

研究テーマ**遺伝子導入を用いない膵腺房細胞の前駆細胞化と膵β細胞への再生誘導**

1. はじめに

我が国の糖尿病人口は約820万人、予備軍を含めると1,800万人を超えており、その根本的対策は緊急を要する。糖尿病の終末像は膵β細胞の破壊や機能不全によるインスリン欠乏（依存）状態である。インスリン依存状態の糖尿病患者に対してはインスリン治療が施されているが、血糖値をリアルタイムで感知して必要量のインスリンを分泌する膵β細胞とは異なり、インスリン治療では血糖値を生理的範囲内にコントロールすることは不可能なため、合併症を防止することは困難である。一方、膵臓移植、膵島移植は根治療法の可能性を秘めているものの、極端なドナー不足から、治療を必要としている患者の多くを救済できていないのが現状である。これらの問題を解決するには、何らかのかたちで移植可能な膵β細胞を大量に確保する方法を確立することが必要である。そこで期待されるのが再生医療である。申請者は既に、膵腺房細胞からインスリン分泌細胞が誘導できることを見出している（*PNAS*, 2005; *AJP*, 2007, *JBC*, 2008）が、実用に耐えうる機能（量的側面ならびに質的側面）を持った細胞を作製するには至っていない。本研究では、遺伝子導入によらない方法で膵腺房細胞を前駆細胞化し、そこから実際の膵β細胞と同等の機能を有する細胞を大量に作製する技術基盤を確立することを目的とする。

2. 方法

単離した膵腺房細胞を様々な条件下で培養して脱分化状態を誘導し、その増殖能や発現遺伝子プロファイルを解析した。“脱分化状態”の定義は、①腺房細胞の特性（アミラーゼ等の酵素の発現）の消失、②膵発生初期に見られる転写因子（*HNF6*, *Pdx1* 等）の発現誘導、③成熟細胞マーカー（インスリン等）の不在、の全てを満たすこととした。培養条件としては、細胞外基質（*ECM*）上での二次元培養や種々の成長因子の添加を検討するが、実用化への障害となり得る遺伝子導入は用いなかった。発現遺伝子プロファイルについては、*real-time RT-PCR* 法による *mRNA* の定量化を基本とした。また、前駆細胞化した膵腺房細胞からインスリン分泌細胞を誘導する方法の確立を試みた。

3. 研究成果

成体マウスから単離した膵腺房細胞を非接着性の培養皿で培養すると *spheroid* 状の細胞塊を形成してインスリン分泌細胞へと分化添加するが、このとき、*PI3* キナーゼ阻害薬を添加しておくと細胞塊は生じず、脱分化状態が誘導・維持された。しかしながら、この条件では細胞増殖が認められず、一週間以上の培養では多くの細胞が細胞死によって失われた。そこで、種々の細胞外マトリクスタンパク質をコートした培養皿を用いて接着培養を行ったところ、マトリゲルマトリクス、コラーゲンI、あるいは、コラーゲンIVをコートした場合に単離膵腺房細胞の増殖が認められ（図1）、4日間で約

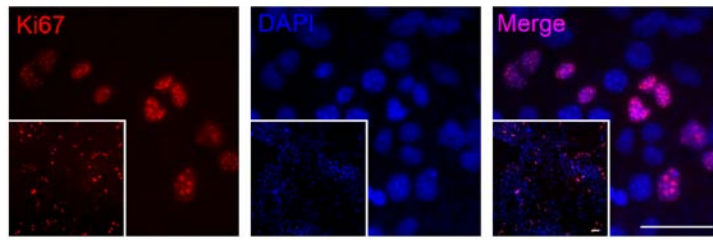


図1. コラーゲンIVマトリクス上での単離膵腺房細胞の培養

4倍に細胞数が増えた。このとき、免疫染色を行ったところアミラーゼの発現は消失し、インスリンなどの成熟細胞マーカーの発現もまったく認められなかった。RT-PCRによるmRNA発現の解析の結果も同様であった。一方、膵発生に重要な役割を演じる転写因子いくつかは発現誘導されていた。これらは、Pdx1, Foxa2, HNF6, Nkx2.2, Isl1, Hes1である (図2)。

