

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591309

研究課題名(和文) 膵SP細胞を用いた膵細胞再生法の開発

研究課題名(英文) Regeneration of pancreatic beta-cell from pancreatic SP cell

研究代表者

勝田 仁 (KATSUTA, HITOSHI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50333240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病の根治を目指し、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞をはじめとして種々の細胞から膵細胞を再生する研究が進められているが臨床応用可能な十分に機能的な細胞の作出には成功していない。本研究では、膵組織幹細胞と考えられる膵SP細胞を用いてインスリン産生細胞へ分化誘導する作用をもつ物質の探索を行なった。

その結果、膵SP細胞をインスリン産生細胞へ分化誘導する物質の同定に成功した。今後、本研究の成果が、膵幹細胞を用いた膵細胞再生技術の開発の重要な基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To conquer type 1 diabetes, many efforts have been made to regenerate pancreatic beta-cells from a variety of cells including the pluripotent stem cells, such as ES cells and iPS cells but we have not yet succeeded to get fully functional pancreatic beta-cells enough to clinical use. In this study, we have tried to identify substances which induce insulin-producing cells from pancreatic SP cells that are considered pancreatic stem cells.

In this study, we have succeeded to pick up several substances that induced insulin-producing cells from pancreatic SP cells. These results will give an important basis for the development of pancreatic cell regenerative therapy using pancreatic stem cells.

研究分野：糖尿病学

キーワード：膵ベータ細胞

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病の再生研究の現状と課題

1型糖尿病は、自己免疫反応などによりインスリン産生細胞である膵細胞が破壊され、インスリンの絶対的欠乏となり発症する代謝疾患である。1型糖尿病の根治を目指し、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞をはじめとして種々の細胞から膵細胞を再生する研究が進められている。しかし、インスリン産生細胞を誘導できたとする報告は幾つかあるものの、生体内の膵細胞のように血糖値に応じてインスリン分泌量を微細に調整するような臨床応用可能な十分に機能的な細胞の作出には成功していない。さらに、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞から誘導したインスリン産生細胞を糖尿病マウスに移植したところ、高率に奇形種などの腫瘍が形成されたとの報告が相次いでおり、これらの細胞の安全性も大きな課題となっている。

本研究において十分に機能的な膵細胞を安全に再生する技術を開発するための基本戦略

生体内では離乳期や肥満、妊娠、部分膵切除後などのインスリン需要が高まった状況では、それに応じて膵細胞数が増加することが知られている。このような生理的な膵細胞の再生過程では、安全に、十分に機能的な膵細胞が再生している。そこで、本研究では、この生体内での生理的な再生機構を解析し、得られた情報を基に、膵SP細胞をインスリン産生細胞へ分化誘導する作用をもつ物質の探索を行い、十分に機能的な膵細胞を安全に再生する技術の開発を目指した。

<生理的な膵細胞再生機構の解明に関する我々のこれまでの研究結果>

1)膵管細胞が膵細胞の前駆細胞である。

我々は、肥満によりインスリン需要が亢進したヒトの剖検組織では、膵管や膵管に接した位置に、しばしば数個のインスリン産生細胞の集塊を見出すことから、マウスにおいて Cre-LoxP システ

ムによるリニエージトレーシング法を用い、膵管細胞の分化経路の追跡を行った。その結果、生体内の生理的条件下(離乳期や膵切除後)で膵管細胞が膵細胞へ分化していることが明らかとなり、膵管細胞が膵細胞の前駆細胞であることを証明した(Inada, Katsuta, PNAS, 2008)。

2)膵SP細胞は、膵管細胞の一部の細胞であり、実際にインスリン産生細胞へ分化する。

SP細胞は、当初、マウス骨髄細胞中に存在する、DNA結合色素(Hoechst 33342)に低染色性の、高い幹細胞活性を持つ細胞分画として報告された(Goodell MA, J Exp Med, 1996)。その後、このSP細胞は、多くの哺乳類において、幅広い臓器に存在することが明らかとなり、現在では、SP細胞は、臓器や動物種をも超えて広く存在する幹細胞活性の高い細胞分画であると考えられている。

しかし、膵臓においては、SP細胞が存在することは報告されていたものの、それが膵内のどこに局在しているのかは不明であり、また、永らく膵SP細胞がインスリン産生細胞へ分化するものなのか証明されていなかった。そこで、我々は、SP細胞のマーカー(Abcg2 蛋白)を用いてマウス膵組織の免疫染色を行い、SP細胞が膵管の一部の細胞であることを明らかにした。さらに、膵SP細胞を分化誘導するには細胞周囲の環境(ニッチ)が重要と考え、マウス膵SP細胞をマウス胎児膵組織内に注入し培養(胎児膵内培養法)してみたところ、膵SP細胞をインスリン産生細胞へ分化させることに成功した(図1)。

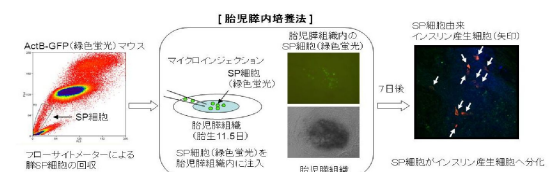


図1. 膵SP細胞からのインスリン産生細胞分化誘導法【胎児膵内培養法】

2. 研究の目的

本研究では、膵SP細胞をインスリン産生細胞へ分化誘導する作用をもつ物質の同定に挑戦

した。これにより、十分に機能的な膵細胞を安全に再生する技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

