

細胞療法に応用する膵 β 細胞 および組織幹細胞の開発

研究課題番号 14571236

平成14年～平成16年度 科学研究費補助金
基盤研究 (C)

研究成果報告書



平成17年3月

研究代表者 土谷まり子
(東京女子医科大学医学部 講師)



細胞療法に応用する膵β細胞および組織幹細胞の開発

研究課題番号 14571236

平成 14 年～平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究 C）

研究成果報告書

平成 17 年 3 月

研究代表者 土谷まり子

（東京女子医科大学医学部 講師）

はしがき

細胞療法に応用する膵β細胞の開発を目的として、大型哺乳類で比較的入手が容易であるブタ種を用いて、膵内分泌細胞の分化、増殖に関わる成長因子、転写因子の解析を行った。開始当初、pancreatic stem cell あるいは pancreatic progenitor cell の分離、応用も目的であったが、最近の知見より、移植細胞ソースの可能性が大きく広がり、また予想以上の細胞の可塑性が報告され、他の組織、分化系列の細胞も応用が可能であり、ブタ膵幹細胞の分離に限定する必要性が減少してきた。よって膵幹細胞あるいはブタ種に拘泥せず、より現実的、基礎的な膵細胞の分化増殖に関わる検討を、移植細胞のみならず、移植環境についても行うこととなった。

平成 17 年 3 月

研究組織

研究代表者：土谷まり子（東京女子医科大学医学部講師）

研究分担者：土谷健（東京女子医科大学医学部講師）

研究分担者：大河原久子（東京女子医科大学医学部助教授）（退職のため 15 年度まで）

研究経費

交付決定額（配分額）	（金額単位：千円）		
	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	1, 6 0 0	0	1, 6 0 0
平成 15 年度	1, 1 0 0	0	1, 1 0 0
平成 16 年度	7 0 0	0	7 0 0

研究発表

(1) 学会誌等

1. Imaki J, Tsuchiya K, Mishima T, Onodera H, Kim JI, Yoshida K, Ikeda H, and Sakai H: Developmental contribution of c-maf in the kidney: distribution and developmental study of c-maf mRNA in normal mice kidney and histological study of c-maf knockout mice kidney and liver. **Biochem Biophys Res Commun** 320: 1323-1327, 2004
2. Nagai K, Tsuchiya K, Ezaki T, Tsuchiya M and Ohgawara H: Effect of GLP-1(Glucagon-like Peptide1:7-36 Amide) on porcine pancreatic endocrine cell proliferation and insulin secretion. **Pancreas** 28: 138-145, 2004
3. Tsuchiya M, Tsuchiya K, Iwami Y, Ohgawara H: Analysis of gene expression and insulin secretion by monolayer-forming adult porcine pancreatic endocrine cells. **Pancreas** 26: 71-75, 2003
4. Tsuchiya M, Tsuchiya K, Ohgawara H: Molecular cloning of the porcine insulin cDNA using a monolayer culture of pancreatic endocrine cells. **Cell Trans.** 10: 485-491, 2001

(2) 口頭発表

1. 土谷まり子、土谷健、谷口繁生、安田和基、白鳥敬子、山下克子 膵組織における large maf family の発現検討 再生医療学会 3/1-2,2005 大阪 再生医療 4 (Supple)151
2. 谷口繁生、大河原久子、土谷 健、土谷まり子、大河内仁志、鏑木康志、安田和基 新生仔ブタ膵臓からの SP(side population)細胞の単離と性質の検討 糖尿病 27supple.1:S-112, 2004(抄録)
3. Mariko Tsuchiya, Ken Tsuchiya, Shigeki Taniguchi, Kazuki Yasuda, Atsushi Maeda, Mutsuo Shigemoto and Katsuko Yamashita Large maf expression mediates biological properties and endocrine function in rat pancreas. 64th Scientific session of **American Diabetic Association** Jun, 2004(abstract)
4. Mariko Tsuchiya, Ken Tsuchiya, Akiko Niimi, Ryoichi Misaka, Takeshi Kurihara, Atsushi Maeda, Mutsuo Shigemoto and Katsuko Yamashita Large maf expression in rat ischemic re-perfusion pancreatic injury 膵臓 19:313,2004(abstract) 国際膵臓病学会 7/11-14,2004 Sendai
5. Mariko Tsuchiya, Ken Tsuchiya, Akiko Niimi, Ryoichi Misaka, Takeshi Kurihara, Atsushi Maeda, Mutsuo Shigemoto and Katsuko Yamashita Large maf expression in rat ischemic re-perfusion pancreatic injury **American Pancreatic Association** 11/2-3,2003 Chicago

