

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591856

研究課題名(和文)ドナーソースとしての膵外分泌細胞の有用性に関する検討

研究課題名(英文)The potential of pancreatic exocrine cells using for the donor source on islets transplantation

研究代表者

関口 悟 (SEKIGUCHI, SATOSHI)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：20312580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：Ngn 3, Maf-AおよびPDX-1の遺伝子配列を確認し、蛍光マーカーを搭載したアデノウイルスベクターを作成、AR42J細胞に感染させ、蛍光法を用いて各遺伝子が導入されたかどうかを検証した。再三にわたるウイルス感染を経た細胞は活性が弱く、長期培養には耐えられなかった。そこで3つの遺伝子を同時に導入可能なウイルスベクターを作成し、遺伝子導入を試みた。ウイルスベクター自体のサイズが若干大きくなった影響がほとんど遺伝子導入することはできなかった。同時に膵外分泌細胞の分離、および細胞単離、純化を試みたが、各段階を経ることに細胞活性は低下し、更に内分泌細胞の混入を避けられなかった。

研究成果の概要(英文)：We found out the gene order each of the Ngn 3, Maf-A and PDX-1 suitable for the gene transfer, and made three adenovirus vectors with the fluorescence maker. Then each adenovirus Vectors were transfected to AR42J cells. After three adenovirus transfections, we could not find the survived and gene transfected cells on long-term culture. So we made the other adenovirus vector contained three gene orders, the new vector was transfected on AR42J cells. A few survived cells without fluorescence were found. We speculated that the size of the new vector affected the low gene transfer efficiency. Simultaneously, we tried to find out the method of the isolation and purification of exocrine cells of pancreas. After the each step, the number of survived cell decreased. Also we couldn't avoid from the Contamination of endocrine cells especially beta cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：移植外科学 膵島移植

## 1. 研究開始当初の背景

現在我国にもインスリン投与に生命を委ねている1型糖尿病患者が、約15万人以上いると言われている。しかし一部の患者は頻回の自己血糖測定と強化インスリン療法によっても、依然として低血糖性昏睡による致死の危険に曝されている。また、インスリン療法による厳格な血糖コントロールでは、血管病変に基づく心筋梗塞、脳卒中、腎不全、失明、神経障害といった長期合併症の併発を完全には阻止出来ない事が明らかとなった。そのため、これら糖尿病患者を治癒へ向かわせる根治療法として、膵臓移植が臨床的に確立された。しかし、ドナー不足、手術侵襲が大きいこと、必要ではない外分泌組織の附随移植が合併症の原因となること、また拒絶反応時に移植グラフトの除去が必要であること等から、それに代わる低侵襲な治療法として、膵島細胞のみ膵臓より分離して移植する膵島移植の確立が強く望まれてきた。このような状況下、2000年に新しい膵島移植療法として「エドモントンプロトコール」が報告され社会的に注目を集めた。<sup>(1)</sup>ところが、インスリンフリーを得るためには2もしくは3回の移植が必要であり、5年後のインスリン離脱率は膵臓移植と比べ低下していることがわかり、更なる改良を加える必要があることが判明した。<sup>(2)</sup>グラフトロスの主な原因は、移植初期の非特異的炎症反応により多くの移植膵島が脱落するためである。そこで我々はドナーからの移植膵島量を補う目的で、通常は廃棄されてしまう外分泌組織、膵管細胞からインスリン分泌細胞を誘導し、同時に移植することにより良好な血糖コントロール

