

平成22年 5月19日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2008~2009
 課題番号： 20790647
 研究課題名 (和文) 膵特異的遺伝子発現制御マウスを用いた膵再生メカニズムの解析
 研究課題名 (英文) Beta cell regeneration induced by the tetracycline-regulated expression of a pancreas-specific gene in mice.
 研究代表者
 宮崎 早月 (MIYAZAKI SATSUKI)
 大阪大学・医学系研究科・特任研究員
 研究者番号： 60452439

研究成果の概要 (和文) : 現在わが国だけでなく諸外国においても、糖尿病患者数は年々増加している。重度の糖尿病に対し、膵臓移植や膵島移植が抜本的な治療法として行われてきているが、治療に必要な数のヒト膵島は絶対的に不足している。そこでわれわれは、膵β細胞の再生医療を目指し、マウスの膵外分泌腺細胞を膵β細胞へ分化転換させる研究を行った。その結果、膵特異的遺伝子を発現させることにより、膵β細胞が新たに出現し、糖尿病を緩和できる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : There are limits for pancreas transplantation in the treatment of type 1 diabetes owing to the shortage of organ donors. The research to generate beta cells from other differentiated pancreatic cells, such as acinar cells, *in vivo* is the promising approach. In the present study, cell lineage tracing showed that the acinar cell-specific expression of Pdx-1 reprogrammed the acinar cells and the newly generated beta cells were able to ameliorate STZ-induced diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
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：代謝学・エネルギー・糖代謝異常

キーワード：再生医療、膵β細胞

1. 研究開始当初の背景
 既存の膵β細胞を *in vitro* で増殖させることが困難であることから、自己複製能と多分化

能を有する幹細胞を用いた機能的な膵β細胞の分化誘導法の開発や、膵臓だけでなく膵外臓器由来細胞の分化の可塑性を利用した

膵β細胞への分化転換が国内外で試みられている。成体組織には、組織幹細胞が存在し、組織や器官の維持において細胞を供給するという重要な役割を担っている。もし膵臓に幹細胞が存在するならば、その幹細胞からβ細胞を分化させることが可能であることから、成体膵幹細胞の分離と同定を目指した研究が進められてきている。

2. 研究の目的

膵β細胞の再生医療の実現を目指し、これまで私はアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入によって膵再生メカニズムを解明しようと研究を進めてきた。その中で、Pdx-1とIsl-1という転写因子が重要であることがわかってきた。本研究は、これらの遺伝子の膵β細胞再生における役割と機構を解析するため、Pdx-1とIsl-1を同時に膵外分泌腺においてのみ発現制御できるマウスを作製し、膵臓の変化を観察し、さらに何らかの再生像が観察されれば、lineage tracing 実験を行い、膵β細胞の幹細胞あるいは前駆細胞を探索することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) Isl-1 発現制御ベクターを作製する。マウス ES 細胞(EB3)に Isl-1 発現制御ベクターをエレクトロポレーション法により *ROSA26 locus* にノックインし、ネオマイシン耐性のクローンを得る。long PCR 法で目的のノックインクローンを選択した後、そのクローンを C57BL6/J マウスの胚盤胞へ blastocyst injection 法で導入し、キメラマウスを作製する。キメラマウスと C57BL6/J マウスの交配から産まれた F1 を、膵特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスである Elastase-Cre あるいは Ptfla-Cre マウスと交配する。膵特異的にネオマイシン耐性遺伝子が除かれ、Tet-Off 系が働くようになった Elastase-Cre トランスジェニックマウスは、膵腺房細胞のみで Cre を発現するようになる。Ptfla-Cre トランスジェニックマウスと交配すると、膵腺房細胞だけでなく、膵島や膵管細胞でも Tet-Off 系が働くようになる。このようにして作製された Isl-1 発現制御マウスでは、Tetracycline の誘導体である Doxycycline(Dox)をマウスの飲用水に加えておくと、Isl-1 の発現が膵特異的に抑制されるが、Dox 非存在下(飲用水から Dox を除去)では、Isl-1 (および EGFP) が膵特異的に発現するようになる。