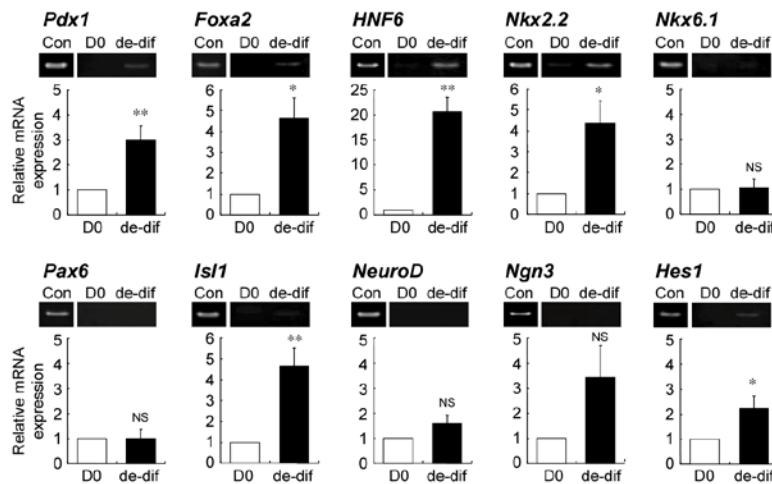


図2. 転写因子の発現誘導

したがって、コラーゲンIVマトリクス上で培養した単離膵腺房細胞は“脱分化状態”にあるものと考えられた。この脱分化細胞はE-cadherin陽性かつHNF6陽性であり、上皮細胞の特性を維持しつつ増殖していることが明らかとなった (図3)。

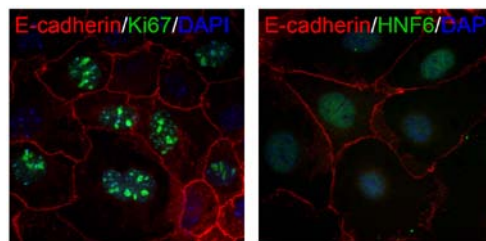


図3. 脱分化細胞における増殖マーカー(Ki67)とE-cadherin, HNF6の発現

次に、上記のようにして脱分化させた単離膵腺房細胞を種々の成長因子を添加することによってインスリン分泌細胞に分化誘導することを試みた。EGFやベータセルリンなどのEGFファミリー、TGFβ、HGF、FGF、ガストリンなどを様々な組み合わせで検討したところ、インスリンの発現誘導に対してはTGFβが最も有効であることが明らかとなった。しかしながら、グルコース応答性インスリン分泌に重要なグルコキナーゼの発現誘導は見られなかった。EGFとガストリンの組み合わせではインスリンを始めとした膵β細胞で発現する機能分子の発現誘導が認められた。

4. まとめ

膵腺房細胞は遺伝子導入を行うことなく、培養条件の工夫によって前駆細胞様の特性を有する細胞に脱分化することができる。今後、インスリン分泌細胞への分化誘導法のさらなる検討によって、将来的にヒト細胞を用いた膵β細胞の再生誘導にも応用し、糖尿病の再生医療に繋がることが期待される。

5. 発表論文、参考文献

Minami K, Okuno M, Miyawaki K, Okumachi A, Ishizaki K, Oyama K, Kawaguchi M, Ishizuka N, Iwanaga T, and Seino S. Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:15116-15121, 2005

Okuno M, Minami K, Okumachi A, Miyawaki K, Toyokuni S, and Seino S. Generation of insulin-secreting cells from pancreatic acinar cells of animal models of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E158-E165, 2007

Minami K, Okano H, Okumachi A, and Seino S. Role of cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic exocrine-to-endocrine transdifferentiation. *J Biol Chem* 283:13753-13761, 2008

南幸太郎、清野進：膵β細胞の特性と再生インスリン分泌細胞に必要な機能、月刊糖尿病 1 (4):26-34, 2009