が得られるのではないかと考えた。以前より、外分泌組織、膵管細胞の中に細胞の前駆細胞が存在すると報告されているが、ごく少数であること、分離が困難であることなどよりこの前駆細胞を移植細胞として使用するには限界があるものと思われていた。そこで膵島移植時に膵島分離の際に廃棄されている外分泌組織、膵管細胞をインスリン分泌細胞へとリプログラミングすることにより有効活用できないかと考えた。細胞を分化、誘導する細胞内転写因子はPDX-1, NeuroD1, Pax4, Nkx2.2, Ngn3, MafA等多数報告されているが、どの細胞内転写因子が必須因子であるかは長らく判明していなかった。2008年にMeltonらは、adult mouseの外分泌組織に注射針を用いてNgn3, MafAおよびPDX-1の3因子を発現するアデノウイルスをカクテルとして投与すると、同3因子を発現した成熟外分泌細胞の約20%がinsulin産生細胞へと分化転換することを報告した。その際の分化転換を来した細胞群は、組織学的にはインスリン陽性細胞単独もしくはインスリン陽性細胞の小塊として認められ、その他のグルカゴン、ソマトスタチン等の他の内分泌細胞への分化した細胞は認められず、膵島としての形態を確認できなかったとしている。<sup>(3)</sup>しかし投与を受けた糖尿病誘発マウスは耐糖能異常が改善されており、この分化転換した細胞群は、何らかの形で耐糖能の改善に寄与しているものと思われ、十分に臨床応用可能な技術となりうる可能性を秘めている。その他、同様に外分泌細胞、膵臓への遺伝子導入によるインスリン分泌細胞作成の報告は以前より多数あり<sup>(4)(5)(6)</sup>、実際の膵島移植の際にこの技術を臨床応用できないかと考えた。ところが、

膵臓組織への直接注入法は、膵炎、膵液婁等の重大な合併症が問題となるので臨床応用は不可能であると考えられる。そこで臨床応用を可能とするため膵島分離の際の外分泌組織に対して、in vitro において Ngn3, MafA および PDX-1 を発現させインスリン産生細胞に分化転換させるシグナルを与えた後、生体内に移植することにより同様の状態を作り出すことが可能ではないかと考えた。Meltonらの報告同様、生体外での膵島形成の報告は現在のところなく、三次元培養等の生体内に存在する特殊な環境が必要ではないかと議論されている。そこで処置後早期に移植をおこない、リプログラミングした細胞を生体内に戻すことにより生体内の何らかの因子または環境により分化、成熟を強く促進させ、膵島の形成を促進できるのではないかと、さらにその膵島形成に必要な特殊な環境もしくは因子についての手がかりについて検討できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

同種同系ラットより摘出した膵臓より外分泌組織、膵管細胞を分離し、Ngn3, MafA および PDX-1 を発現するアデノウイルスとともに培養、感染させた後、STZ 誘発糖尿病ラットに移植し、糖尿病が改善するかどうか検証するとともに、移植組織にインスリン陽性細胞もしくはインスリン陽性細胞塊が出現してくるかどうかを検討する。また移植後経時的に組織像を検討し、in vitro において分化転換を正常に起こすための因子の発見、および in vivo における膵島形成に必要な因子を組織学的、遺伝子学的に探索する。さらに臨床応用上問題となるアデノウイルスによる

遺伝子導入法に代わる可能性のあるリポフェクション法またはエレクトロポレーション法による遺伝子導入により、同様のリプログラミングが可能かどうか検討する。

## 3. 研究の方法

(1) Ngn3, MafA, および PDX-1 のマウス DNA 配列を検索、確認した上、個々に蛍光マーカーを搭載した組換えアデノウイルスベクターの作成を依頼。

(2) 膵外分泌細胞由来の AR42j 細胞を購入し単純培養に至適な条件を確認の後、細胞濃度、ベクターの濃度の条件を変化させ遺伝子導入を試みる。

(3) 蛍光マーカーが導入された細胞を用いて RT-PCR により遺伝子導入、発現状況の確認を行う。

(4) 実際のマウスを用いて、外分泌細胞の純粋分離、培養の至適条件を確認するため、コラゲナーゼ、プロテアーゼ、ディスパーゼ等の濃度、比率等を変化させ、分離の至適条件の確認、純化、および細胞培養の至適条件を確認する。

(5). (1)(2)(3)におけるアデノウイルスベクターを用いた転写因子の導入が可能であること、(4)において、純粋な外分泌細胞が得られ、ある程度の長期培養が可能な場合、同細胞を用いて遺伝子導入、発現精査を行った上、STZ 誘発一型糖尿病マウスを作成し、腎皮膜下に細胞移植し、血糖値の推移の確認、移植腎を摘出し、移植細胞のインスリン等の様々な抗体を用いて免疫染色により種々の因子の発現状況を確認する。

