

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791374

研究課題名(和文) Direct Reprogramming を応用したインスリン産生細胞の誘導

研究課題名(英文) Instruction of the insulin-producing cell by Direct Reprogramming

研究代表者

岩上 佳史 (Iwagami, Yoshifumi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60597441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来幹細胞(ADSC)にAdenovirus vectorを用いて膵臓転写因子(MafA, PDX-1, Ngn3)を導入しDirect reprogrammingすることでインスリン産生細胞を誘導することが可能かどうかを検討したが、in vitroにおいても、また経門脈的に肝臓へ移植するin vivoにおいても、インスリンの発現を確認することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Direct reprogramming by introducing pancreatic transcription factors (MafA, PDX-1, Ngn3) into adipose tissue derived stem cell (ADSC) could not induce insulin-producing cell in vitro and in vivo (limited hepatic transplantation), in my study.

研究分野：消化器外科・肝胆膵移植

科研費の分科・細目：外科学一般・移植外科学

キーワード：ADSC MafA PDX-1 Ngn3 Direct Reprogramming インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫反応により膵内分泌細胞が破壊されている1型糖尿病では、インスリン強化療法が導入されるが、血糖コントロールは困難を極め、重症低血糖発作により生命に危険がおよぶ治療抵抗性の難病である。またその合併症(糖尿病性神経障害・網膜症・腎症)は慢性期に至ると必発となり、特に糖尿病性腎症は本邦における透析導入原因の第一位である。

この1型糖尿病の根治療法として膵島移植が行われている。膵島移植はドナー膵臓より膵島のみ分離し門脈内に点滴移植する方法で、レシピエントには低侵襲な方法であるが、通常1人のレシピエントをインスリンフリーにするためには3人のドナーからの膵島移植が必要である。また移植後5年の遠隔成績ではインスリン離脱率が約10%にまで低下してしまう(Ryan EA, et al. Diabetes 2005)のが現状で、本邦の極端なドナー不足を考慮すると1型糖尿病根治のためには再生医療を応用したインスリン産生細胞の誘導法を確立することが必須である。

近年、再生・発生に関する細胞・分子生物学の飛躍的進歩により細胞移植療法に使えるインスリン産生細胞を分化・誘導する膵島再生医療に大きな期待が寄せられている。その中で、脂肪組織由来幹細胞(adipose-tissue derived stem cells, 以下ADSC)は多分化能を有する(Zuk PA, et al. Tissue Eng 2001)ことから、ドナーソースとして有用であるとの報告が散見される。In vitroでADSCに分化誘導を促進する成長因子を加えることで、インスリン分泌が認められるようになることが証明されている(Okura H, et al. J Artif Organs 2009)が、実際のインスリン分泌能は非常に低いものであるため、すぐには糖尿病根治を目指した臨床応用に用いることは出来ないのが現状である。これまでのわれわれのdataでも、単にADSCを移植するだけではインスリン産生細胞の再生・誘導まではできないことを確認している。

さて、膵臓の細胞の分化と転写因子の関係が最近の研究成果により急速に解明されてきている。まず膵芽細胞にPDX-1という因子の発現がみられ、その後内分泌前駆細胞に分化するとNgn3、NeuroDという因子の発現がみられるようになる。その中でMafAという因子は細胞に特異的に発現する因子であり注目を集めている。近年、インスリン遺伝子の発現をコントロールする領域にMafAを中心とした複合体が重要な役割を果たしていることが報告されている(Zhao L, Matsuoka TA, et al. J Biol Chem 2005, Matsuoka TA, et al. Mol Endocrinol 2007, Kaneto H, Matsuoka TA, et al. Adv Drug Deliv Rev 2009)。さらに膵臓の転写因子であるMafA, PDX-1, NeuroDをadenovirus vectorを用いて頸静脈より投与することで肝細胞においてインスリン産生細胞が誘導