(2) Isl-1 発現制御マウス、Pdx-1 発現制御マウス、Elastase-Cre トランスジェニックマウス (あるいは Ptfla-Cre トランスジェニ

ックマウス) を交配し、トリプルトランスジェニックマウスを作製する。*ROSA26 locus* はホモノックアウトになっても影響はない。この際、4 週令まで Dox を飲用水に加えておくことで、Isl-1 および Pdx-1 の発現は抑えておく。これは、膵臓は 4 週令になるまでは成熟していないと言われているためである。

(3) 4 週令を過ぎたら、飲用水から Dox を除去し、Isl-1 および Pdx-1 を発現させる。どの時期の膵臓において tubular complex が最も多く出現するか解析するため、Dox 除去後、2 週間後から定期的に膵臓を摘出し、組織変化を観察する。また、その際 Isl-1 強発現細胞のリン酸化 STAT3 の発現や Ki67 の発現が見られるかどうか免疫染色を行って検討する。

(4) 変化する時期や程度が確認されたら、tubular complex が最もよく出現する条件のマウスを用い、定期的に膵臓を摘出し、膵β細胞の再生などの組織変化を観察する。外分泌腺細胞が膵β細胞やその他の内分泌腺細胞に変化していないか免疫染色を用いて検討する。さらに、膵島の数や大きさ、膵臓の大きさ、インスリンコンテンツなどに変化が見られるかどうか検討する。

(5) Isl-1 と Pdx-1 の発現が、膵腺房細胞から膵管細胞への分化転換に関与していることをさらに確認するために、トリプルトランスジェニックマウスと CAG-CAT-LacZ トランスジェニックマウスを交配し、膵腺房細胞のみが X-gal で染色され、かつ Isl-1 および Pdx-1 を発現制御できるマウスを作製する。このマウスにおいても、上述と同様な方法で、膵再生を起こす。もし、膵腺房細胞由来の細胞が tubular complex を形成し、それらの細胞の中から膵β細胞が出現してくるならば、X-gal で染色される膵β細胞が出現するはずである。

4. 研究成果

(1) Isl-1 発現制御マウスを作製した。Elastase-Cre トランスジェニックマウスと交配し、膵腺房細胞特異的に Isl-1 を発現させ、膵臓の組織変化を観察した。しかし、再生像は確認されなかった。

(2) これまで、Pdx-1 を全身の組織で発現制御できるマウスを用いて解析してきたが、マウスが短命(3週間以内に死亡)であり、長期観察ができなかった。そこで、Pdx-1 発現制御マウスと Elastase-Cre トランスジェニックマウスを交配し、膵腺房細胞特異的に Pdx-1 を発現させて膵臓の組織変化を観察し

た。マウスが4週令になってから飲用水からDoxを除去し、約9週間経過すると膵組織全体に tubular complex が観察され、acino-ductal 分化転換がおきていることが示唆された。

(3) Pdx-1 発現制御マウスは、腺房細胞由来細胞がEGFPでマーキングされる。免疫染色の結果、 α 細胞を除くすべての膵内分泌細胞に分化転換していることが観察された。また、STZ誘発糖尿病マウスを用いた実験において、新たに出現した膵 β 細胞の効果により、糖尿病が緩和される可能性が示唆された。図1はEGFP(緑)でマーキングされた腺房細胞由来のインスリン(赤)産生細胞の免疫染色写真である。核はDAPI(青)で染められている。共染色している細胞は黄色あるいはオレンジ色に見える。

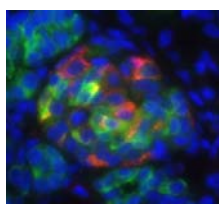


図1 腺房細胞から分化転換した膵 β 細胞

(4) Isl-1 発現制御マウスと Pdx-1 発現制御マウス、Elastase-Cre マウスを交配し、トリプルトランスジェニックマウスを得た。このマウスでは、4週令のマウスの飲用水からDoxを除去してから、約6週間経過すると膵組織全体に tubular complex が出現し、acino-ductal 分化転換がおきた。Pdx-1 発現のみの場合と比較し、約1ヶ月早く変化が起きたことから、Isl-1 の発現が膵再生の促進に関与していることが示唆された。

(5) これまで、膵腺房細胞が膵 β 細胞へ分化転換することは、in vitro 実験で報告されてきた。In vivo においては、アデノウイルスベクターを用いた実験が報告されているが、効率が良くなかった。われわれの系では、膵腺房細胞全体を変化させ、高効率で分化転換を起こさせることができる点や膵特異的遺伝子の発現を制御できる点で他グループと異なりインパクトがあると思われる。今後は、分化転換のメカニズムや膵前駆細胞の有無を詳細に解析したいと考えている。生体内において腺房細胞を効率よく膵 β 細胞に分化転換できる安全な系が確立できれば、糖尿病の再生医療に貢献できると期待される。

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15件)

- ① Yoshimura T, Toyoda S, Kuramochi-Miyagawa S, Miyazaki T, Miyazaki S, Tashiro F, Yamato E, Nakano T, Miyazaki JI, Gtsf1/Cue110, a gene encoding a protein with two copies of a CHHC Zn-finger motif, is involved in spermatogenesis and retrotransposon suppression in murine testes. *Developmental Biology*, 335:216-27, 2009, 査読有
- ② Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyazaki S, Miyazaki J, Aburatani H, Nakauchi H, Ema H, Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 4: e4820, 2009, 査読有
- ③ Toyoda S, Miyazaki T, Miyazaki S, Yoshimura T, Yamamoto M, Tashiro F, Yamato E, Miyazaki J, Sohlh2 affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia. *Dev Biol*, 325:238-248, 2009, 査読有
- ④ 宮崎早月、宮崎純一、転写因子遺伝子導入による膵内分泌細胞の分化誘導、肝胆膵、59:619-624、2009、査読無
- ⑤ 宮崎早月、宮崎純一、治療に向けた膵 β 細胞の再生医学の展望、*Medical Practice*, 26:631-632、2009、査読無
- ⑥ 宮崎早月、宮崎純一、膵 β 細胞の再生医療、*糖尿病カレントライブラリー*、10:87-92、2009、査読無
- ⑦ Mashayekhan S, Kim M-H, Miyazaki S, Tashiro F, Kino-oka M, Taya M, Miyazaki J, Enrichment of undifferentiated mouse embryonic stem cells on a culture surface with a glucose-displaying dendrimer. *Biomaterials*, 29:4236-4243, 2008, 査読有
- ⑧ Miyazaki S and Miyazaki J, In vivo DNA electrotransfer into muscle. *Dev Growth Differ*, 50:479-483, 2008, 査読有
- ⑨ 宮崎早月、宮崎純一、糖尿病への再生医療的アプローチ、*治療*、90:2211-2217、2008、査読無
- ⑩ 宮崎早月、宮崎純一、インスリン産生細胞の再生のための方法論、*新時代の糖尿病学3 日本臨床*、66:488-492、2008、査読無

〔学会発表〕(計10件)

- ① 宮崎早月, 他、膵特異的 Pdx-1 発現制御マウスを用いた膵房細胞から膵ベータ細胞への分化転換の解析、第32回日本分子生物学会、2009. 12. 9-12、横浜
- ② 宮崎早月, 他、膵特異的 Pdx-1 発現制御マウスを用いた膵房細胞から膵β細胞への分化転換の解析、第52回日本糖尿病学会、2009. 5. 21-24、大阪
- ③ 宮崎早月, 他、膵特異的 Pdx1 発現制御マウスを用いた膵房細胞からβ細胞への分化転換の解析、第8回日本再生医療学会、2009. 3. 5-6、東京
- ④ 宮崎早月, 他、膵特異的 Pdx-1 発現制御マウスを用いた膵房細胞から膵β細胞への分化転換の解析、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 2008. 12. 9-12、神戸
- ⑤ 宮崎早月, 他、Isl-1 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた膵管内遺伝子導入によるインスリン産生細胞の再生、第51回日本糖尿病学会、2008. 5. 22-24、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 早月 (MIYAZAKI SATSUKI)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員
研究者番号：60452439

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：