

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591137

研究課題名（和文） 膵腺房細胞をソースとした膵β細胞再生の分子基盤の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular basis of pancreatic beta-cell regeneration from pancreatic acinar cells

## 研究代表者

南 幸太郎 (MINAMI KOHTARO)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80334176

研究成果の概要（和文）：膵β細胞（インスリン分泌細胞）を人工的に誘導できれば糖尿病の再生医療に繋がる可能性がある。本研究では、ヒト膵外分泌細胞からインスリン分泌細胞が誘導できることを示した。また、膵β細胞がある種の条件下では脱分化-増殖-再分化できる特性を有していることを見出した。さらに、膵β細胞は生体内においてもある一定の時期には生理的に非β細胞からも新生することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Generation of surrogate beta-cells (insulin-secreting cells) is a promising approach toward development of regenerative medicine in diabetes mellitus. In this study, it has been shown that insulin-secreting cells can be generated from human pancreatic exocrine cells. It also has been found that pancreatic beta-cells change their phenotype (dedifferentiation, proliferation, and redifferentiation) under certain conditions. In addition, it has been revealed that new pancreatic beta-cells are generated by neogenesis from non-beta-cells in vivo after birth.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：エネルギー、糖代謝異常、再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療は、不可逆的な損傷を受けた組織・細胞を、何らかの方法で新たな組織・細胞で置換して治癒しようとするものである。糖尿病では、膵臓をまるごと再生する必要はなく、インスリンを分泌する膵β細胞さえ再生できれば、高血糖を是正して深刻な合併症を阻止することが可能であるので、再生医療に対する期待は大きい。膵β細胞はきわめて

大量のインスリンを産生・蓄積し、血糖の上昇に伴い、必要に応じてインスリンを分泌する機能を有する高度に分化した細胞である。糖尿病の細胞移植治療に応用可能な再生膵β細胞は、実際の膵β細胞と質的にも量的にも同等の機能を獲得している必要があるにもかかわらず、過去の多くの再生膵β細胞に関わる研究では、新たに誘導された細胞のインスリン分泌機能の詳細についてはほとんど

ど解析されてこなかった。これまでの報告を見直してみると、データの存在するほぼ全ての例で実際のβ細胞と比較してインスリン産生能が低く、生理的刺激に対するインスリン分泌応答も不十分であり、実用的なレベルには達していないと判断される。また多くの場合、分化誘導のメカニズムがまったく不明で、その方法も再現性に乏しい。一方で、現実的な細胞移植治療法として膵島移植が脚光を浴びてきたが、インスリン治療からの離脱には複数回の移植が必要なこともあり、ドナー不足は深刻である。研究代表者らは、膵島移植の副産物として大量に入手することができる膵腺房細胞に着目して研究を続けてきた。その過程で、膵腺房細胞から世界で初めて膵β細胞と質的に同等のインスリン分泌機能を有する細胞を *in vitro* で誘導することに成功した。別の研究グループは、ある種の転写因子を発現するアデノウイルスをマウスの膵臓に注入すると、膵腺房細胞が膵β細胞と区別の付かない細胞へ *in vivo* で変化することを報告した。糖尿病再生医療を実現するための次の段階として、膵腺房細胞からインスリン分泌細胞への転換の分子メカニズムを解明して、*in vitro* で完全に分化した膵β細胞を誘導するための分子基盤を解明することが重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

膵腺房細胞からインスリン分泌細胞への転換の分子メカニズムを解明して、*in vitro* で完全に分化した膵β細胞を誘導するための分子基盤を解明する

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト外分泌組織からのインスリン分泌細胞の誘導

ヒト膵外分泌組織は、膵がんなどで膵摘出術を受けた患者（計 32 例）からインフォームドコンセントに従い提供を受けた。摘出膵のうち、肉眼的に正常と思われる部分を分離してコラゲナーゼ消化後、残存膵島はジチゾン染色で除去した。単離膵外分泌細胞は 0.5% 血清と 20 ng/ml EGF を含む RPMI-1640 培地で約 2 週間浮遊培養し、real-time RT-PCR による遺伝子発現プロファイルやインスリン分泌反応を指標として細胞特性の変化を評価した。