されることが近年報告されている(Kaneto H, Matsuoka TA, et al. J Biol Chem 2005)。またNeuroDをその上流の転写因子であるNgn3に変更し、MafA, PDX-1, Ngn3の組み合わせにして膵臓へ直接導入することで、膵外分泌細胞から膵内分泌細胞である細胞へ分化・誘導が確認できることが報告されている(Zhou Q, et al. Nature 2008)。

このようは背景から、申請者はADSCに膵臓転写因子(MafA, PDX-1, Ngn3)を用いてDirect reprogrammingすることでインスリン産生細胞を誘導することを立案した。ADSCの経験とMafAを中心とした膵臓転写因子の技術を併せ持つ施設は他に少なく、大阪大学としてオリジナリティの高い研究であると考えている。

## 2. 研究の目的

(1) マウスをドナー・レシピエントとして、ADSC採取および膵島分離を行う。膵臓転写因子は最も強力に分化を誘導すると考えられるMafA, PDX-1, Ngn3の組み合わせで、Adenovirus vectorを用いてADSCに遺伝子を導入する。In vitroおよびin vivoでADSCをインスリン産生細胞に分化させ、最終的には糖尿病化したマウスの肝臓に経門脈的に移植し、その有効性とoptimal conditionを確認する。

(2) マウス実験における基礎研究にてoptimal conditionを決定した後、ヒトADSCおよびヒト膵島を用いて臨床応用における有効性と安全性を確認する(ヒトADSCを採取、研究に用いることはすでに倫理委員会にて承認されており、さらにヒト膵島についてはHAB研究機構を介しアメリカより輸入使用できる許可を得ている)。本研究プロジェクトは単に基礎研究を行うだけでなく、実際にヒトのマテリアルを用いて実践的研究を行い、臨床応用へのブレイクスルーを探索する。

(3) われわれの先行研究にて、糖尿病化したマウスの腎被膜下にADSCと膵島を混合移植(Hybride islet transplantation)すると、ADSCの血管新生作用および抗炎症作用により、血糖を正常化するのに必要な移植膵島を減量することができる(Ohmura Y, et al. Transplantation 2010)ことを確認しており、今回の研究成果を先行研究に生かし、Direct reprogrammingしたADSCと膵島との混合移植も検討する予定である。

## 3. 研究の方法

(1) ADSCのin vitro direct reprogrammingの解析

本研究の第一段階として、マウスより採取したADSCを用いてin vitroでのdirect reprogrammingの効果、有効性、optimal

condition を解析・検討し、その結果を踏まえてヒト ADSC を用いて、その有効性・再現性を検証する。

野生型 C57BL/6J mouse の皮下脂肪を用いて、低濃度コラゲナーゼ処理を行い ADSC を採取する。in vitro で培養保存した ADSC に Adenovirus vector を用いて膵臓転写因子 (MafA, PDX-1, Ngn3) を同時に導入する。細胞内に転写因子が導入されたかどうかは、あらかじめ vector に導入されている GFP 蛋白の発現を蛍光顕微鏡を用いて観察することで、24 時間後にはほぼ 100% 導入されていることが確認できる。ADSC がインスリン産生細胞へ分化・誘導されたかどうかは、in vitro でインスリン遺伝子の発現量を real time PCR を用いて経時的に解析することで確認する。

またマウス基礎実験で ADSC の direct reprogramming の有効性が確認できれば、Cytori Therapeutics 社製 Celution System を用いてヒト ADSC を採取し、ヒトマテリアルで有効性を検証する。

#### (2) ADSC の in vivo direct reprogramming の解析

本研究の第二段階として、マウスより採取した ADSC を用いて in vivo での direct reprogramming の効果、有効性、optimal condition を解析・検討し、その結果を踏まえてヒト ADSC およびヒト膵島を用いて、その有効性・再現性を検証する。