#### 4. 研究成果

平成23年度当初に Ngn3, MafA, および PDX-1 のマウス遺伝子配列を確認し、個々の転写因子をのせた蛍光マーカ―を搭載したアデノウイルスベクターを作成、膵外分泌細胞由来の AR42j 細胞を購入、培養条件を確認の後、培養条件およびウイルスベクターの濃度を変化させ遺伝子導入を試みた。いずれの因子も、ウイルス高濃度では、死細胞数が多く、低濃度では低導入という結果であった。導入された細胞も数が極端に少なかったが、念のためなんとか細胞を集めて、転写因子の発現状況を RT-PCR にて確認してみたが、確認できなかった。また、マウスの外分泌細胞の分離、純化の至適条件を確認するため、マウス膵臓をコラゲナーゼで分離の後、濃度勾配遠心にて内分泌細胞と分離したが、外分泌細胞の層と思われる部分には、腺管細胞、外分泌細胞の混在した状態となり、腺管細胞を選り分けたものを使い培養を試みるも、培養早期の死滅細胞が多く、そのため病集を起こしてしまい、長期培養はできなかった。

平成24年は、各因子の遺伝子配列を以前使用したものと若干異なる長さのベクター再度作成、ARj42 細胞を使用し遺伝子導入実験を行った。前回のベクターを使用したときと比べ、見た目若干導入効率は上がったようにおもわれたが、死細胞の割合は多く、アデノウイルスベクターを使用している影響と考えられた、同時に3因子の導入を試みたがほとんどの細胞が死滅してしまい、必要な3因子を発現する細胞は得られなかった。また、マウス外分泌細胞の分離、純化の至適条件を確認すべく実験を繰り返しているが、依然、細胞分離の過程で、腺管細胞、粉々に砕けた内分泌細胞の混入をさけられないこと、他員細胞にするためのディスペーゼにより細胞が傷み培養できなくなることなど、細胞

活性の高い、均一な外分泌細胞を蹴ることは困難であった。

平成25年度は、手法を変え、3因子同時に遺伝子導入可能なアデノウイルスベクターを昨年度使用した配列をもとの作成し、遺伝子導入実験を行った。昨年度の細胞濃度、ウイルス濃度を元に、ARj42 細胞に遺伝子導入を試みた。昨年度と比較してほとんど蛍光は認められず、ベクターサイズが若干大きくなっていることが影響しているのか、ほとんど導入できた細胞は認められなかった。しかし導入後の死細胞数の割合は、何度も感染を繰り返す3因子の導入方法と比べ、少なくなった。その少数の蛍光マーカ―陽性の細胞を培養開始するも、長期培養には耐えられなかった。遺伝子導入に若干の前進はあったものの未だ、必要な遺伝子をすべて発現し、長期培養に耐えられ、遺伝子導入の効果を判定できる細胞は得られていない。同種腎皮膜下移植実験へと進むため引き続き膵外分泌細胞を単離、培養をする方法を模索している。現在のコラゲナーゼ、ディスペーゼ、濃度勾配遠心を用いた細胞分離条件の中で一番効率のより方法で得られた内分泌由来の細胞をできる限り除いた細胞集団を用い、エルトリーターを用いて目的の外分泌細胞、腺管細胞、内分泌由来細胞を高純度に分離することが可能であるか検証中である。

#### 5. 主な発表論文等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

関口 悟 (SEKIGUCHI, SATOSHI)  
東北大学・病院・講師  
研究者番号：20312580

##### (2) 研究分担者

後藤 昌史 (GOTO, MASAFUMI)

東北大学・未来科学技術共同研究センター  
教授

研究者番号： 50400453

赤松 順寛 (AKAMATSU, YORIHICO)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号： 50302112

里見 進 (SATOMI, SUSUMU)  
東北大学・総長  
研究者番号： 00154120

小川 則彦 (OGAWA, NORIHIKO)  
東北大学・病院・助教  
研究者番号： 60617108