

# 膵管上皮細胞からβ細胞への分化に関わる転写因子

九州大学大学院 医学研究院 先端医療医学部門

糖尿病遺伝子分野

稲田 明理

## 1. 背景

生活習慣病の一つである2型糖尿病の患者人口は増加し続けており、合併症の進行に伴う医療費高騰を招いて深刻な問題となっている。

最近の研究により、膵島のβ細胞数は糖尿病患者の罹病期間が長期化する程、減少することが明らかになってきた。そのため、残存するβ細胞は貴重である。しかし、現在使用されている糖尿病経口剤は、これらの貴重なβ細胞から強制的にインスリン分泌を促すため、β細胞を疲弊させ、かえって減少させる。したがって、糖尿病の根治的治療（インスリン不足の解消）にはβ細胞数を増加させることが必須であり、β細胞の増殖と維持が可能な生理学的条件とメカニズムを探求することが必要である。

このような背景に基づき、私は膵島の複製と膵管上皮細胞からの分化誘導がβ細胞を増加させるメカニズムとして重要であると考えている。そこでこれらのメカニズムに関わる遺伝子群とそのメカニズムを明らかにすべく、本研究を行った。

## 2. 方法

膵管上皮細胞から分化するために必要な遺伝子として、膵管上皮細胞内に一時的に発現する転写因子Pdx-1に着目した。Pdx-1は膵臓の発生や内分泌細胞の分化に必須の転写因子であり、生後は主にβ細胞に存在するが、肥満のヒトにおいて（文献1、2）、またマウスにおいては組織再生実験において（文献3-7）、膵管上皮細胞の一部にPdx-1蛋白質が発現するという報告がなされている。そこで膵管上皮細胞内Pdx-1の蛋白質の発現が膵管上皮細胞の新β細胞への分化に重要な役割を担っているのではないかと考え、「一部の膵管上皮細胞が何らかのシグナルを受けるとPdx-1が発現し、これが最終的にβ細胞が増加したり分化する際に必要である」という仮説を立て、膵管上皮細胞特異的Pdx-1ノックアウトマウスを作製し、検討した。

## 3. 結果

CAII-Creマウス（文献8）をPdx-1<sup>f1E2/f1E2</sup>マウス（文献9）と交配し（Cre-loxPシステム）、膵管上皮細胞特異的Pdx-1ノックアウトマウスを作製した。得られた仔マウスでは、Cre<sup>+</sup>Pdx-1<sup>f1E2/f1E2</sup>、Cre<sup>+</sup>Pdx-1<sup>f1E2/+</sup>、Cre<sup>-</sup>Pdx-1<sup>f1E2/+</sup>、Cre<sup>-</sup>Pdx-1<sup>f1E2/f1E2</sup>の4種の遺伝子型が検出された。この実験では、ノックアウトマウス（Cre<sup>+</sup>Pdx-1<sup>f1E2/f1E2</sup>）に対するコントロールとして、同腹仔のCre<sup>-</sup>Pdx-1<sup>f1E2/f1E2</sup>マウスを用いた。

初めに生後の成長期のノックアウトマウスにおいて、膵管上皮細胞内Pdx-1陽性細胞が著しく減少していることを確認した。ノックアウトマウスの随時血糖値は、生後0日は正常であったが、5週齢までに211-365 mg/dlと高くなり、その後徐々に下降した。ノックアウトマウスではどの週齢においてもβ細胞数は減少していた。（2週齢の総β細胞数：コントロールマウス vs. ノックアウトマウス=8393 vs. 4587）。

更に、14時間絶食後IPGTT（腹腔内ブドウ糖負荷試験；1 g/kg体重）を行ったところ、コントロールマウスの血糖値は15分で大幅に上昇し、その後120分以内で徐々に基礎レベル値に戻ったのに対し、6週齢ノックアウトマウスは、試験期間中継続して高血糖を維持した。また、β細胞減少のため血中インスリン値が低下していた。

次に、組織再生時に膵管上皮細胞内Pdx-1の発現がβ細胞の新形成に貢献しているかを検討する為に、成体マウスを用いて組織再生実験を行った。まず14週齢マウスに高濃度ストレプトゾトシン（180 mg/kg）投与を行い、既存のβ細胞を1週間以内でほぼ壊滅させた。10日後、週齢15~16

週で膵管結紮を行った。1日2回のインスリン注射により血糖値を正常範囲に保ち、一週間後に解剖した。膵管結紮の結果として、膵臓外分泌液の増加と再生エリア内の外分泌組織変化が見られた。また、膵管上皮が増加して、新β細胞の形成が促されていることがわかった。

小β細胞塊(β細胞数:1~5個)を複製や新生をとおして形成された新β細胞として定義した。既存のβ細胞はストレプトゾトシンにより破壊され、膵島内に残ったβ細胞は多くのα細胞と共にあり、これらの新しいβ細胞塊とは形態上区別することが可能であった。インスリン染色により確認できた新β細胞塊には、膵管上皮細胞内に存在するもの、膵管上皮細胞に隣接するもの、膵管上皮細胞からやや離れた位置に存在するものという3つのパターンが見られた。これらの小β細胞塊(β細胞数:1~5個)は、コントロールマウスにおいては頻繁に見られたが、ノックアウトマウスにおいてはほとんど見られなかった。

以上の結果より、膵管上皮細胞内Pdx-1の発現は成体の組織再生時においても新β細胞の形成に貢献するということが明らかとなった。

#### 4. 考察

本研究で膵管上皮由来のβ細胞の成長期および組織破壊時における機能を明らかにした。膵管上皮細胞特異的Pdx-1ノックアウトマウスを用いることにより、β細胞数が減少すると正常血糖を維持するために、膵管上皮由来のβ細胞が数を補う役割を担うという現象を明らかにすることができた。また、β細胞数と膵島数をカウントすることにより、少数のβ細胞の新生と複製は恒常的に起こっており、膵島が補償的増加を続けていることを示すことができた。

#### 5. 謝辞

アステラス病態代謝研究会による援助により、本研究を成就することができました。ここに厚く御礼を申し上げます。

#### 6. 参考文献

1. Gmyr V, Kerr-Conte J, Belaich S, Vandewalle B, Leteurtre E, Vantyghem MC, Lecomte-Houcke M, Proye C, Lefebvre J, Pattou F. : Adult human cytokeratin 19-positive cells reexpress insulin promoter factor 1 in vitro: further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in humans. *Diabetes*, 49 : 1671-1680, 2000.
2. Muharram G, Beucher A, Moerman E, Belaïch S, Gmyr V, Vandewalle B, Pattou F, Kerr-Conte J. : Endocrine pancreatic tissue plasticity in obese humans is associated with cytoplasmic expression of PBX-1 in pancreatic ductal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 333 : 1153-1159, 2005.
3. Li M, Miyagawa J, Moriwaki M, Yuan M, Yang Q, Kozawa J, Yamamoto K, Imagawa A, Iwahashi H, Tochino Y, Yamagata K, Matsuzawa Y. : Analysis of expression profiles of islet-associated transcription and growth factors during beta-cell neogenesis from duct cells in partially duct-ligated mice. *Pancreas*, 27 : 345-355, 2003.
4. Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S. : The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes*, 48 : 507-513, 1999.
5. Song SY, Gannon M, Washington MK, Scoggins CR, Meszoely IM, Goldenring JR, Marino CR, Sandgren EP, Coffey RJ Jr, Wright CV, Leach SD. : Expansion of Pdx1-expressing pancreatic epithelium and islet neogenesis in transgenic mice overexpressing transforming growth factor alpha. *Gastroenterology*, 117 : 1416-1426, 1999.
6. Taguchi M, Yamaguchi T, Otsuki M. : Induction of PDX-1-positive cells in the main duct during regeneration after acute necrotizing pancreatitis in rats. *J Pathol.*, 197 : 638-646, 2002.

7. Peters K, Panienska R, Li J, Klöppel G, Wang R. : Expression of stem cell markers and transcription factors during the remodeling of the rat pancreas after duct ligation. *Virchows Arch*, 446 : 56-63, 2005.
8. Inada A, Nienaber C, Katsuta H, Fujitani Y, Levine J, Morita R, Sharma A, Bonner-Weir S. : Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105 : 19915-19919, 2008.
9. Gannon M, Ables ET, Crawford L, Lowe D, Offield MF, Magnuson MA, Wright CV. : pdx-1 function is specifically required in embryonic beta cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Dev Biol.*, 314 : 406-417, 2008.