

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659090

研究課題名(和文)傍濾胞細胞を使用したインスリン産生細胞の作製と糖尿病マウスの病態改善の試み

研究課題名(英文)Preparation of insulin-producing cells using the parafollicular cells and attempt to improve insulin secretion in diabetic mice

研究代表者

三浦 正明(Miura, Masaaki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60276053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：筆者は内分泌細胞である傍濾胞細胞が、発生初期に一時的にインスリンを合成していることを発見した。この知見を元に、傍濾胞細胞は膵細胞に分化できるか検討された。発生初期の傍濾胞細胞を培養し、膵細胞の分化に関係する遺伝子を導入した。MafAとPdx1遺伝子を同時に導入した場合、19倍インスリン遺伝子の発現が増加することが分かった。免疫染色によりこの細胞がインスリンを産生していることを確かめた。これらのことから本研究により、傍濾胞細胞から膵細胞を再生させる可能性が開かれた。

研究成果の概要(英文)：The author discovered that parafollicular cells synthesized insulin to the early stage of the development. Based on this finding, parafollicular cells were examined whether can differentiate into pancreatic cells. Genes related to differentiation of pancreatic cells were introduced into cultured parafollicular cells at the early stage of the development. Insulin gene expression were increased 19-fold by introducing MafA and the Pdx1 gene simultaneously. The cultured cells were confirmed to produce insulin by immunostaining. The present result suggested that parafollicular cells is capable of regenerating pancreatic cells.

研究分野：分子内分泌

キーワード：傍濾胞細胞 カルシトニン インスリン 膵細胞 再生 分化

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病の研究分野において、すでに様々な角度から膵細胞の再生が試みられている。C細胞はカルシトニンという、血液中のカルシウム濃度を下げる作用を持つホルモンを産生している内分泌細胞である。C細胞は哺乳類では甲状腺内に散在しているが、鳥類以下の脊椎動物では鰓後体という器官を形成する。マウスではC細胞が膵細胞の発生に重要な転写因子 ISL1 を発現していることが知られている。しかし、哺乳類でC細胞がインシュリンを産生しているというデータは存在しない。今回、筆者の研究でニワトリ鰓後体C細胞の一部は ISL1 の他にインシュリンを産生していることが免疫染色法および RT-PCR 法により判明した。このインシュリンの発現は孵化1日後には消失していた。

### 2. 研究の目的

従来、正常な状態ではインシュリンを生産する細胞は膵臓のランゲルハンス島と胸腺以外に存在しないと考えられていた。ニワトリ鰓後体C細胞はカルシトニンを分泌する内分泌細胞であり、孵卵期に神経ペプチドや膵臓のランゲルハンス島で分泌されるソマトスタチンを産生している。筆者はニワトリ鰓後体C細胞が孵卵期にインシュリン遺伝子を発現し、インシュリンタンパクを合成していることを、RT-PCR 法および免疫染色法により明らかにした。このインシュリンタンパクは孵化1日後には消失していた。本研究は、孵卵期の鰓後体C細胞でインシュリンが産生されるメカニズムを明らかにすることが目的である。さらに、挑戦的萌芽研究として最終的にC細胞からインシュリン産生細胞を作成することを目標とした。

### 3. 研究の方法

初めに、PDX1 などの膵細胞の発生・分化に必須の転写因子群が発現しているかを調べる。C細胞のインシュリン産生能は孵化後消失する。孵卵期のC細胞を培養することで、インシュリン産生能を持つC細胞が環境変化によりどのような運命をたどるのか調べる。同時に、培地にグルコースを加え、C細胞前駆細胞から発生したインシュリン産生細胞はインシュリン分泌能力があるかを調べる。また、成熟した膵臓の

外分泌細胞で Ngn3, PDX1, Mafa 遺伝子を強制発現させるとインシュリン分泌細胞が新たに発生することが分かっている。孵化後の鰓後体C細胞にも Ngn3, PDX1, Mafa 遺伝子を、単独あるいは複数同時に強制発現させインシュリン産生が新たに発生するか調べる。

### 4. 研究成果

(1) 鰓後体C細胞は孵卵14日前後に細胞の運命を決定する遺伝子の発現変化が見られる。鰓後体C細胞を効率的にインシュリン産生細胞に再分化させる前段階として、C細胞に他の遺伝子を強制発現させることで、本来のC細胞の機能を抑制し、他の機能を獲得することができるか調べた。神経細胞の増殖関連タンパク質である SCG10 遺伝子を孵卵12日の培養C細胞に強制発現させた。リアルタイムPCRや免疫染色法により調べたところ、神経細胞マーカーである TuJ1 の発現や、神経伝達物質であるエンケファリンの発現が約2倍に増加した。一方、本来のC細胞の機能であるカルシトニンの発現は0.7倍と減少した(図1)。これらのことは、C細胞がSCG10強制発現により、神経様細胞に分化転換したと考えられた。

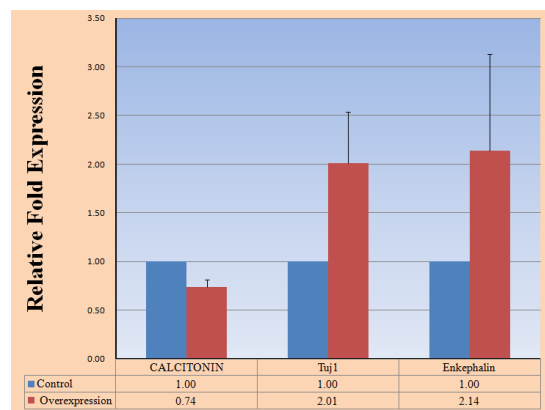


図1

(2) (1)の結果を基に、膵臓の外分泌細胞をインシュリン産生細胞に再分化させる転写因子の遺伝子を3つ選び(Ngn3 + Pdx1 + MafA)それをPCRにより増幅後、発現ベクターに組み込んだ。その発現ベクターをそれぞれ単独、あるいは複数組み合わせ、孵卵12日の培養C細胞に強制発現させた。リアルタイムPCRにより発現量を調べたところ、それぞれ単独で遺伝子を強制発現さ

