

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591042

研究課題名（和文） ヒト膵導管細胞を利用した糖尿病の新しい治療法の開発

研究課題名（英文） development of new therapeutic approach to diabetes mellitus using human pancreatic duct cells

研究代表者

矢藤 繁 (YATOH SHIGERU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：50451703

研究成果の概要（和文）：

ヒト膵島移植の際に不要物として廃棄される組織、膵導管細胞分画から、糖尿病治療に用いることができるインスリン産生細胞を作成（分化誘導）する研究を行った。種々の分化誘導条件を検討した結果、インクレチンの一種であるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) がインスリン産生細胞を増加することが分かった。また、この分化誘導過程でニューロジェニン-3 (ngn-3) という転写因子の発現が亢進していた。ngn-3 は幹/前駆細胞から膵 B 細胞が分化する際に一過性に発現する転写因子であり、我々の観察する分化誘導過程が同様の経路をたどっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We tried to induce human pancreatic duct cells into insulin-producing cells, which can be used to treat diabetic patients. Though duct cell fraction is got when islet transplantation, it is usually thrown away. As a result of our study to evaluate various factors and conditions to induce differentiation, it was suggested that glucagon-like peptide-1 (GLP-1) increased insulin-producing cells. Furthermore, expression of neurogenin-3 (ngn-3) was elevated in this process of differentiation. This result suggested that the process might mimic physiological differentiation because transient expression of ngn-3 was observed when stem/progenitor cells were induced into mature pancreatic B cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：糖尿病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：インスリン、再生医療、膵島

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、日本には 740 万人の糖尿病患者がいると推定され、その数は年々増加していた。糖尿病はその合併症により患者の死

や生活の質 (QOL) の低下を招くばかりでなく、その医療費が国の大きな経済的負担になっていた。

膵 B 細胞障害によるインスリン分泌能の低

下と内臓脂肪蓄積などによるインスリン抵抗性は、糖尿病発症の2大原因である。後者は生活習慣の改善や薬物により改善することができるが、前者については確立した膵β細胞障害の永続的な改善方法はなかった。

膵島移植や膵移植は、正常な膵B細胞を補充することにより、インスリン分泌能が正常化し、糖尿病を根本的に「治す」ことができる可能性があった。しかし、移植される膵島・膵臓はドナー由来であり、ドナー不足が著しくこれらの移植が需要を満たしているとは言い難く、充分量の膵B細胞を得る方法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

このような視点から、本研究ではヒト膵導管細胞から膵B細胞を効率的に分化誘導する方法の開発を目指した。

ヒト膵導管細胞の利点としては、以下の4点がある。

- (1)膵島を単離した際、不要物として大量に得られる（一つの膵臓から膵島は1g弱に対し、15-20g得られる）。
- (2)培養し増殖させることができる、
- (3)体外での培養実験でインスリン産生細胞を誘導できることが報告されている。
- (4)膵導管細胞から膵B細胞への分化は生体内でも認められる。

3. 研究の方法

米国より、ヒト膵導管細胞を含む組織を輸入し、実験に使用した。

(1)この組織を米国から輸入して培養実験をすることは、ほぼ前例がなく、まず輸送条件（輸送方法、保存液など）について検討し、良い状態で組織を入手する方法を決定することから始めた。死細胞を染色するプロピディウムヨード（PI）を用いて、組織の状態を評価した。

(2)良い状態で組織が入手できるようになった後に、それらを培養し、実験に用いた。分化の誘導は基本的に2段階で行い、第1段階は増殖用培地を使用し細胞を増殖させ、第2段階で分化用培地に変更し、インスリン産生細胞への分化を誘導した。

分化の程度の評価は、インスリン遺伝子の発現量で行い、適宜、インスリンの免疫組織染色を行った。

また、膵B細胞への分化過程において重要な働きを持つ転写因子、膵および十二指腸のホメオボックス遺伝子-1（PDX-1）とニューロゲン-3（ngn-3）の遺伝子発現についても評価した。