### (2) 膵β細胞表現型の可塑性

マウス胎児膵細胞をフィーダーとして成体マウスの膵β細胞を培養した。MIP-GFP（マウスインスリンプロモーターによって膵β細胞のみで緑色蛍光タンパク質 GFP を発現する）マウスと CAG-mRFP（CAG プロモーターによって全身で赤色蛍光タンパク質 mRFP を発現する）マウスを用いて cell tracing や cell sorting を行い、培養膵β細胞

の表現型や遺伝子発現の解析を行った。

### (3) 膵β細胞の運命追跡

マウスインスリン 2 遺伝子座にタモキシフェン誘導性に Cre を発現する遺伝子を導入したノックインマウス (Ins2-CreER) と、ROSA26 遺伝子座に YFP を導入したノックインマウス (R26R-YFP) を交配した Ins2CreER/R26R-YFP ダブルノックインマウスを作成し、このマウスを利用して膵β細胞を任意のタイミングで標識して、様々な条件下で追跡、解析した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト膵外分泌細胞からのインスリン分泌細胞の誘導

我々は、膵島移植の際に副産物として大量に入手可能な膵外分泌細胞がインスリン分泌細胞に分化転換できることをマウス、ラットで報告してきたが、今回、ヒトの膵外分泌細胞を用いた検討を行った。32 例のうち 21 例で細胞分離に成功し、そのうち RT-PCR による評価の可能であった 19 例すべてにおいて Pdx1 の発現誘導を認めた。残りの 11 例では、慢性膵炎による組織の線維化が顕著なため正常細胞の分離ができなかった。インスリンの発現は RT-PCR による評価の可能であった 19 例のうち 11 例で認められ、これらの例では膵β細胞を特徴づける遺伝子（グルコキナーゼ、SUR1、Kir6.2、MafA、NeuroD）の発現も誘導された。一方、膵外分泌細胞を特徴づけるアミラーゼ、エラスターゼの発現は消失したことから、ここで用いた条件での培養によって本来の外分泌細胞としての特性を失ったものと考えられた（図 1）。

