

機関番号：32666

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591639

研究課題名 (和文) 膵臓外幹細胞による膵β細胞の分化誘導の検討

研究課題名 (英文) Investigation of differentiation of extrapancreatic stem cells to pancreatic β-cells

研究代表者

工藤 光洋 (KUDO MITSUHIRO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20256978

研究成果の概要 (和文) : 幹細胞からインスリンを産生分泌する膵β細胞に分化誘導し、患者へ分化細胞を移植する糖尿病治療法が研究されている。この幹細胞治療法では大量の細胞が必要と考えられ、インスリン分泌機能を保持した分化細胞を大量に培養・維持する必要がある。我々はβ細胞を球状の細胞塊として浮遊培養すること (スフェロイド形成細胞) により、インスリン分泌関連分子発現を制御し、インスリン分泌能や糖尿病治療薬への感受性を増強する事が可能であることを示した。

研究成果の概要 (英文) : The differentiation of stem cells to pancreatic β-cells, which produce and secrete insulin, is confirmed by several experimental studies, and the transplantation of such differentiated cells into patients with diabetes is actively studied. Such stem cell therapy will therefore require a large number of differentiated cells to obtain sufficient curative effects. We demonstrated that spheroid formation and suspension culture of β-cells enhanced the insulin secretory capacity and sensitivity of β-cells to sulfonylurea drugs such as tolbutamide via functional changes in insulin-secretion-related molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵β細胞、3次元培養、インスリン分泌、細胞接着

1. 研究開始当初の背景

インスリン療法を受けている重篤な糖尿病患者では、膵島移植は血糖値の安定化に寄与すると考えられている。しかし膵島移植が成功しても完全にインスリン離脱は難しい場合があり、膵島移植はドナー不足という深刻な問題も抱えている。

そこで、幹細胞や iPS 細胞からのβ細胞へ

の分化誘導法の研究が盛んに行われている。

また膵臓組織内の膵導管細胞とその周囲の細胞が膵島細胞の前駆細胞である可能性や、膵臓外の細胞では、骨髄細胞、肝臓、小腸などに、膵島細胞へ分化可能な体性幹細胞が存在する可能性も報告されている。

しかしインスリンの産生能や分泌能を十分に備えた分化細胞を得る分化誘導法は未

だ完全に確立されたとは言えない状況である。また、患者への治療応用を考えると、治療には大量の分化細胞が必要と考えられるが、分化誘導した細胞を大量培養し維持する培養方法も未だ確立されていない。

以上のように臨床応用に十分な質と量の細胞を得る為には、(1) 膵β細胞への分化誘導に適した細胞の選択、(2) 再現性の高い分化誘導法の確立、さらには(3) 臨床応用に足る十分な細胞数を確保するための培養条件の最適化が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

近年、細胞間接着がβ細胞機能に影響することが報告されており、我々はMIN-6β細胞株を細胞低接着培養プレート上で3次元培養し、膵島様のスフェロイド細胞(pseudoislets)を作出し、β細胞の機能について単層培養したMIN-6β細胞(monolayers)との間での(1)β細胞関連分子や細胞間接着分子のmRNA発現、(2)高濃度グルコースに対するインスリン分泌能、(3)蛍光抗体法など組織学的手法によるβ細胞関連分子や細胞間接着分子の局在について検討する。また(4)グルコース応答に対するAktリン酸化についても比較検討する。

3. 研究の方法

(1)MIN6β細胞の培養

25 mM glucose, 200 mM L-glutamine, 10% FBS 含有 DMEM で培養。

スフェロイド形成(pseudoislets)にはMIN6細胞をULTRA LOW CLUSTER PLATE (Corning Life Science, Acton, MA)で培養した。

(2)Real-time PCR

TaqMan gene Expression Assay Probe

Foxa2, Mm01976556_s1

Insulin-2, Mm00731595_gH

PDX-1, Mm0043565_m1

GLUT-2, Mm00446224_m1

E-cadherin, Mm00486906_m1

(3)インスリン分泌量の定量

MIN6β細胞を25 mM グルコース含有

Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer (KRBB)で1時間 preincubate し、その後25 mM グルコース含有 KRBB で1時間 incubate した。その後、培養液中のインスリン量はレビス・インスリン-マウス ELISA (Sibayagi) で測定し、一方細胞を溶解し総たんぱく量を測定した。インスリン分泌量は ng insulin/μg protein/hr として計算した。

(4)Aktリン酸化の検出

抗 Akt リン酸化抗体, p-Akt (Cell Signaling Technology)

抗 Akt 抗体, Akt (pan) (Cell signaling Technology)

