 3mM EGTA, 2.8mM Glucose) に懸濁し、 1×10^6 cell/ml の濃度に調整する。Newport Green DCF (Molecular Probes) を 10^{-6} M の濃度になるように添加し、37°C、30 分

インキュベートする。HBSS にて 2 回洗浄、遠心する。ペレットをステイニングメEDIUM に 1×10^6 cell/ml の割合で懸濁し、37°C、15 分インキュベートした後、FACSvantage SE を用いて陽性細胞分画だけを分離する。

[インスリン分泌細胞の純化]

分離したインスリン産生細胞を 96well plate に 1 cell/well の割合で播種し、培養する。培養には分化誘導特殊培地を用いる (現時点で内容は明らかにできない)。2-3 週間培養した細胞に対しラット c-peptide ELISA KIT (和光純薬)、ラットインスリン ELISA kit (Merckodia) を用いてインスリン分泌能を測定した。インスリン (c-peptide) 分泌量が多い well の細胞のみ培養を続け、更に 60mm dish に増殖したところで分泌試験を行う。これにより最もインスリン分泌能の高い細胞集団が得られることとなる。

[移植実験]

純化された細胞を用いて AKITA/SCID マウスに移植を行う。具体的には純化した細胞を 0.1% Trypsin-EDTA を用いて分散し、遠心分離をおこなう。次に、コラーゲンゲル (新田ゼラチン) を作成し、これに遠心して得られた細胞ペレットを懸濁し、移植まで 4°C に保存する。レシピエントマウス (AKITA/SCID) は、生後 10 週のマウスに対し、尿糖及び空腹時 (絶食) 血糖 500 以上のものを対象とする。ペンタバルビタール麻酔下に吸入酸素を投与する。投与後 30 分以上経過の後に手術台 (保温層つき) の上に左側臥位に固定し、左側腹部を 1-1.5cm ほど切開し、腹膜を傷つけないように腎臓を遊離する。腎臓は清潔布上にブルドック鉗子を用いて固定する。コラーゲンゲルに懸濁したドナー細胞をマイクロシリンジを用いて腎皮膜下に移植する。移植効果はエドモントンプロトコールにあるように経門脈的に肝臓へ移植する法が腎皮膜下よりも血糖コントロール、移植細胞の生着率、術後の維持期間にかんしてすぐれていることが知られている。しかし、今回は血糖値の改善が移植ドナー細胞によるものかどうかを厳密に観察する目的で腎皮膜下に移植する。このことにより、ドナー細胞は腎皮膜下に限局してとどまることができ、移植側の腎臓を摘出することで血糖値の悪化を確認し、更に移植細胞の組織像を確認することが容易となる。

[移植後の評価]

AKITA マウスは肥満及び末梢でのインスリン抵抗性は示さないことから移植後評価は以下の方法で行うこととする。①連日 2 回の血糖測定。測定前 3 時間の絶食期間を設けることとする。これは、AKITA マウスが一日 12 回 (食間 2 時間) の食事をとる性質から算出した。②血中ラットインスリン及び c-peptide 測定血糖測定時に行う。③1.5-AG を 1 回/2

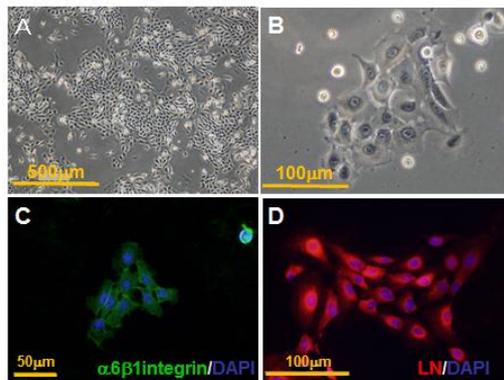
週および糖加ヘモグロビン測定を1回/月行う。④OGTT及びIVGTを行う。⑤Euglycemic Clamp studyを行う。⑥移植後1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月後それぞれにおいて移植側腎を摘出し、組織標本を作製して組織学的評価を行う。また、摘出後の血糖変化をみることにより移植細胞による効果を裏付ける。

4. 研究成果

①ラット唾液腺由来前駆細胞

分離された唾液腺由来前駆細胞は、 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリン陽性かつ細胞質内ラミニン陽性であった(図1C, D)。長径 $20 \mu\text{m}$ の敷石状の形態を呈した(図1A, B)。Type I コラーゲンコート dish (IWAKI) に培養し、100代以上の継代が可能であった。培養液は Williams' E medium (10%FBS, ABF, EGF) を用いた。

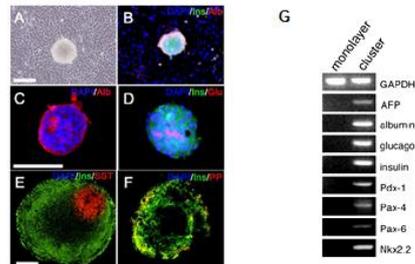
図1



②唾液腺由来前駆細胞は平板培養上で自律的に立体構造を構築する(図2A, B)。立体構造を構成する細胞はインスリン(緑)及びアルブミン(赤)陽性細胞を含んでいた(Fig. 1B)。唾液腺由来前駆細胞は立体構造を構築することで分化誘導可能であることが示されている。そこで細胞数 1000 個からなる細胞塊を spherical culture 法で作成した(Fig. 1B-F)。その結果、C: albumin(赤)、D: insulin(緑)/glucagon(赤)、E: insulin(緑)/somatostatin(赤)、F: insulin(緑)/pancreatic polypeptide(赤)陽性細胞が認められた。