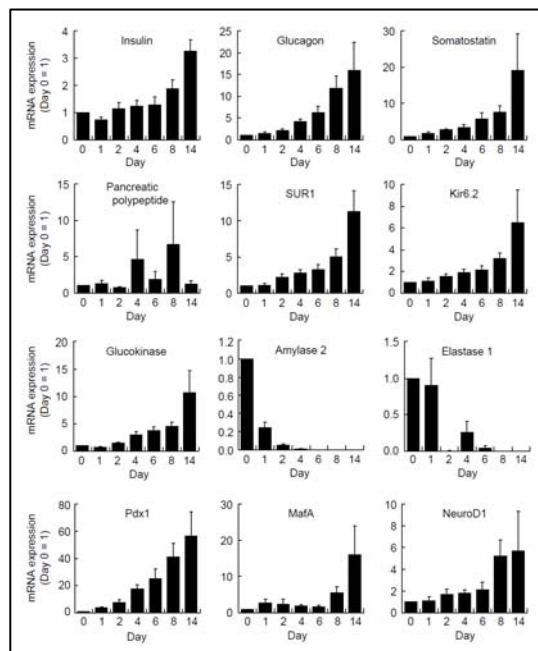


図 1. 遺伝子発現の変化

取得した細胞数の特に多かった 4 例について

ではインスリン分泌反応を検討することができた。その結果、グルコース、高濃度 KCl、グリベンクラミドによるインスリン分泌反応が認められた (図 2)。

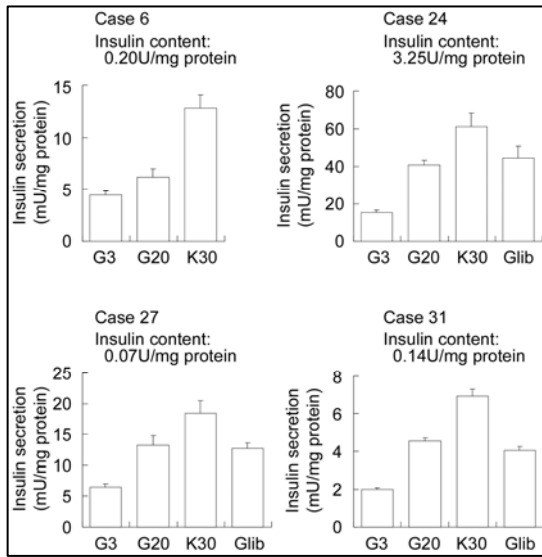


図 2. インスリン分泌反応

以上の結果から、ヒト膵外分泌細胞は *in vitro* で膵内分泌細胞へ分化転換できることが実証された。

### (2) 膵β細胞表現型の可塑性

膵β細胞はある種の条件下で脱分化、増殖するとの報告があるが、その際、膵β細胞がどのような表現型の変化を起こすのか、また、一旦脱分化した膵β細胞が再分化することができるのかなど、詳細についてはよくわかっていなかった。本研究では、MIP-GFP マウスと CAG-mRFP マウスを交配し、全身で mRFP を発現し膵β細胞では mRFP と GFP を発現する MIP-GFP/ CAG-mRFP マウスを作出した (図 3)。

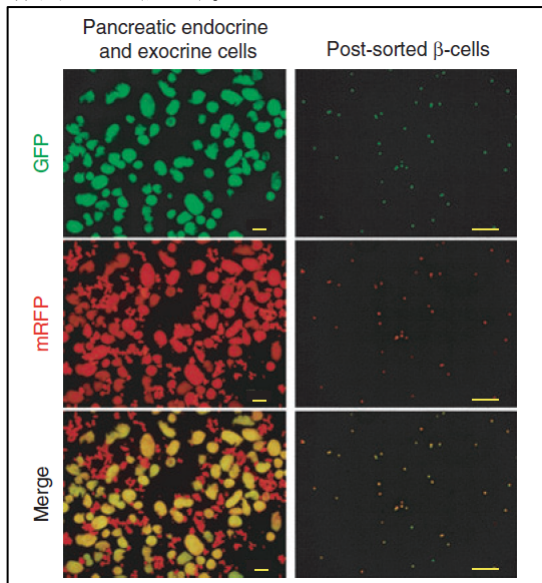


図 3. MIP-GFP/CAG-mRFP マウス膵細胞

このマウスでは、膵β細胞を GFP を指標に FACS により単離することが可能で、しかも、培養中に脱分化してインスリンの発現を失っても、mRFP は発現し続けるので膵β細胞を追跡することができる。成体 MIP-GFP/CAG-mRFP マウスから単離した膵β細胞を野生型マウスの胎児膵細胞をフィーダーとして培養したところ、GFP の発現が消失して mRFP のみを発現するようになり、インスリン発現を失って脱分化したことが示された。このとき、脱分化した膵β細胞の一部は増殖マーカーを発現し、実際に FACS によって解析したところ、約 30% の細胞が G2/M 期にあることが判明した。また、脱分化細胞は紡錘形を示し、ネスチンやビメンチンを発現していたことから、上皮-間葉転換 (EMT) 様の表現型変化を遂げたものと考えられた。さらに、脱分化した膵β細胞は、膵島様の細胞塊を形成し、この細胞塊をピックアップしてニコチナミド存在下で培養するとインスリンを再発現した (図 4)。以上の結果から、膵β細胞はある条件においては、表現型を変化させ、脱分化-増殖-再分化する能力を持つことが明らかとなった。この特性をさらに詳しく解析し、表現型変化のメカニズムが解明できれば、膵腺房細胞からのインスリン分泌細胞再生への応用も可能であると考えられる。