(5)蛍光抗体法による観察

細胞を4%paraformaldehyde in PBS で固定後、以下の抗体を用いて蛍光抗体法を施行した。

C-peptide (Cell Signaling Technology), GLUT-2 (MILLIPORE), E-cadherin (abcam), caveolin-1 (Cell Signaling Technology) 蛍光抗体法を施行した。蛍光像は confocal microscope Digital Eclipse C1 (Nikon Instech) で観察し画像データを取得した。

(6)エポソニ包埋トルイジンブルー染色によるスフェロイド(pseudoislets)の観察

pseudoislets を2%グルタルアルデヒド固定、四酸化オスミウム処理し、エポソニ包埋切片をトルイジンブルー染色した。

4. 研究成果

(1)スフェロイドの位相差像

MIN6β細胞は、通常の接着性培養プレートではプレート底面に接着し単層に増殖する。一方、細胞低接着性の細胞培養プレートでは islet 様のスフェロイドを形成(pseudoislets と呼ばれる)した。

今回の培養条件では、培養24時間後からpseudoislets が形成され、培養3~8日には長径が50~200 μm 程度に達した。Fig. 1. に単層培養細胞(monolayers) (Fig. 1-A) とスフェロイド形成細胞(Pseudoislets) (Fig. 1-B)を示す。

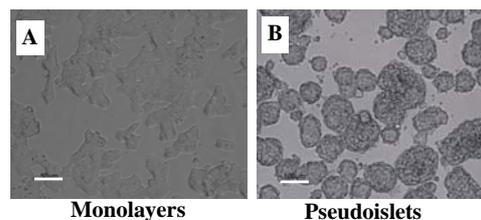


Fig. 1 MIN6β細胞の位相差像

(A) MIN6β細胞の単層培養の位相差像を示す。(Bar = 50 μm)

(B) スフェロイド形成細胞(pseudoislets)を示す。(Bar = 100 μm)

(2) Real-time PCR (qPCR)

Monolayers と pseudoislets でのβ細胞関連分子や細胞間接着分子の mRNA 量を real-time PCR 法を用いて比較検討した。内分泌系細胞への分化やインスリン分泌機能に関与する転写因子 Foxa2 や PDX-1、インス

リン合成に関与する Insulin-2 や膵β細胞のグルコーストランスポーターである GLUT-2、さらに細胞間接着関連分子 E-cadherin の mRNA 量は monolayers より pseudoislets において発現が高い傾向が認められた (Fig. 2)。

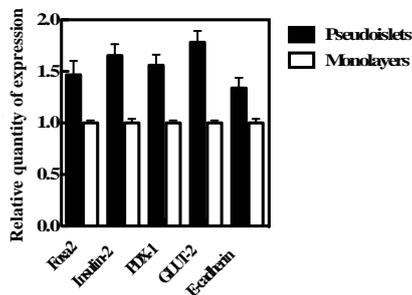


Fig. 2 Real-time PCR の結果

各々の mRNA 量は内因性コントロールの 18S rRNA 量に対する比として計算し、monolayers での発現量を 1 として、pseudoislets での発現量の変化を示した。

(3) インスリン分泌量の測定

Monolayers と pseudoislets の両細胞とも 25 mM グルコース処理によりインスリン分泌が誘導された。2 mM グルコース処理での基礎インスリン分泌量は monolayers (0.68 ± 0.15 ng insulin/ μ g protein/hr) と pseudoislets (0.44 ± 0.04 ng insulin/ μ g protein/hr) で有意な差は認められなかった。スフェロイド形成 (pseudoislets 形成) は基礎インスリン分泌量には影響を与えないことが示された。一方、25 mM グルコース処理では pseudoislets は monolayers より有意に多くのインスリンを分泌した (Fig. 3-A)。また tolbutamide 処置によるグルコース誘導インスリン分泌の増強効果は monolayers と pseudoislets の両細胞で認められたが、monolayers に比べ pseudoislets 細胞でより大きな増強効果を示した (Fig. 3-B)。

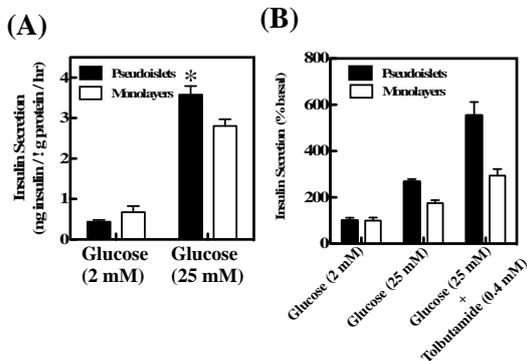


Fig. 3 インスリン分泌量の測定

(A) 25 mM グルコース処理で pseudoislets の方が多くのインスリンを分泌した (* $P < 0.05$ vs monolayer at 25 mM glucose)。 (Bars represent mean \pm SEM)。

(B) Tolbutamide によりグルコース誘導インスリン分泌能の増強効果は pseudoislets でより大きな増強効果を示した (* $P < 0.05$ vs monolayers)。グラフは 2 mM グルコースでの基礎インスリン分泌量 (basal) に対する%を示す。