膵SP細胞からインスリン産生細胞への分化を誘導する物質を同定する。

申請者のこれまでの研究により、膵SP細胞は、生体内における生理的な膵細胞の前駆細胞であると考えられる。申請者らは、既に、膵SP細胞を胎児膵組織内に注入し培養することによりインスリン産生細胞へ分化誘導する技術を開発しているが、膵SP細胞を胎児膵組織内で培養することによりインスリン産生細胞へ誘導する方法の臨床応用を考えた場合、倫理的観点からヒトではなく動物の胎児膵を用いることになるが、この場合、動物由来の未知のウイルスなど安全性が問題となる。このため、胎児膵組織を用いずにインスリン産生細胞を誘導する技術の開発が必要である。本研究では、各種の増殖因子やその受容体、細胞内シグナル伝達経路の活性化剤や阻害剤、さらには理化学研究所が有償で提供している化合物ライブラリー(NPDepo; 登録化合物数、約24,700)より候補の物質を選択し、胎児膵を用いずに膵SP細胞をインスリン産生細胞へ分化誘導する物質の探索を行った。

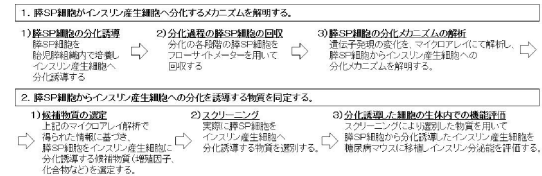
4. 研究成果

【本研究で新規に開発したナノポリマーコート細胞培養ディッシュおよびインスリン遺伝子発現誘導物質については、特許取得に向け準備中であり、詳細については特許申請後に報告する予定である。】

本研究では、1)膵組織幹細胞(膵SP細胞)においてインスリン遺伝子の発現を誘導する物質を同定に成功し、当初の目標を達成した。さらに、2)本研究を遂行する過程で、膵SP細胞を未分化の状態に培養することが必要となり、新規にナノポリマーコート細胞培養ディッシュを開

発した。これにより、膵組織幹細胞の新規培養システムの開発という当初の目標を上回る成果が得られた。

今後、これらの本研究の成果をもとに、生体内に投与可能な(内服あるいは注射可能な)インスリン産生誘導薬を開発し、膵細胞を安全に再生する糖尿病再生医療の開発に繋げていきたい。



1)膵SP細胞培養システムの開発

膵SP細胞をインスリン産生細胞に誘導する作用を持つ化合物のスクリーニングシステムの確立のため予備実験を行ったところ、従来の細胞培養ディッシュでは、膵SP細胞の未分化状態での培養が困難であることが判明したため、ナノポリマーをコートした数種類の新規細胞培養ディッシュ(ナノポリマーコート細胞培養ディッシュ)の開発を行った。その結果、数種類ディッシュで膵SP細胞を未分化の状態に培養できることが確認され、膵組織幹細胞の新規培養法を開発することに成功した。

2)候補物質から実際に膵SP細胞においてインスリン遺伝子の発現を誘導する物質を同定した。

既報の論文などの情報を基に、膵SP細胞からインスリン産生細胞への分化誘導に関与することが想定される各種の増殖因子や、細胞内シグナル伝達経路の活性化剤や阻害剤、さらには理化学研究所が有償で提供している化合物ライブラリー(NPDepo; 登録化合物数、約24,700)より、候補物質を選定した。

次に、成体マウスより膵SP細胞を単離し、新規に開発したナノポリマーコート96ウェルプレート1ウェルあたり 1×10^4 個の細胞密度で培養した。この培養液に、上記で選定した候補物質を加え、インスリン遺伝子の発現を誘導する物質を選別

した。このスクリーニングでは、高感度PCR法 (Nested PCR 法)を用いて、インスリン遺伝子の発現を検出した。(我々は、既に、この高感度PCR法を確立し、10コピーのインスリン cDNA を検出することが可能であることを確認している Katsuta, Diabetologia, 2009。) この結果、膵 SP 細胞においてインスリン遺伝子の発現を誘導する数種類の物質を同定に成功した

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2件)

1. Izumi K, Katsuta H, Nagafuchi S, et al. Reduced Tyk2 gene expression in β -cells due to natural mutation determines susceptibility to virus-induced diabetes. Nat Commun.6;1-10, 2015
2. Seiho Nagafuchi; Yumi Kamada-Hibio; Hitoshi Katsuta, et.al. TYK2 Promoter Variant and Diabetes Mellitus in the Japanese E-Biomedicine. 2015, in press.

[学会発表](計1件)

1. 中島紫、永淵正法、勝田仁ら
ナノコートディッシュ培養マウス由来ES細胞の未分化能の検討
日本糖尿病学会学術集会, 2012

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ:九州大学大学院医学系学府
<http://www.shs.med.kyushu-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

勝田 仁(KATSUTA, Hitoshi)
九州大学・医学研究院・講師
研究者番号:50333240

(2)研究分担者

永淵 正法(NAGAFUCHI, Seiho)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号:00150441