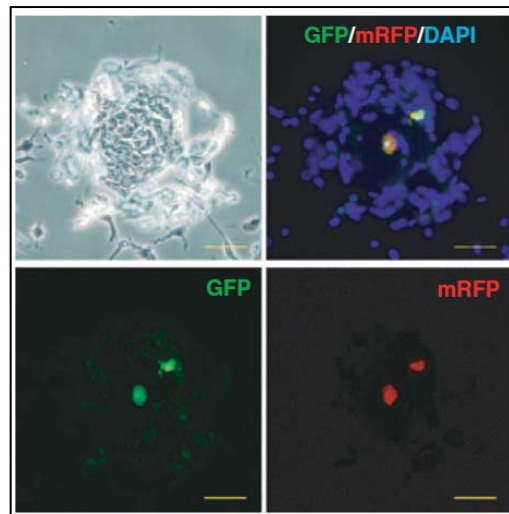


図 4. 脱分化膵β細胞の再分化

### (3) 膵β細胞の運命追跡

膵β細胞の量は生涯にわたってダイナミックに維持されている。マウスを用いた研究から、出生直後には膵β細胞量が劇的に増加し、成体においても一定の割合でターンオーバーが生じ、条件によっては再生現象も認められることが知られている。出生後の膵β細胞量の維持のメカニズムとしては、膵β細胞自体の自己複製が主要なものであり、非β細胞からの新生はほとんどないと言われているが、確定的な見解は存在しない。そこでは



誘導性の Cre/loxP システムを利用し、出生後の膵β細胞の特性を解析することを目的とした。Ins2-CreER/R26R-YFP マウスでは、タモキシフェンを投与することで任意の時期に膵β細胞を選択的に標識することができる。成体における解析では、6週齢のマウスにタモキシフェンを投与して膵β細胞を標識し、その後12カ月まで追跡した。出生後から成体における膵β細胞量増加の解析では、出生直前のE18.5に母親へのタモキシフェン投与により標識を行い、出生後56日目まで膵臓切片を作製して標識細胞を観察した。成体マウスでは標識後12カ月まで、膵β細胞の標識率に有意な変化は認められず、膵β細胞の維持における非β細胞の寄与はほとんどないものと考えられた。しかし、出生前の胎児の膵β細胞を標識して追跡したところ、出生2週間目までは膵β細胞の標識率に有意な変化はなかったが、4週目には有意に低下した(図5)。

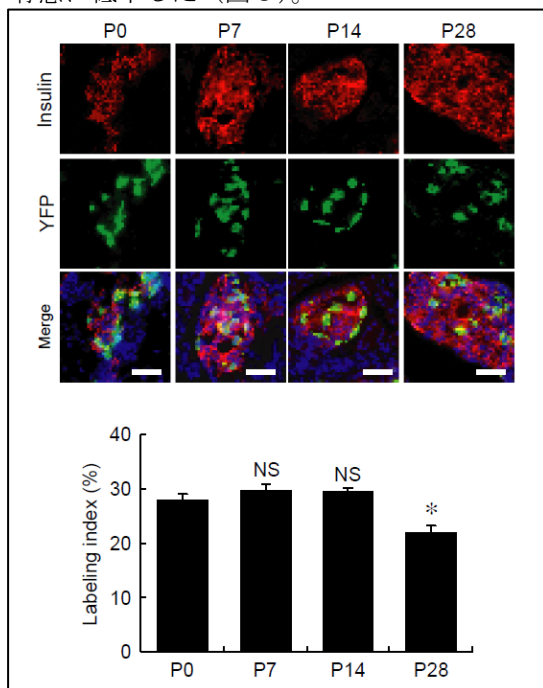


図5. 膵β細胞の標識、追跡結果

このことから、出生後2週から4週の時期には、膵β細胞の自己複製に加えて、非β細胞からβ細胞への新生も寄与する可能性が示唆された(出生後4週間で膵β細胞量は約55倍に増加している)。また、このとき、YFPで標識されない数個から数十個のインスリン陽性細胞のクラスターが散見され、これは膵β細胞新生を表していると考えられた。このクラスターの起源を調べるために、膵管を選択的に標識するレクチンであるDBAとインスリンの重免疫染色を行ったところ、DBA結合細胞の近くにクラスターが多いという知見は得られなかった。また、出生後56日目まで観察したところ、標識率は28日目と

同程度であったことから、出生後28日以降には膵β細胞の新生はほとんど生じないと考えられた。以上の結果から、膵β細胞の新生は、主に出生後2週から4週の間を生じ、その起源として膵管以外の可能性がある。この研究を通じて、実際の膵β細胞の分化、新生のメカニズムが明らかとなれば、膵腺房細胞からのインスリン分泌細胞を誘導する際にも役立つものと考えられる。