(4) グルコース応答に対する Akt リン酸化の解析

Monolayers と pseudoislets で、グルコース応答に対する Akt のリン酸化を比較検討した。2 mM グルコース処理では Akt のリン酸化は認められなかったが、両細胞において 25 mM グルコース処理で Akt のリン酸化が観察された。さらに tolbutamide の添加により Akt リン酸化が増強された。そのリン酸化の増加量は monolayers より pseudoislets で有意に高値を示した (Fig. 4)。

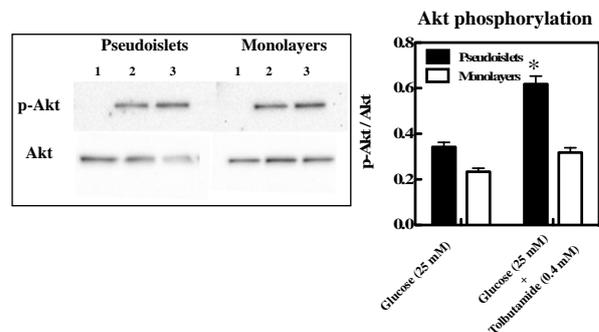


Fig. 4 グルコース応答に対する Akt のリン酸化

(A) レーン 1, 2, 3 はそれぞれ 2 mM グルコース処理、25 mM グルコース処理、25 mM グルコース処理 + 0.4 mM tolbutamide 処理を示す。

(B) リン酸化 Akt/ total Akt 比を示す。 (* $P < 0.05$ vs monolayers)

(5) 蛍光抗体法による観察

Monolayers と pseudoislets での C-peptide、GLUT-2、E-cadherin の局在を蛍光抗体法によって観察した。pseudoislets と monolayers の両細胞の細胞質での C-peptide の局在は強陽性を示した (Fig. 5-A, -B)。GLUT-2 の局在は細胞質と細胞膜上で観察され、特に pseudoislets 細胞の細胞膜上で monolayers より明瞭に観察された (Fig. 5-C, -D)。E-cadherin 局在は特に pseudoislets で細胞間接着部位に強い陽性所見を認めた (Fig. 5-E, -F)。さらに caveolin-1 は monolayers に比べ

pseudoislets で細胞-細胞間領域に強い局在を示した (Fig. 5-G, -H)。

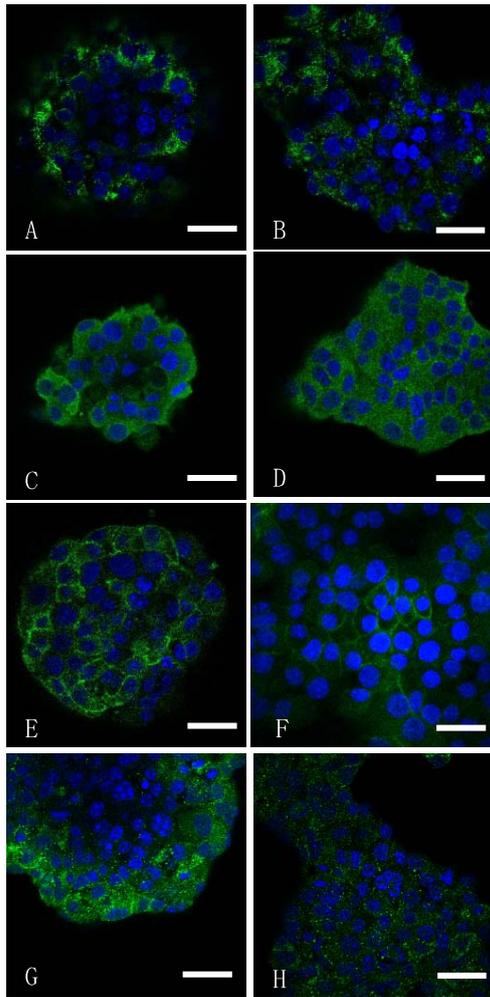


Fig. 5 蛍光抗体法による観察
Pseudoislets (A, C, E, G) と monolayers (B, D, F, H) の C-peptide (A, B)、GLUT-2 (C, D)、E-cadherin (E, F) と caveolin-1 (G, H) の蛍光抗体像を示す。(Bars = 25μm)

(6) エポソ包埋トルイジンブルー染を行い pseudoislets の観察

Pseudoislets の中心部の細胞の形態的観察のために、pseudoislets のエポソ包埋切片にトルイジンブルー染色し pseudoislets を観察した。Pseudoislets のうち長径が 100 μm 以上のものでは中心部の細胞で核の濃縮などアポトーシスに陥った細胞像が観察された (Fig. 6)。