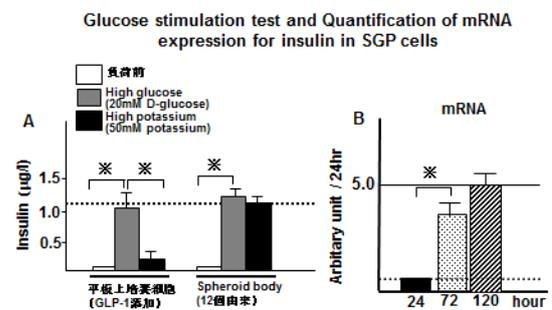
平板上の未分化細胞と立体培養後の分化細胞の RT-PCR を行った(図2G)。立体培養後に内胚葉系の分化マーカーの発現が認められた。

分化前と分化誘導後の SGP から mRNA を抽出し、mRNA レベルを測定した。その結果、誘導時間経過とともにインスリン mRNA が増加していた(図2H)。SGP を分化誘導培地 (GLP-1



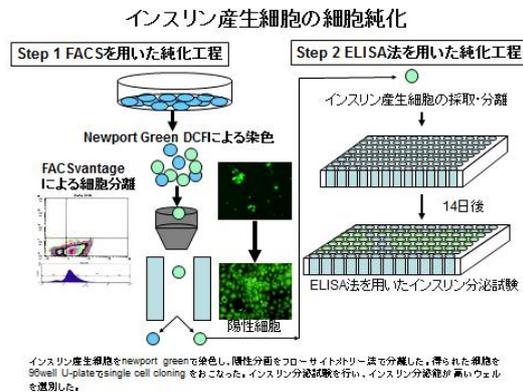
添加)にて培養後(左)、立体培養法(spherical culture)にて培養後にインスリン分泌能を ELISA 法で測定した。分化誘導後にインスリン分泌能が認められた(図3I)。

図3

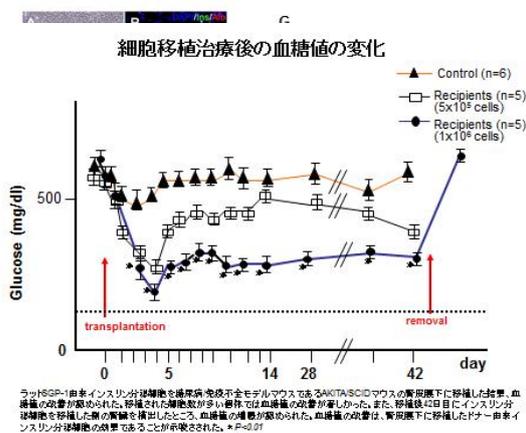


③Newport green 陽性細胞を FACSvantageSE を使用して cell-sorting した。細胞は R3-R4 の強陽性分画を採取した(図4左)。これらの細胞を 96well plate に播種し、分泌試験をおこなった(図4右)。その結果、インスリン分泌能の高い細胞集団を同定した。このインスリン分泌細胞集団を培養し移植した。

図 4



④ラット SGP-1 由来インスリン分泌細胞を糖尿病 / 免疫不全モデルマウスである AKITA/SCID マウスの腎皮膜下に移植した結果、血糖値の改善が認められた (558 ± 68.7 vs. 323 ± 111 , $p < 0.001$)。移植された細胞数が多い個体では血糖値の改善が著しかった。また、移植後 42 日目にインスリン分泌細胞を移植した側の腎臓を摘出したところ、血糖値の増悪が認められた。血糖値の改善は、腎皮膜下に移植したドナー由来インスリン分泌細胞の効果であることが示唆された。



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. Taiga Mochida, Takayuki Tanaka, Yasuko Shiraki, Hiroko Tajiri, Shirou Matsumoto, Kazutaka Shimbo, Toshihiko Ando, Kimitoshi Nakamura, Masahiro Okamoto, Fumio Endo, Time-dependent changes in the plasma amino acid concentration in 3 diabetes mellitus, *Molecular Genetics and Metabolism*, 査読あり、印刷中、2011。
2. Nakamura Y, Matsumoto S, Mochida T, Nakamura K, Takehana K, Endo F. Glycine regulates proliferation and differentiation of salivary-gland-derived progenitor cells. *Cell Tissue Res.* 査読あり、336(2) 2009 May 203-12.

〔学会発表〕 (計 5 件)

1. 発表者；松本志郎、発表課題；体性幹細胞の利用とその展望、学会名；宮崎リサーチカンファ、発表年月日；2010 年 11 月 2 日、宮崎大学医学部
2. 発表者名；Shirou Matsumoto、発表課題；Stem cell therapy for diabetes mellitus: salivary gland derived progenitors, 学会名；Japan therapy of gene therapy; the 16th Annual Meeting 2010、発表年月日；July, 1, 2010、発表場所；Tochigi-ken general culture center
3. 発表者；Nakamura Yasuko, 発表課題；Glycine regulates the cell proliferation and differentiation of tissue stem cells and mouse embryonic stem cells. 発表年月日；July, 1, 2010、発表場所；Tochigi-ken general culture center
4. 発表者名；松本志郎、中村賢二、発表課題；Overall outcomes of partial living transplantation for inherited metabolic diseases in South-Western Japan、学会名；九州小児科学会、発表年月日；2009 年 1 月 1 日、発表場所；福岡アクオス
5. 発表者；松本志郎、発表課題；新しいアミノ酸分析法を用いた疾患別バイオマーカー検索の試み、学会名；第 108 回九州医師会学会 (九州小児科学会)、発表年月日；2008 年 11 月 16 日、発表場所；熊本県熊本市ホテルテルサ
6. 研究組織
(1) 研究代表者
松本 志郎 (MASTUMOTO SHIROU)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70467992