4. 研究成果

(1)組織の輸送条件について

①発送までの保存

先方で膵島単離が行われる時刻はマチマチであり、夜間・休日などでは直ぐに発送できないため、発送までの保存状態について検討した。

保存温度は常温より4℃の方が組織の状態が良かった。しかし、4℃でも一晩以上保存されたものは状態が悪かった。

1回のみ9時間保存されたにも関わらず、組織の状態がよかったが、基本的には直ぐに発送されたものの方が圧倒的に組織の状態はよかった。

②輸送中の温度

夏場に輸送された組織の状態が悪かったため、発砲スチロールの輸送容器内の温度を経時的に測定した所、30℃近くの高温にたっていることが判明した。

以後、保冷パックを梱包したところ、米国内および航空機貨物室内で移送中の温度は4-10℃となり、状態のよい組織が得られるようになった。

ただし、成田空港に到着してからは（おそらく保冷パックが溶けてきているため）外気温に応じて輸送容器内の温度も上昇しやすくなった。このため、夏期はクール宅急便での個別配送を気温が高い時には利用した。

③輸送時間

FEDEXを利用すると最短で約1.5日（36時間）で実験室まで届いた。しかし、土日に成田空港に着くと、税関がやっていないため月曜日まで待たざるを得ず、24-48時間（月曜日が祝日だと-60時間）成田空港で保存されることになった。4℃の冷蔵庫での保存をリクエストできたが、このような時の組織の状態は基本的には悪く、状態のよい組織が得られたのは1回のみであった。

④最良の輸送条件

組織が得られたら直ぐに発送していただき、保冷パックを使用し、日本への到着は平日で、税関のチェックが直ぐに行われ、成田空港からつくばまで、宅急便の特別便で送られてくるのが、最良の組織が得られる条件（総輸送時間は30-36時間）であると考えられた。

この条件で組織が送られて来た場合、組織中の死細胞の割合は、15%以下であった。

(2)ヒト膵導管細胞の増殖培養

届いた組織を10%のウシ胎児血清を含むCMRL1066培地を用いて増殖培養を行った。

組織の状態がよく死細胞の少ない時は、膵導管細胞の増殖が認められた。

組織中の死細胞の割合が15%以下の時の細胞増殖は良好であった。しかし、死細胞が多い時は、増殖は不良であり、時に全く増殖細胞が認められないことがあった。

組織の状態が悪いときにも、その後の実験に使用できるレベルの増殖細胞を得ようと

以下の試みを行った。

細胞増殖因子である上皮細胞増殖因子 (EGF) や肝細胞増殖因子 (HGF) を増殖培地に添加したが、状態の改善は得られなかった。

細胞外基質と様々な増殖因子を含むマトリゲル®を使用したところ、増殖する細胞の増加が認められた。また、増殖した細胞は風船状 (嚢胞状) の構造をとった。組織の状態が非常に悪いときには増殖細胞は認められなかったが、やや不良 (死細胞の割合が 15~30%程度) の時は、この培養方法を使用し、増殖した細胞を以下の分化誘導実験に用いた。

(3) 磁気ビーズによるヒト膵導管細胞の分離

ヒト膵導管細胞は細胞表面に CA19-9 という物質が存在し、それに対する特異抗体と、磁気ビーズシステム (MACS®) を用いることにより、ヒト膵導管細胞だけをセレクションできる。

この方法で我々が得た組織から、ヒト膵導管細胞を分離することを試みたが、成功しなかった。最大の問題は、組織に含まれる死細胞やその残骸であった。

磁気ビーズシステムでは、抗体と反応した細胞のみが、磁場内の専用カラム内にとどまり、それ以外の細胞はカラムを素通りしていく。しかし、死細胞やその残骸は抗体と反応していなくても、非特異的にカラムに引っかかり、本来素通りするはずの細胞まで一緒にカラムに引っかかってしまったことが、分離ができなかった理由と考えられた。