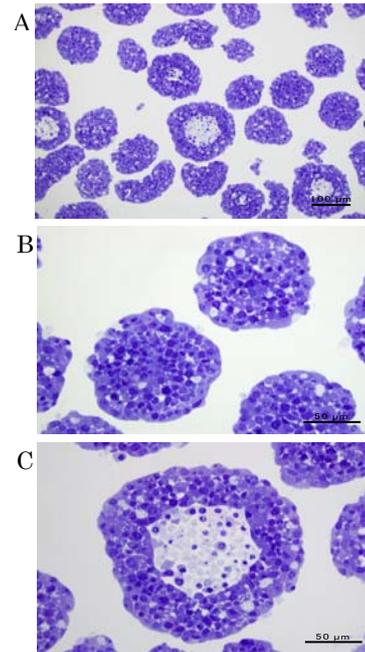


Fig. 6 Pseudoislets のトルイジンブルー染色像

長径が 50 μm ~ 200 μm 程度の pseudoislets が観察され (A)、bioavailability が保たれている pseudoislets (B) と中心部分の細胞がアポトーシスに陥っている pseudoislets (C) が混在している。

(7) 考察

- ① スフェロイド形成細胞 (pseudoislets) は monolayers に比べ PDX-1, Foxa2, insulin-2, GLUT-2 の mRNA 発現が高値を示す傾向が認められスフェロイドの形成がインスリンの発現や分泌に関連する分子の mRNA レベルにも影響することが示唆された。
- ② インスリン分泌量の測定結果から基礎インスリン分泌量には pseudoislets と monolayers の間に有意な差が認められなかった事より、基礎インスリン分泌量は細胞間接着の変化による影響を受けない事が示唆された。
- ③ グルコースや tolbutamide (スルホニル尿素薬) により、pseudoislets の方が monolayers よりも有意に高いインスリン分泌反応を示した。これらの結果は細胞間接着や細胞の 3 次元構造がグルコースの感受性やスルホニル尿素薬のレセプターである ATP-sensitive

potassium channel (K(ATP)channel)の感受性に影響を与えることが示唆された。

- ④ Pseudoislets では tolbutamide 処理で高濃度グルコースに対する Akt のリン酸化が増強したが、monolayers では有意な変化は認められなかった。このグルコース刺激による Akt のリン酸化は insulin receptor substrate-2 (IRS-2)/PI3-kinase を介したインスリンレセプターの自己リン酸化によるものであり、 β 細胞での insulin signaling の autocrine 作用と考えられている。従って pseudoislets では monolayers に比して細胞間接着の発達や細胞の 3 次元構造構築により IRS-2/PI3 kinase 経路を介した insulin signaling のグルコースに対する応答性が高まっている事が示唆された。Tolbutamide 処置による Akt リン酸化の増強に関しても、tolbutamide 処置により pseudoislets の方が monolayers より高いインスリン分泌能を示したことによると考えられた。
- ⑤ Caveolin-1 の蛍光抗体法による観察から、pseudoislets では monolayers に比べ細胞膜近辺（細胞辺縁）での強い局在が認められた。 β 細胞では caveolin-1 は細胞膜上よりもインスリン分泌顆粒の膜上に豊富に局在することが知られている。従って pseudoislets では monolayers に比べインスリン分泌顆粒が細胞膜近辺に豊富に存在している事が推定され、これがグルコースに対するインスリン応答の違いに関連する事が示唆された。
- ⑥ Pseudoislets のトルイジンブルー染色による形態的観察では中心部の細胞がアポトーシスを呈した像が観察された。スフェロイド形成 (pseudoislets) は β 細胞としての機能を活性化することが可能であると考えられるが、長期の培養ではアポトーシス抑制の処理の研究が必要であることが示唆された。

(8) 結語

スフェロイド形成がグルコースに対するインスリン分泌能の活性化、スルホニル尿素薬の効果の増強、Akt リン酸化が関与する insulin signaling の活性化、さらにインスリン分泌顆粒の局在の変化に影響することが示唆され、インスリン分泌能をもった分化

細胞の機能維持にはスフェロイド形成細胞が適していると考えられた。大量培養を実現するためにはアポトーシスを抑制する培養条件やシステムの研究が必要と考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 工藤 光洋、インスリン産生細胞におけるクラスター形成がインスリン分泌能に与える効果、日本病理学会、2010年4月28日、京王プラザホテル (日本)
- ② Mitsuhiro Kudo, The efficient secretion of insulin from beta-cells requires cell-to-cell adhesion, 40th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association and Japan Pancreatic Society, November 6, 2009, Hilton Hawaiian Village (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 光洋 (KUDO MITSUHIRO)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：20256978

(2) 研究分担者

石渡 俊行 (ISHIWATA TOSHIYUKI)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90203041

内藤 善哉 (NAITO ZENYA)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20237184

(3) 連携研究者

()

研究者番号：