研究課題 1 にて in vitro で MafA, PDX-1, Ngn3 を導入した ADSC を経門脈的にマウス肝臓へ移植する。その際の移植手技に関しては、病理組織学的評価などが効率的に行えるように、Limited hepatic lobe transplantation (Yonekawa Y, et al. Transplantation 2006) を用いて行う。移植細胞数は Mesenchymal Stem Cells In Solid Organ Transplantation (MISOT) study group の報告 (Dahlke MH, et al. Transplantation 2009) を基に  $0.5 \times 10^6$  個で行う。評価はそれぞれ POD1, POD5, POD7, POD10, POD14, POD28 のポイントで行う。続いて systemic なインスリンを除き移植した ADSC が産生するインスリンのみを高感度に測定できる in situ マウス肝灌流モデル (rat liver model: Sugano T, et al. J Biochem 1978) を作成し、回収した灌流液は Insulin ELISA kit を用いてインスリン産生量および glucose response を解析する。摘出した移植肝は免疫組織化学染色を行い病理組織学的な検討を行うとともに、移植肝全体を lysate にした後、酸アルコールによるインスリン抽出および m-RNA 抽出を行いインスリン含量の測定を追加する。さらに移植前の培養保存した膵島と ADSC を超音波破砕機にて処理した後、超微量分光光度計を用いて DNA 含量を測定し、移植する膵島と ADSC の DNA 含量をあらかじめ測定しておくことで、必要な投与量の決定を行う。

#### (3) 糖尿病化マウスを用いた direct reprogramming ADSC の insulin potential 解析

まず Streptozotocin 220mg/kg を腹腔内投与し糖尿病化 (血糖値 350mg/dl 以上) したマウスに経門脈的に膵島を移植し血糖値の正常化が図れる必要膵島量を決定する。あらかじめ研究課題 2 において膵島と ADSC の DNA 含量を測定しているため、理論的に必要膵島量に相当する potential が得られる direct reprogramming ADSC 量を計算したうえで、糖尿病化マウスに移植する。評価方法としては連日の血糖測定、POD7, 14, 28 の耐糖能試験、POD1, POD5, POD7, POD10, POD14, POD28 の測定ポイントにおける in situ 肝灌流、免疫組織化学染色、m-RNA 測定を用いて direct reprogramming ADSC の potential と経時的変化を解析する。

#### (4) 移植後の腹腔内パルス投与を用いた糖尿病メンテナンス

糖尿病化マウスに対して経門脈的に direct reprogramming ADSC を肝臓へ移植した後は、direct reprogramming ADSC を繰り返し腹腔内パルス投与することで糖尿病のメンテナンスできると考えており、その効果、有効性について検証する。

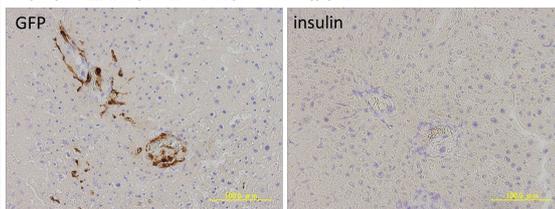
### 4. 研究成果

#### (1) in vitro での解析

in vitro で培養保存した ADSC に、GFP を導入した Adenovirus vector を用いて膵臓転写因子 (MafA, PDX-1, Ngn3, 以下三因子と略記) を同時に導入した。蛍光顕微鏡を用いて観察することで、24 時間後にはほぼ 100% 導入されていることが確認できた。インスリンの発現量を qRT-PCR 法を用いて解析したところ、インスリン mRNA の発現量は、コントロールと比較して三因子を導入した ADSC で上昇していたが、有意差までは認められなかった。