出版物

土谷まり子, 土谷 健, 大河原久子: 再生医療の最前線 膵再生 小児内科 34: 94-92,2002

研究成果の概要

1. cell lineage の追求

細胞療法に応用する膵細胞の開発目的で、porcine newborn の endocrine cell を分離し、マーカーにより、cell sorting して、stem cell の分離を試みた。国立国際医療センター安田らとの共同研究で、SP(side population) cell として、stem cell が濃縮したと考えられる分画が得られ、2004.5 月糖尿病学会に発表した。

しかし、stem cell の単離を以外にも、細胞療法に用いる細胞は多くの可能性が出てきた。それは stem cell そのものが分化をとげて膵内分泌細胞になるのみならず、いろいろな細胞が、redifferentiation, transdifferentiation を起こしうるということが報告され、さらに移植細胞そのものも、paracrine, autocrine の作用により、周囲の細胞環境に大きく依存することがわかってきている。

実用目的の細胞療法については多くの細胞が候補に挙がっており、膵自体の移植細胞環境としての知見も求められることとなってきた。In vivo の検討も重要視され、このような観点から以下の研究も継続して行っている。

2. 膵内分泌細胞の分化に関わる転写因子、増殖因子

平成 14 年度、15 年度と、膵内分泌細胞の分化、増殖に関わる growth hormone や転写因子を検討してきており、インクレチンのひとつである GLP-1 は、ブタ膵内分泌細胞の増殖、インスリン分泌維持に働き、消化管ペプチドが PDX-1 を介して血糖調節に関わることが明かにされた(Pancreas 2004)。現在コノフィリン添加による培養で長期のインスリン分泌機能の維持、細胞増殖の効果を検討している。

また膵細胞の分化に関わる転写因子を培養細胞で検討してきたが(Pancreas 2003)、最終年度は転写因子 large maf の発現を中心に行い、maf family が膵の発達、分化に深く関わることを膵虚血負荷や発達期の膵の発現を検討することにより示した(再生医療学会 2005.3 月)。導管の発達分化や、インスリン以外の膵分泌ホルモンにも関わる転写因子であり、今後臨床的な重要性が考えられる。Preliminary ながら、膵組織において mafA, c-maf, mafB は insulin のみならず glucagon, pancreatic peptide などの分泌顆粒とそれぞれ共染色しており、また pancreatic cancer cell line やリンパ、脂肪組織にも発現が見られ、炎症、再生、発癌、発達の変化の過程と、血糖調節を介する代謝要因にリンクする転写因子であることが示唆され、炎症を基礎に発生する病態と代謝疾患の関連、膵の発癌と内分泌機構の接点などの検討を今後の課題としている。