#### 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)

[雑誌論文] (計12件)

英文 (査読有)

- 1) Matsubara T, Kagawa A, Minami K, Hosooka T, Kitazawa S, Takahashi K, Tamori Y, Yokoi N, Watanabe M, Matsuo E, Nishimura O, and Seino S. PGRN is a key adipokine mediating high-fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. *Cell Metab* 15(1):38-50, 2012
- 2) Seino S, Shibasaki T, and Minami K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest* 121(6):2118-2125, 2011
- 3) Minami K, Doi R, Kawaguchi Y, Nukaya D, Hagiwara Y, Noguchi H, Matsumoto S, and Seino S. In vitro generation of insulin-secreting cells from human pancreatic exocrine cells. *J Diabetes Invest* 2(4):271-275, 2011
- 4) Nakamura K, Minami K, Tamura K, Iemoto K, Miki T, and Seino S. Pancreatic β-cells are generated by neogenesis from non-β-cells after birth. *Biomed Res* 32(2):167-174, 2011
- 5) Minami K, Miyawaki K, Hara M, Yamada S, and Seino S. Tracing phenotypic reversibility of pancreatic β-cells in vitro. *J Diabetes Invest* 1(6):242-251, 2010
- 6) Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, Takahashi H, Mizoguchi A, Uriu Y, Mori Y, Miyazaki J-i, Miki T, and Seino S. Rim2α determines docking and priming states in insulin granule exocytosis. *Cell Metab* 12(2):117-129, 2010
- 7) Iwasaki M, Minami K, Shibasaki T, Miki T,

Miyazaki J-I, and Seino S. Establishment of new clonal pancreatic  $\beta$ -cell lines (MIN6-K) useful for study of incretin/cAMP signaling. *J Diabetes Invest* 1(4):137-142, 2010

- 8) Zhang C-L, Katoh M, Shibasaki T, Minami K, Sunaga Y, Takahashi H, Yokoi N, Iwasaki M, Miki T, and Seino S. The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science* 325(5940):607-610, 2009

和文 (査読無)

- 9) 南幸太郎: 膵 $\beta$ 細胞の機能分化とインスリン分泌細胞の再生誘導、胆と膵 32(11):1219-1225, 2011
- 10) 南幸太郎、清野進: 膵外分泌細胞から新たな膵 $\beta$ 細胞の誘導、*Diabetes Frontier* 21 (4):497-501, 2010
- 11) 南幸太郎、清野進: 膵外分泌細胞からインスリン分泌細胞の誘導、*実験医学* 28 (9):1368-1372, 2010
- 12) 南幸太郎、清野進: 膵 $\beta$ 細胞の特性と再生インスリン分泌細胞に必要な機能、*月刊糖尿病* 1 (4):26-34, 2009

[学会発表] (計 19 件)

招待講演

- 1) Minami K. Development of tools for beta cell research: pancreatic beta cell lines and gene-modified animals. Beta Cell Workshop 2011: Programming Beta Cell Development, Impairment and Regeneration (Helsingør, Denmark), 2011.10.24
- 2) Minami K. Pancreatic exocrine-to-endocrine transdifferentiation *in vitro*. Danish-Japanese Workshop "Molecular Diabetology" (Copenhagen, Denmark), 2011.10.21

国際学会

- 3) Minami K, Tamura K, Iemoto K, Nakamura K, and Seino S. Self-replication is not the only mechanism of maintenance of pancreatic beta-cell mass after birth. 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Lisbon, Portugal), 2011.9.13
- 4) Tamura K, Minami K, Nakamura K, Iemoto K, and Seino S. Elucidation of pancreatic

$\beta$ -cell fate using inducible Cre/loxP system. The 3<sup>rd</sup> Asian Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (Beijing, China), 2011.7.23