#### (2) in vivo での解析

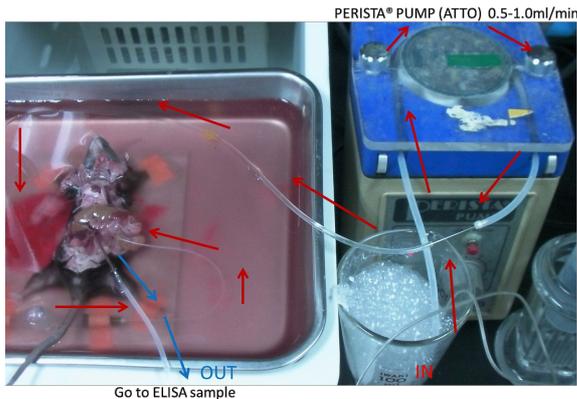
臨床応用を考慮し経門脈的に肝臓へ ADSC を移植した。また後の病理組織学的検討が行い易いように小葉へのみ移植する limited hepatic lobe 移植を行った。移植後 6 日目に移植肝小葉を採取し、ホモジェナイズしたサンプルを用いて qRT-PCR を行ったところ、移植前と比較して約 700 倍のインスリン mRNA



の発現量上昇を認めた。in vivo の環境下でインスリン mRNA の発現上昇が得られること

が示唆されたため、インスリンタンパクを同定する目的で移植後7日目に採取した移植肝小葉を用いて病理組織学的検討を行った。移植した ADSC の局在は GFP を免疫染色することで確認することができた。しかし現時点では未だ、GFP の染色が得られた部位と同部位へのインスリン染色は確認できていない。

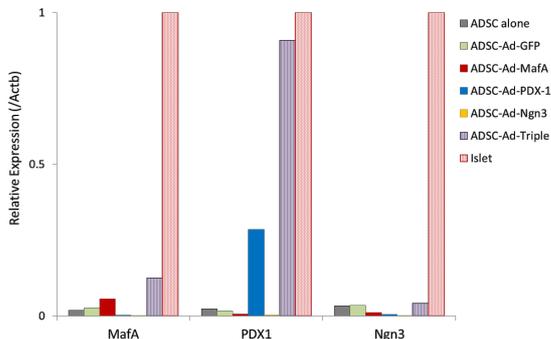
続いて免疫染色の検出限界より、さらに微



量のインスリンタンパク量を検出する目的で、in situ 肝灌流モデルを用いてインスリン ELISA を行った。ポジティブコントロールとして分離膵島の移植を行った肝臓を灌流したところ、高グルコースに変更後速やかなインスリンの上昇を認めた。しかし現時点では未だ、三因子を導入した ADSC を移植した肝臓からはインスリンの上昇を確認できていない。

### (3) in vitro での解析における再検討

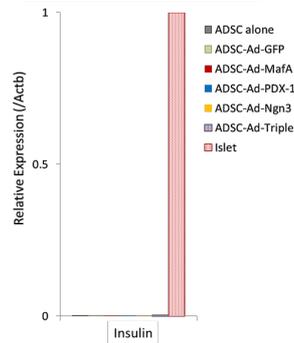
qRT-PCR (expression of transcription factors)



当初 Adenovirus vector を用いて ADSC に三因子を同時に導入し、GFP の蛍光を観察することで導入の確認を行っていたが、再検討時には三因子を別個(または同時)に導入し、qRT-PCR 法を用いて導入の確認を行った。すると MafA と PDX-1 においては導入によりそれぞれ mRNA の有意な上昇が認められるのに

対し、Ngn3 においては上昇が認められなかった。結果、Ngn3 の Adenovirus vector は work していないことが判明した。

qRT-PCR (expression of insulin)



またインスリン mRNA に関しては、三因子を別個(または同時)に導入したどの ADSC においても有意な上昇を認めることはなかった。現在までに ADSC へ PDX-1 を単独導入することで in vitro

または in vivo におけるインスリンの発現を確認できたとする報告例があるが、本研究では再現することができなかった。また Ngn3 の Adenovirus vector に関しては、work していなかったため再度作成を行っている。

(4) 申請時計画していた「糖尿病化マウスを用いた direct reprogramming ADSC の insulin potential 解析」および「移植後の腹腔内パルス投与を用いた糖尿病メンテナンス」については検討することができなかった。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩上 佳史 (IWAGAMI YOSHIFUMI)

大阪大学医学部附属病院・医員

研究者番号：60597441