膵組織における large maf family の発現検討

抄録

Maf family は bZip 構造を持つ転写因子で、最近 Large maf の膵ラ氏島細胞の分化過程での発現および、インスリンやグルカゴン分泌細胞に各 maf が特異的に対応する図式が報告され注目されている。しかしながら、*in vivo* における各 maf の局在、発現の変化に影響を与える因子などについては不明な点が多い。今回、外因負荷の影響としてラットを用いた膵虚血再還流モデルにおける large maf の発現を検討した。さらに大型哺乳類であるブタで、新生仔および成人ブタ膵での発達上の発現の変化を観察した。ラットの短胃動脈を 40 分間クランプして虚血負荷とし、その後再還流し、24, 48, 72 時間後の変化を realtime PCR, 特異的抗体を用いた Western blotting, 組織酵素抗体法などにより検討した。ブタ maf の sequence は独自に決定し、特異的 primer を作製した。MafA, mafB, c-Maf とも、抑制の後発現の亢進がみられたが、程度、時相には差異があり、また、局在はラ氏島内だけでなく島外にも陽性となる細胞が散見された。ブタ膵では新生仔でラ氏島形成が十分でなく、mafB が顕著に染色されたが、成人にいたると島形成が明らかになり、mafA がラ氏島内細胞に染色され、発達に伴う変化が観察された。組織侵襲の際に maf の発現が誘導され、各 maf 特異的に修復、再生の機構に何らかの形で関わる可能性が示唆され、また、発達段階の分化形成の過程への関与も推測された。

はじめに

Maf family は bZip 構造を持つ転写因子で、広く各臓器に分布しているが、最近 family のひとつの mafA が膵β細胞の分化に特化した作用を発揮することが報告され、さらにわれわれが Maf に注目したのは、PDX-1 と binding site を持ち、insulin, glucagon との共発現が認められており、maf 自体が、比較的末梢の内分泌細胞の分化にかかわり、その他の病的意味が推察されたからである。

今回、われわれは幾つかの maf の *in vivo* での実際の発現をブタおよびヒト膵で確認した。

方法および結果

使用した primer および抗体は表 1 に示した。

まず膵の発達における発現について、生後数日の豚 newborn と adult 豚の組織およびヒト胎児 20W と成人の膵を比較した。この時期のインスリン染色は豚 newborn では single cell あるいは数個の cell cluster として認められる (Fig 1)。どの maf も Adult での islets cell の染色は明らかである。mafA は newborn では duct から腺傍細胞までかなり広範に染色され、蛍光染色にも adult と newborn の分布の差異は明らかである (Fig2,3)。MafB

は Newborn では発現がかなり限局していて duct に沿ったかたちで(immature) 腺傍細胞の cluster に染色され、ヒトについてもこの傾向ははっきりしており、duct 分枝に陽性細胞が見られ、これに沿った周囲の acinar bud に陽性細胞が観察された(Fig4,5)。c-maf も duct および duct 分枝から腺傍細胞の cluster に染色されるが、脂肪織にも陽性細胞が見られ、この傾向はヒト胎児についても同様であった(Fig6,7)。

次にこの maf の発現の誘導を成熟膵においても検討した。実際にはラット膵での虚血再灌流モデルで組織の障害、再生を促し検討した。ラットの短胃動脈をクランプし再灌流した虚血負荷で、膵組織の m-RNA, 蛋白のレベルそれぞれで、各 maf の誘導が見られた(Fig8,9)。その発現はおのおの相違があり、mafA は早期に上昇があり、mafB は緩徐に発現の増加が見られ、c-maf の反応は 2 相性になっていた。組織所見(Fig10)では、増加の分布は mafB,c-maf は islets 以外にも発現をましていた。虚血負荷後では、mafA では diffuse な発現はなく、mafB の duct の発現や c-maf の脂肪織やリンパ球での発現は同様に観察され、newborn, fetus でみられたような変化を想定させていた。

まとめると

1) マタおよびヒトでの膵組織学的検討

新生仔豚膵ではラ氏島の形成はされておらず、インスリン陽性細胞は single あるいは数個で存在する。

In vivo においても、maf A, B, c-maf の陽性細胞が確認された。

maf A は全体に duct, acinar ともに陽性細胞がみられる。

maf B は duct 分枝から acinar bud にかけて局在がみられ、c-maf は mafB と同様 duct から acinar bud にみられるが、辺縁の結合織にも陽性細胞がみられる。

成熟豚膵組織では各 maf はほぼラ氏島に染色される。

ヒト胎児膵においても同様の傾向が見られる。

2) ラット I/R 負荷モデルでの発現

虚血負荷では、各 maf の発現に時間的な差がみられるが、mRNA、蛋白レベルでも誘導される。

MafB, c-maf 陽性細胞はラ氏島外に増加が観察されるが、mafA については新生仔豚で観察されたような著明な増加はない。

考察

転写因子 maf は比較的機能分化の過程で発現し、各機能に特異的に作用する傾向があると推測されている。in vivo の膵臓には maf A のみならず、maf B, c-maf の存在が確認された。Maf A 陽性の細胞は新生時期はびまん性に分布し、この時期では PCNA の染色性と一致し (preliminary data)、また機能的にインスリンと共染がみられ、β細胞の分化の lineage を追跡する可能性が考えられた。

Maf B 陽性細胞では、PDX-1 との共染色性が観察され (preliminary data)、duct 形成や(虚血負荷の再生過程で)出現する可能性がある。Maf 陽性細胞はそれぞれ発達の段階からラ氏

島構成細胞への分化に関与する可能性がある。さらに、成熟膵においてもラ氏島外にも存在し、再生、増殖の過程に関与する可能性も推測された。

1) 膵内分泌細胞の分化に幾つかの maf が関わっている。

2) 各 maf には細胞特異性がある。

3) ラ氏島以外にも陽性細胞が存在し、発現が誘導される可能性がある。

発達期の膵における maf の発現の特徴は mafA が diffuse、mafB, c-maf それぞれも膵の形成に関与する可能性があり、組織障害時の再生にも関わる可能性が示された。

Maf は幼若膵ではかなり diffuse に分布し、adult になるとラ氏島に収束する傾向があり、maf が内分泌細胞の分化に関わっている可能性が実際に in vivo でも明らかにされた。しかし、実際にラ氏島以外にも存在している、それらになんらかの potential がある可能性があり、adult 膵でも再生を促す処置で、ラ氏島内の陽性細胞の動態は不明なので自己複製の情報はいえなかったが、ラ氏島外の陽性細胞の存在はそのような potential のある細胞の動員をもたらした可能性がある。

結語

large maf である mafA, mafB, c-maf の膵 in vivo での発現を確認した。各 maf の局在があり、膵の発達過程での陽性細胞の変化が確認された。さらに、成熟膵でも外因性負荷により発現レベルの変化をもたらされることが判明した。

使用した組織標本および抗体 Table 1

1) 生後3-5日新生仔豚と成熟豚の膵組織

ヒト胎児20週 (female) および成人 (male) の膵組織 固定標本 Bio Chain Institute 社

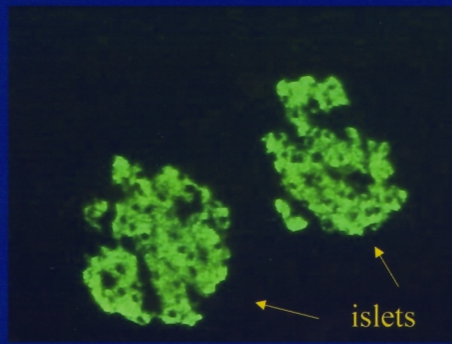
2) ラット膵虚血再還流モデル

短胃動脈を 40 分間クランプ後再還流し、24, 48, 72 時間後膵組織採取 mRNA 発現 real-time PCR, primer は primer3 にて作成