- 5) Iwasaki M, Minami K, Shibasaki T, Miki T, Miyazaki J-I, and Seino S. Induction of cAMP responsiveness from cAMP unresponsive  $\beta$ -cells by formation of pseudoislets. 70th Scientific Sessions, American Diabetes Association (Orlando, USA), 2010.6.26, 27 Poster & President
- 6) Iwasaki M, Minami K, Shibasaki T, Miki T, Miyazaki J-I, and Seino S. Establishment of new clonal pancreatic  $\beta$ -cell lines (MIN6-K) useful for study of incretin/cAMP signaling. The 2<sup>nd</sup> Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (Okayama, Japan), 2010.5.28
- 7) Minami K, Miyawaki K, Seino S. Tracing phenotypic reversibility of pancreatic beta-cells *in vitro*. 14th International Congress of Endocrinology (Kyoto, Japan), 2010.3.30

国内学会

- 8) 南幸太郎、糠谷大樹、萩原慶明、清野進: ヒト膵外分泌細胞からのインスリン分泌細胞の誘導、第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (札幌)、2011.5.20
- 9) 田村香楠子、南幸太郎、中村維文、家本啓祐、三木隆司、清野進: 誘導性Cre/loxPシステムを用いた膵 $\beta$ 細胞の運命追跡、第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (札幌)、2011.5.20
- 10) 松原稔哉、三田綾子、南幸太郎、田守義和、北澤莊平、渡辺真、松尾英一、西村紀、清野進: 新規アディポカイン Progranulin (PGRN)の同定とインスリン抵抗性ならびに肥満における役割、第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (札幌)、2011.5.20
- 11) 岩崎真宏、南幸太郎、柴崎忠雄、三木隆司、宮崎純一、清野進: 膵 $\beta$ 細胞のメタボローム解析、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)、2010.12.10
- 12) 岩崎真宏、南幸太郎、柴崎忠雄、中山泰宗、原田和生、馬場健二、三木隆司、宮崎純一、福崎英一郎、清野進: 膵 $\beta$ 細胞

- 内代謝とインクレチンによるcAMPシグナルとの相互作用、第53回日本糖尿病学会年次学術集会（岡山）、2010.5.27
- 13) 安田貴雄、柴崎忠雄、三木隆司、高橋晴美、宮崎純一、南幸太郎、清野進：インスリン顆粒の開口放出機構におけるRim2 $\alpha$ の役割、第53回日本糖尿病学会年次学術集会（岡山）、2010.5.27
  - 14) 南幸太郎、清野進：シンポジウム「膵内分泌機能の再生～移植から再生医療まで～」：分化転換によるインスリン分泌細胞の分化誘導、第53回日本糖尿病学会年次学術集会（岡山）、2010.5.27
  - 15) 浅野優、石崎勝彦、南幸太郎、清野進：膵前駆細胞としてのDBA結合細胞の特性解析、第82回日本生化学会大会（神戸）、2009.10.22
  - 16) 南幸太郎：膵外分泌細胞からの膵 $\beta$ 細胞再生、第14回静岡健康・長寿フォーラム（静岡）、2009.10.3
  - 17) 南幸太郎、萩原慶明、浅野優、石崎勝彦、清野進：膵組織前駆細胞の誘導と特性解析、第52回日本糖尿病学会年次学術集会（大阪）、2009.5.23
  - 18) 岩崎真宏、南幸太郎、柴崎忠雄、川原類、三木隆司、宮崎純一、福崎英一郎、清野進：膵 $\beta$ 細胞メタボローム解析によるインスリン分泌機構の解明、第52回日本糖尿病学会年次学術集会（大阪）、2009.5.22
  - 19) 南幸太郎、清野進：膵腺房細胞における分化転換のシグナリングメカニズム、第82回日本内分泌学会学術総会（前橋）、2009.4.23

〔図書〕（計1件）

- 1) 南幸太郎、清野進：再生膵 $\beta$ 細胞ソースとしての膵外分泌細胞の有用性、糖尿病学 2010 診断と治療社 p. 66-73, 2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：血中インスリン抵抗性及び糖尿病マーカープログラニュリン、採血試料中のプログラニュリン濃度の分析方法、及び、インスリン抵抗性を改善及び糖尿病を改善又は抑制する物質のスクリーニング方法

発明者：清野進、南幸太郎、西村紀、三田綾子、松原稔哉、渡辺真

権利者：神戸大学

種類：特許

番号：特願 2010-195871

出願年月日：2010年9月1日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南 幸太郎 (MINAMI KOHTARO)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80334176

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし