

平成 23 年 5 月 27 日現在

機関番号：37111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890293

研究課題名（和文） 移植膵島再生をめざして -幹細胞誘導および組織工学的手法を用いて-

研究課題名（英文） Regeneration of transplanted islets

研究代表者

小玉 正太 (KODAMA SHOHTA)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：90549338

研究成果の概要（和文）：膵島の幹細胞に関して、成体内でその候補と成る細胞群を規定してきた。さらに脾臓に由来した幹細胞の候補となる細胞群を、新たに細胞径による物理的な細胞選別で比較検討した結果、同一個体内の膵と脾に類似細胞を同定する事が可能であった。加えて、幹細胞の候補となる細胞には、iPS 細胞の初期化遺伝子として知られる、Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4、Nanog らが mRNA レベルとして高発現していた事が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic stem cells were identified as the size restricted cells that were harbored in spleen. In addition, the size restricted small cells retained a homology between pancreas and spleen. Furthermore, the cells that were candidate for pancreatic stem cells were up-regulated the expression of critical genes, including Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 and Nanog, which were well-known genes as reprogramming for iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：再生・移植医学、幹細胞研究、組織工学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：再生、幹細胞、組織工学、膵島細胞、膵島移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 幹細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導に関しては、胎生期マウスの研究で特定時期の転写因子の組み合わせにより、決定される事が明らかとなっている。近年の幹細胞研究ではこれらを制御する事により、候補となる幹細胞群から標的細胞へ誘導をかける事に主眼が置かれる傾向がある。しかしこれらの幹細胞研究では新たな誘導経路や幹細胞候補群を同定出来る可能性は低く、独創

性の高いテーマとは言い難い。

膵島再生に関しては、以前糖尿病モデルマウスを用いた自己免疫を改変するアプローチで、脾細胞からの誘導で特異な幹細胞群が存在する事を示した。加えてそれら膵島再生に関わる関連遺伝子を同定している。そして我々は、膵島障害を惹起する Streptozotocine を用いた wound healing model において Hox11 が rescue gene として働き、膵島再生を後押しする事を明らかにしてい

る。しかし当初の研究では、現象論的な膵島再生や *in vivo* の結果を偏重した為、幹細胞群の選別や同定が不十分であった。その為、今回それらの幹細胞群を更に厳密に規定しインスリン分泌細胞への分化誘導を確認する必要があった。

しかし、幹細胞を規定するマーカーは、多くが細胞表面マーカーによるものであり、それら表面抗原の発現する分化以前の細胞に関して、標的細胞を選別する方法は、ほとんど確立されていない。

(2) 幹細胞研究の包括する領域は広く、基礎研究結果のもたらす貢献は計り知れない。しかし現実的でかつ即時的な *clinical reality* を持つとは限らない事も事実である。我々が以前成功した膵島再生のアプローチでは、マウスの系で再生に 180 日間を要した。しかし、これは人の寿命で換算すると約 30 年間に相当する事になる。そのため我々は組織工学的な手法を用い、新たな培養法や機能膵島の再生を始めた。polyglycolic acid (PGA) の生体マテリアルと thermo-reversible gelatin polymer (TGP) で三次元培養を行い、無血清培地で膵島細胞から単細胞化した細胞を用いて、機能的膵島を再編するプロトコルを作成する事に成功した。未だ最終培養細胞数が初期単離細胞数を超えていないが、PGA を用いた時特異的に膵島様細胞塊を形成し、TPG を用いた三次元培養でのみ組織工学的再生膵島は 40 日以上増殖を続けた。糖尿病を発症したマウスに移植実験を行ったが、組織工学的膵島を移植すると全例血糖は正常化した。これら組織工学的膵島を *in vivo*、*in vitro* ともに機能を検索したが、正常なインスリン分泌能を有していた事が判った。よって、生体内吸収マテリアルと温度感応性ゲルを用いた細胞工学的な手法で、新たに機能的膵島の再生に成功した。しかし未だ満足すべき最終収量を得られず、機能的膵島の再編率は低い。

2. 研究の目的

(1) 幹細胞を規定するマーカーは、多くが細胞表面マーカーによるものであり、それら表面抗原の発現する分化以前の細胞に関しては、マーカーの発現は全く考慮されていなかった。我々の知見からも分化極性を規定するのは、核内の転写遺伝子であり単純な表面マーカーによる選別は、我々の系であまり意味をなさないと考えられた。そのため新たな着眼点から、物理学的な細胞の選別が可能か考察を加えてみた。

(2) 生体マテリアルである PGA で膵島様細胞塊を形成する事は、機能的膵島再生に必須であった。このため PGA の使用の有無で細胞塊を形成する要因を extramatrix protein のテンプレートを用いて、oligo-micro array

で調べたところ、MMP12、MMP3 と Serpin1 が PGA 未使用群と比べ高発現していた事が判った。

MMP12、MMP3 と Serpin1 リコンビナント蛋白と中和抗体を用いて、膵島細胞を単細胞化した細胞群と混合培養を行い、これらの蛋白との培養で膵島様細胞塊形成が促進され、中和抗体使用で膵島様細胞塊形成が阻害される事を確認する事を目的とした。さらに PGA の使用が無くても膵島様細胞塊を形成する事が可能であるか確認すし、PGA の使用がなく三次元培養への移行が早期に可能であれば、今後機能的膵島の再編率を考慮した、細胞収量を改善し得る可能性がある。