死細胞やその残骸を減量する方法も試みたが、分離に成功しなかった。

増殖前の細胞を分離に用いるのが原法であるが、死細胞とその残骸が減少することを期待して、増殖培養後の細胞を用いて分離を試みた。この場合は細胞が培養容器内の底面に付着した状態で増殖し、細胞同士が強固にくっついた状態になり、カラムを通過できないため、細胞分散酵素で処理し、1細胞ずつに分離したところ、ヒト膵導管細胞の分離は何とかできる様になったが、分離した細胞はバイアビリティが低下しており、以後の実験に用いることができなかった。

バイアビリティの低下の主な原因は、細胞分散酵素による処理であると考えられた。

(4) インスリン産生細胞への分化誘導実験

増殖培地から分化誘導培地に変更し、分化誘導実験を行った。

① グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の効果

インクレチンの一種である GLP-1 を分化誘導培地に添加した。インクレチンは膵 B 細胞に作用し、インスリン分泌を促進するペプチドである。

この GLP-1 を添加されたヒト膵導管細胞で

は、インスリン遺伝子の発現の増加が認められた (添加 3-4 日後、および 7-8 日後)。

このインスリン遺伝子の発現は、GLP-1 の濃度が 100 ng/ml の時に最大となり、それ以上の濃度にしても更なる増加は認められなかった。

GLP-1 受容体のアゴニストである exendin-4 を添加しても同様にインスリン遺伝子の発現の増加が認められたが、最大効果が認められる濃度が 1-10 nM の間で実験毎にバラツキがあった。また、高濃度にするかえって、死細胞が増え、インスリン遺伝子の発現が低下した。

② ニューロジェニン-3 (ngn-3) の発現

ngn-3 は幹/前駆細胞から膵 B 細胞が分化する際に一過性に発現する転写因子である。

GLP-1 が添加され、インスリン遺伝子の発現が亢進している細胞で、ngn-3 の遺伝子発現を測定したところ、同様に増加していた。

この増加は、添加 3-4 日目でも、7-8 日後でも同様に認められた。

③ マトリゲル® の効果

マトリゲル® を使用すると、インスリン遺伝子の発現が増加する傾向があった。含有する増殖因子を減らしたマトリゲル® では、さらに発現が増加する傾向があった。

(5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では、ヒトの細胞を使用していることが最大の特徴である。

輸送条件の検討は、我々だけでなく、今後ヒト組織を外国から輸入して研究を試みる場合に参考になると考えられる。

肝臓の様に臓器の状態を輸送され、国内で処理し、ヒト細胞を場合や、海外で凍結保存された細胞を凍結状態で輸送するのが、一般的なヒト細胞の入手方法であるが、そのような方法が使えない細胞・組織の場合には、役に立つ研究成果であると考えられる。

細胞増殖方法についての検討では、基本的には状態の良い (死細胞の少ない) 組織・細胞を得ることが最も重要ではあるが、マトリゲル® を用いることにより、状況を若干改善することがわかった。ヒト膵導管細胞の増殖にマトリゲル® を用いたという報告はなかった。

培養ヒト膵導管細胞において、GLP-1 がインスリン産生細胞への分化を促進していることが示唆された。インクレチン関連薬は 2010 年から 2 型糖尿病の治療薬として日本でも使用できるようになっており、これらはインスリン分泌刺激することにより、血糖値を低下する。しかし、インクレチンの一種である GLP-1 が膵導管細胞から膵 B 細胞への分化を刺激するのであれば、膵 B 細胞量の増加

が期待できることになる。

ngn-3 の発現については、導管細胞から膵 B 細胞に近づいていることを示すものである。しかし、ngn-3 は成熟した B 細胞では発現していないため、我々の実験系で得られている細胞はまだ分化の途中であり未熟であると考えられる。方向性は間違っていないが、道半ばということである。

(6) 今後の展望

より多くの、より成熟した膵 B 細胞を得る必要がある。インクレチンと細胞外基質の使用は有用なツールとなる可能性が高い。

GLP-1 受容体アゴニストであり、臨床で使用されているリラグルチドの効果も検討してみたい。

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)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢藤 繁 (YATOH SHIGERU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科

講師

研究者番号：50451703