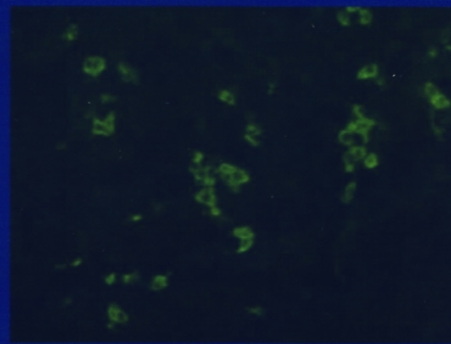
蛋白発現 Western blotting、組織酵素抗体法

MafA (BL1069) : Bethyl Laboratories, mafB (P20), cmaf (M153, N15), Glucagon (N17) : Santa Cruz Biochemistry, Insulin (Clone2006) : Zymed Laboratories

ブタ膵インスリン蛍光染色



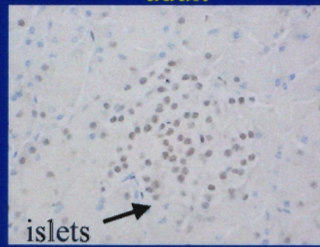
Adult



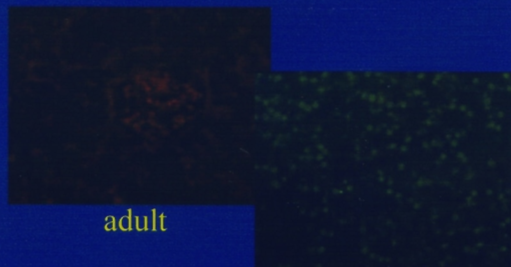
Newborn

ブタ膵のmafA染色

adult

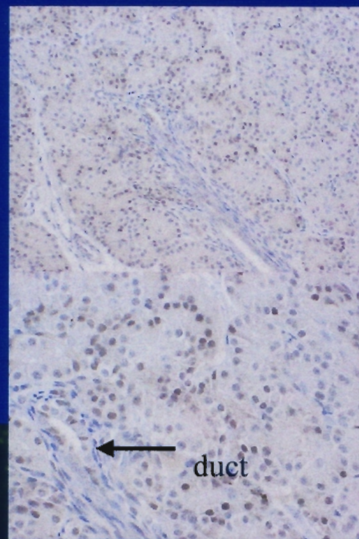


islets



adult

newborn

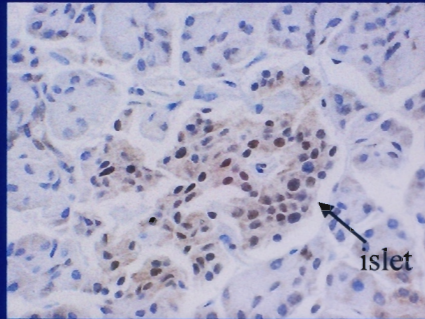


duct

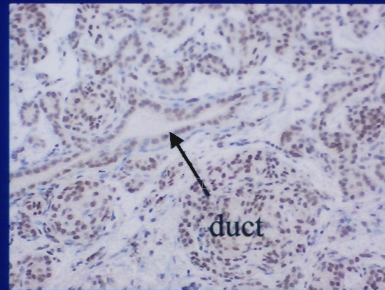
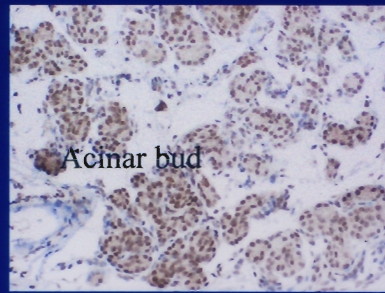
Newborn

S8

ヒト膵のmafA染色



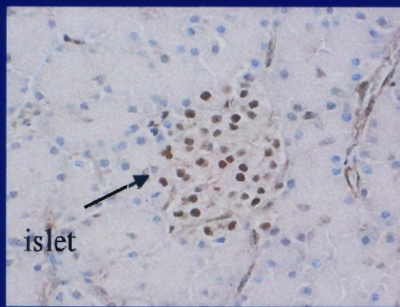
Adult



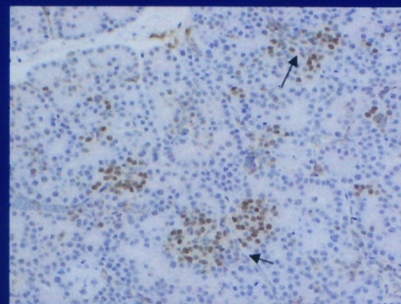
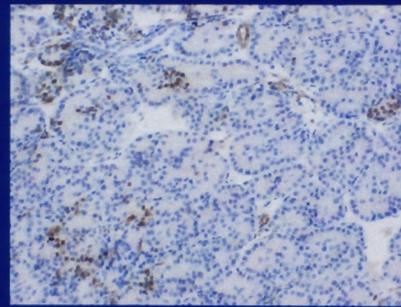
Fetus

S9

ブタ膵のmafB染色



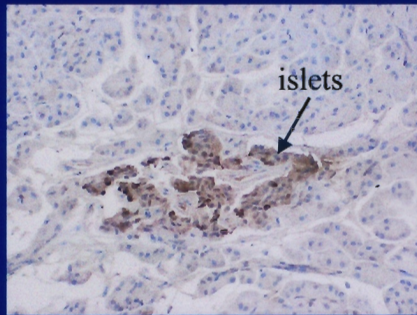
Adult



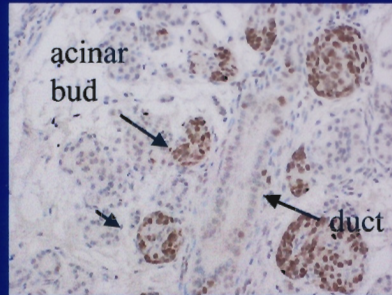
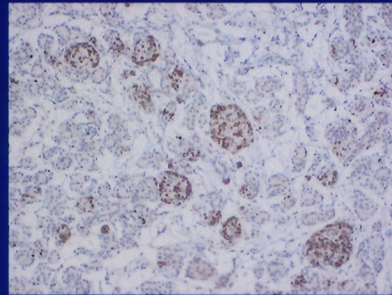
newborn

S10

ヒト膵のmafB染色



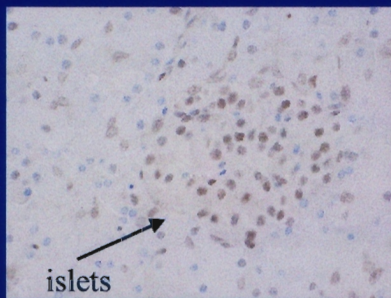
adult



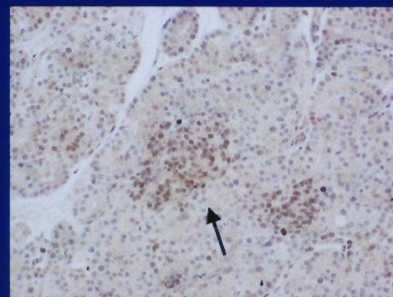
fetus

S11

ブタ膵のc-maf染色

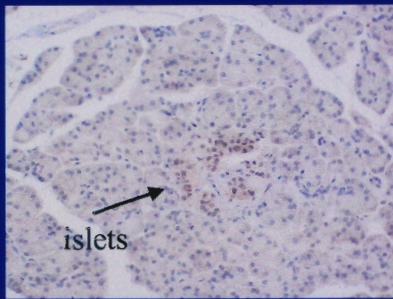


adult

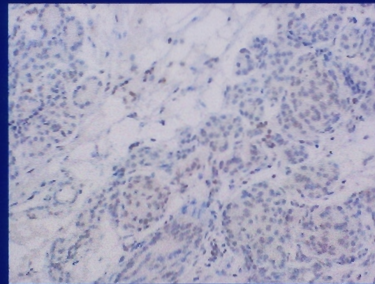
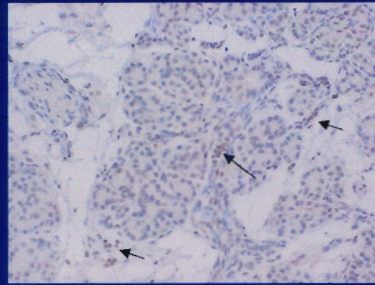


newborn

ヒト膵のc-maf染色



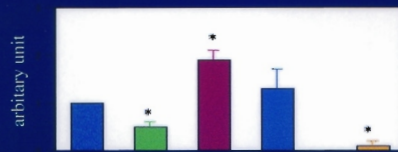
adult



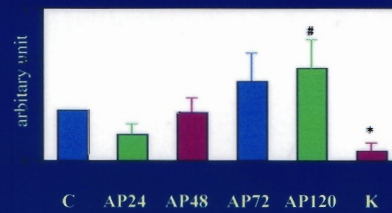
fetus

虚血再灌流ラット膵各mafのmRNA発現の経時変化

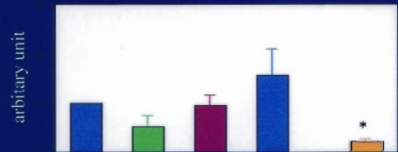
mafA



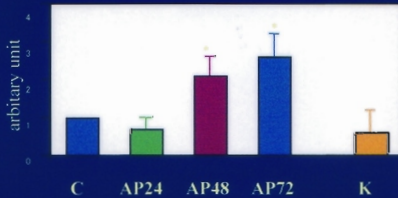
Maf B (long)



Maf B

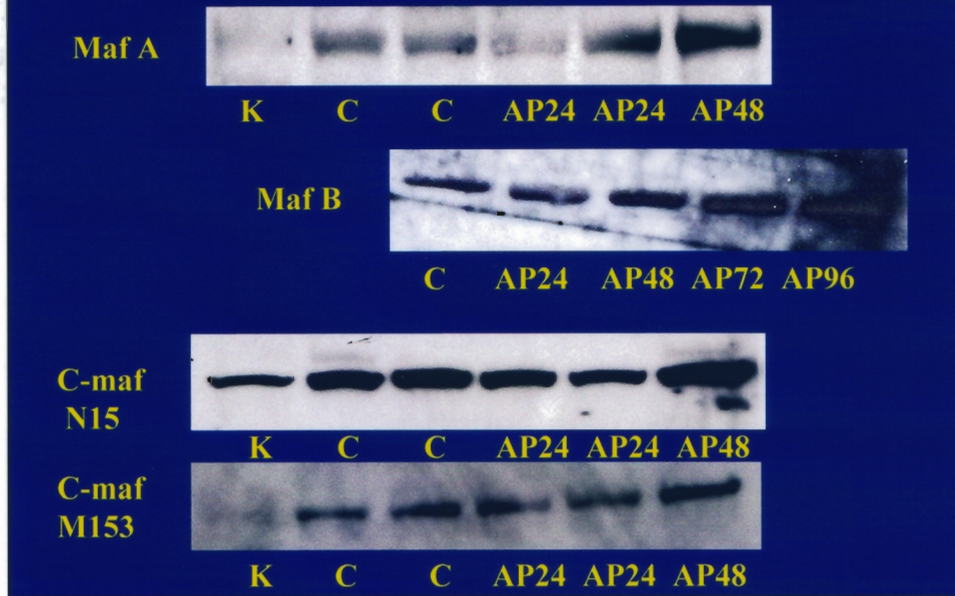


Maf C



*p<0.01, #p<0.05

虚血再灌流ラット膵各mafの蛋白発現の経時変化



虚血再灌流ラット膵組織のmafの発現