3. 研究の方法

(1) Insulin-promoter derived GFP マウスの膵を用いて EGFP 陰性で極端に細胞径の小さい(2-4 μ m)細胞(small cell: SC)と、EGFP 陰性で6-10 μ mの細胞径を主体とする比較的細胞径の大きい細胞(large cell: LC)を、sorting し Real time PCR array を用いてその Profile を比較検討した。膵幹細胞の起源となった Hox11 を発現する脾臓由来の SC に膵由来の SC と相同性が高いかを検討する。(2) マイクロアレイ解析で高発現を呈していた遺伝子の中で、MMP12 と MMP3 に関してリコンビナント蛋白を用い混合培養を行う。

4. 研究成果

(1) 以前の RealTime-PCR array の結果から、膵内 SC には Msx1, Mme, Pdx1 などの転写因子が高発現で、神経系の発生に関与する Msx1 が、膵発生でも同様に Shh のシグナルに Pdx1 と共に関与する可能性が浮上した。その事は Msx1 が膵でも新たな分化誘導を行うスイッチとなっている可能性を示唆するものであった。一方、骨髄系の発生に関与する Mme の高発現は、膵発生に骨髄系の分化経路が関与する可能性を残すが、現在のところその明らかな関連性は判っていない。今後は胎生期膵の免疫染色や *in situ* hybridization であたらな分化指標マーカーとなる可能性がある。

SC がインスリン分泌細胞に誘導されるかを、オス Insulin-promoter derived GFP (MIP-GFP) マウスを用い EGFP negative SC、EGFP negative LC、を sorting してそれぞれをメスのレシピエント脾臓へ注入そのキメラ細胞の profiling を Y-chromosome, Insulin, EGFP の3重染色で同定する事を当初の目的としたが、Actin-promoter derived GFP(Actin-GFP) マウスと異なり、MIP-GFP では hetero-transgenic マウスの蛍光強度が homo-transgenic マウスの蛍光強度と比べ 1/3 程度となっていることが判明し、生細胞を用いた *in vivo* への実験の移行が、

困難であることが判明した。その為、膵内 SC 細胞同様、脾臓内 SC 細胞の相同性を検討する、in vitro 実験を行った。

RealTime-PCR array の結果、膵由来の SC と脾臓由来の SC に高い相同性を認めた。膵由来 SC で高発現を示した Msx1、Mme、Cd19、Ppard、Pdx1 などは、脾臓由来の SC でも同様に高発現であることが、Realtime-PCR array 解析で明らかとなった。更に、脾由来細胞には iPS 細胞の初期化遺伝子として知られる、Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4、Nanog らが mRNA レベルとして高発現していた事が明らかとなった。

(2) まず膵島細胞を単細胞化した細胞群 MMP12 と MMP3 のリコンビナント蛋白を用いた混合培養実験では、機能的膵島の再編率を改善する明かな効果を認めなかった。その為、中和抗体を用いた阻害実験は試行しなかった。Serpine1 リコンビナント蛋白を用いた混合培養実験では、用いない群と比べ約 1.5 倍の再編率を改善を認めた。しかし予想された、劇的な収量の改善率は認めなかった為、中和抗体を用いた阻害実験は今回行わなかった。

つぎに、膵島細胞を単細胞化した細胞群と生体マテリアルとの混合培養を行い、早期に三次元培養への移行が可能であるか、検討を行った。Serpine1 蛋白との培養に加え、更に生体内吸収マテリアルである Collagen に配向性を加えた新開発マテリアルを併用し三次元培養を試みた所、新たな生体内吸収性マテリアルとして膵島を再編し、一期的な培養法で機能的膵島を再生する事が明らかとなった。さらに今後、収量の改善を検討して論文発表を行う予定である。

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 2 件)

- ① Ashida N., SenBanerjee S., Kodama S., Foo SY., Coggins M., Spencer J., Zamiri P., Shen D., Li L., Sciuto T., Dvorak A., Gerszten RE., Lin C., Karin M., Rosenzweig A.
IKK β Regulates Essential Functions of Vascular Endothelium Through Kinase-Dependent and -Independent Pathways.
Nat Commun, 2011, 2: 318, DOI: 10.1038/ncomms1317. 査読有り
- ② Dieguez-Acuña F., Kodama S., Okubo Y., Paz AC., Gygi SP., Faustman DL.
Proteomics Identifies Multipotency and Low Oncogenic Risk Stem Cells of the Spleen.

Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42: 1651-60 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kodama S.
Islet Regeneration
-Possible Inductions in Adult-
The fourth international Conference on Cell Therapy, Nov.11, 2010
Seoul, South Korea
- ② Mera T., Kojima D., Itoh T., Matsuoka N., Ono J., Kodama S., Yasunami Y.
A novel approach to prevent early loss of transplanted islets by targeting donor islets with a PPAR γ agonist prior to transplantation.
XXIII International Congress of the Transplantation Society, August 15-19, 2010, Vancouver, Canada
- ③ Kojima D., Mera T., Itoh T., Matsuoka N., Kodama S., Yasunami Y.
Early loss of transplanted islets in the liver of mice triggered by HMGB1 is prevented by antithrombin III.
XXIII International Congress of the Transplantation Society, August 15-19, 2010, Vancouver, Canada

[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 0 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

<http://resweb2.jhk.adm.fukuoka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小玉 正太 (KODAMA SHOHTA)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：90549338

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

西中村 瞳 (NISHINAKAMURA HITOMI)

福岡大学・グローバルF Uプログラム・

研究員

研究者番号：90597692