せた場合は2～3倍インスリンの発現がコントロールと比較して増加していた(図2)。

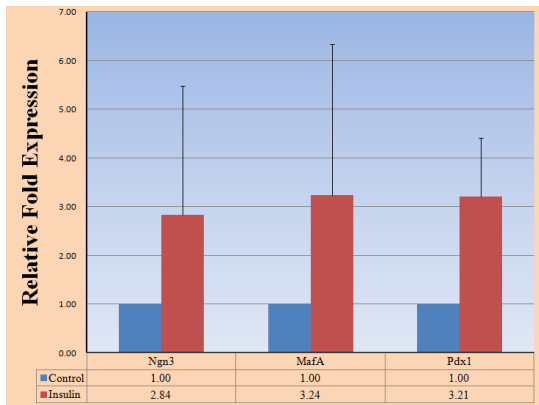


図2

さらに Pdx1 + MafA の組み合わせで強制発現させた場合に最も発現量が増加し約19倍と、単独よりもかなり多く発現を増加させることができた(図3)。これらのことは、鰹後体C細胞がインスリン産生細胞に再分化できることを強く示唆した。

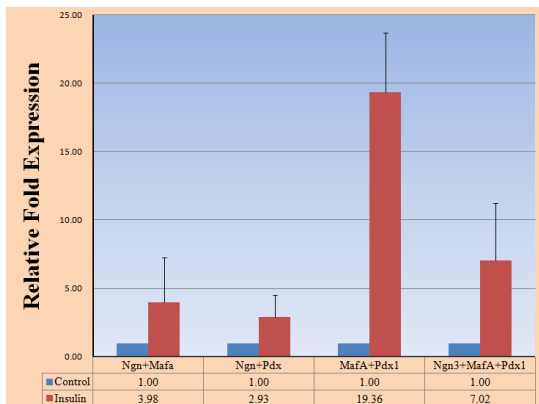


図3

(3) 培養C細胞から発生したインスリン産生細胞はインスリン分泌能力があるかを調べるため、Pdx1とMafAを導入した培養C細胞に対して、48時間後に20mMグルコースを含む培地に入れ替えグルコース応答性をELISAにて確認した。その結果、この培養方法ではグルコース応答性が確認できなかった。通常の膵島初代培養細胞でも分散させると、グルコース応答性が失われるという結果があるので、培養C細胞から発生したインスリン産生細胞のグルコース応答性は調べることができなかった。しかし、Pdx1とMafAを導入した培養C細胞に対して、細胞溶解用緩衝液RIPAバッファを使用して細胞を溶解し、その溶解液

を用いてELISAを行ったところ、コントロールと比較すると約8倍インスリタンパク量が増加していた(図4)。Pdx1とMafA導入によりC細胞がインスリタンパクを合成していることが確認できた。

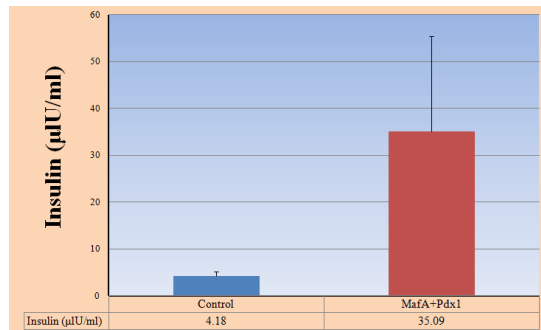


図4

(4) Pdx1とMafAを導入した培養C細胞に対してカルシトニンとインスリン抗体の二重免疫染色を行った。その結果、導入後の培養C細胞はカルシトニンを含む本来の細胞、カルシトニンとインスリンを含む細胞、およびインスリンを含む細胞と3種類の細胞が観察された。しかし、ほとんどの細胞はカルシトニンを含む本来の細胞かインスリンを含む細胞に分化していた。

(5) これまでの結果から、Pdx1とMafAを導入した培養C細胞がインスリン遺伝子、インスリタンパクを発現合成していることは明らかにされたが、C細胞全体の数と比較するとまだ数パーセントしか分化転換されていない。糖尿病マウスの病態改善には使用するためには、より効率のよい分化転換する方法が必要であると考えられた。Nkx2.2遺伝子は細胞の発生に必須であり、Rfx6遺伝子は膵臓の発生に重要な遺伝子である。これらの遺伝子を培養C細胞に導入した。その結果Nkx2.2遺伝子を単独で導入した培養C細胞は2～3倍、インスリンの発現が増加していた。Rfx6遺伝子を導入した場合はインスリンの発現増加が見られなかった。Nkx2.2遺伝子と他の遺伝子を、様々な組み合わせで導入したが、Pdx1とMafAを導入した場合に得られる19倍を超えることはできなかった。そのため、現時点ではPdx1とMafAを導入した場合が最も作成効率がよいと結論した。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

三浦正明, 傍濾胞細胞(C細胞)をインスリン産生細胞に分化転換させる試み, 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014年03月28日, 自治医科大学キャンパス(栃木県下野市)

〔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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三浦 正明 (MIURA, Masaaki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 60276053

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: