

報告書

平成16年度 丸木記念特別奨学研究費A 研究実績報告書

膵β細胞の分化の分子機構の解明と再生医療による糖尿病治療

受賞者 松本 征仁 (埼玉医科大学 分子生物学)

共同研究者 中野 慈子¹⁾, 石川 桃太郎²⁾, 茅野 秀一³⁾久武 幸司¹⁾, 谷口 英樹²⁾, 禾 泰壽¹⁾

1. はじめに

高等生物の器官形成は細胞外シグナルを介して幹細胞/前駆細胞 (progenitor) から特定系列への細胞分化を規定する決定的な転写因子による遺伝子発現調節をうけて成熟細胞へと系統的に分化する。膵発生において膵内分泌前駆細胞内に一過性に発現する neurogenin (ngn) 3は、膵内分泌細胞分化を決定づける master 転写制御因子として機能したのち速やかに消失する。しかしながら、ngn3 発現制御の詳細な分子機構は不明な点が多く、ngn3 の misexpression が膵形成不全を引き起こすため正常な膵発生に必須となる ngn3 の機能とその詳細な役割についての理解は膵β細胞を用いた糖尿病治療の再生医学的アプローチを実施する上で重要である。

2. 研究成果

再生医療による糖尿病治療を行うには膵β細胞の分化を試験管内でコントロールし、効率良く増やす手法を確立すること、ならびに膵内分泌細胞の分化の分子機構を理解する必要がある。我々はこれらの問題に対して発生工学的アプローチにより、ngn3 遺伝子の制御下にEGFPを発現するトランスジェニックマウス (ngn3-GFP) を作製し progenitor の単離を試みた。さらに progenitor から特定の細胞系列への細胞分化の経時的变化をリアルタイムで観察するため、膵β細胞を分化モデルとしてラットインスリンプロモータ制御下にDsRed2を発現するTgマウス (ins-DsR) を作製し、ngn3-GFPマウスとの交配により2重蛍光標識Tgマウスを作出した。解析の結果、GFP陽性細胞が胎仔および新生仔の内胚葉系に由来する胃・腸管・膵の一部に観察され、ngn3発現と一致することを確認した。ngn3-

GFP/Ins-DsR2重蛍光標識トランスジェニックマウス (DTg) の胎仔膵よりGFP陽性 progenitor を細胞分離装置 (FACS) により選択的かつ効率的に分離し試験管内共培養を行ったところ、progenitor からGFP陽性細胞の減少に伴いDsRed2陽性細胞の増加を認めた。培養8日目で全生存細胞の約3分の1の細胞がDsRed2陽性であり、それらの細胞はインスリン陽性であった。またGFP陽性 progenitor はインスリン陽性細胞のみならずグルカゴン、ソマトスタチン陽性細胞への多分化能を有することから多分化能を有していることが示された。興味深いことにこれらのβ細胞分化は細胞増殖を伴わないこと、さらにβ細胞への分化にはGFP陰性分画の細胞に由来する液性因子のβ細胞分化誘導因子の存在が明らかとなった。スクリーニングの結果、我々はβ細胞分化を促進する因子を同定した。

次に膵内分泌 progenitor に対するβ細胞分化誘導因子の作用を調べるため、ngn3 遺伝子の制御下に緑色蛍光タンパク質 (GFP) と不死化遺伝子 SV40 ラージ T 抗原 (SVT) を発現するトランスジェニックマウス作製し、SVT で不死化した GFP/ngn3 陽性膵新生腫瘍より未分化な球状 Tec-3p 細胞株を樹立した。Tec-3p 細胞株をレチノイン酸刺激により付着細胞に形態的に変化した細胞株 Tec-3 を用いてレポーター遺伝子解析を行った結果、β細胞分化誘導因子が ngn3 遺伝子の発現を抑制することを見出した。ngn3 遺伝子発現の抑制機構について解析を行った結果、Notch シグナルのメディエーター Hes1、転写抑制に関わる共役因子 Grg、ヒストン脱アセチル化酵素 Hdac が相互に結合し、これら形成された複合体が ngn3 遺伝子の転写抑制に寄与していることを見出した。さらに膵内分泌前駆細胞をEGFPで標識した ngn3-EGFP 胎仔マウスに Notch シグナル阻害剤 DBZ を投与した結果、野生型に比較して E17.5 胎仔膵内の GFP 陽性細胞の有意な増加を認めた。従って以上の結果より、Notch シグナルを

1) 埼玉医科大学 分子生物学, 2) 横浜市立大学 医・臓器再生
3) 埼玉医科大学 病理学

介した *ngn3* のネガティブフィードバック機構によるクロマチン再構成が膵内分泌前駆細胞数をコントロールして正常な内分泌細胞分化に寄与していると考えられる。

3. おわりに

糖尿病は発症すると治療が困難であり、網膜症・腎症・神経障害などの合併症を引き起こす重篤な慢性的生活習慣病である。国内の糖尿病患者数は予備群を含めると1,000万人以上に達し、糖尿病に関連する医療費は1兆1,155億円(平成12年度推計)と今後も糖尿病人口とその医療費が増加すると予測されている。しかしながら、現在の食餌療法・抗糖尿病薬やインスリン投与等では合併症の併発の遅延効果を主体とした治療法であるため根本治療を目指した治療としては不十分である。また膵臓・膵島を用いたβ細胞の移植治療では必要な細胞数の確保が困難であることに加え組織適合性による拒絶反応など深刻な問題があり、同時に糖尿病の発症機序はもとより膵臓β細胞の発生・分化の詳細な分子機構については多くの不明な点が残されている。このため近年、新たな糖尿病の先端治療的アプローチとしてインスリンを分泌する膵β細胞を人為的に試験内で増幅させて利用しようとする再生医療による糖尿病治療の改善に大きな期待がよせられており、今後糖尿病モデルマウスを用いて本研究で同定したβ細胞分化誘導因子の糖尿病治療効果の検討ならびに *ngn3* による膵内分泌細胞分化の分子機構解明による糖尿病治療に有効な分子標的の探索により再生医学の臨床応用に有効な新たな糖尿病治療法の進展に役立つことが期待される。

謝 辞

本研究は平成16年度丸木記念特別奨学研究費A、平成14年度興和生命科学研究所助成および平成15年度上原記念財団研究助成のサポートによって実施された。

研究発表

原著論文

- 1) Imazawa Y, Hisatake K, Mitsuzawa H, Matsumoto M, Tsukui T, Nkagawa K, Nakadai T, Shimada M, Ishihama A and Nogi Y. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 11467-74.
- 2) Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, Hisatake K, and Nogi Y. Essential role of p38 MAP Kinase in Cathepsin K Gene Expression during Osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. (2004) *J. Biol. Chem.* 279,45969-79.
- 3) Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Tsukui T,

Matsumoto M, Nogi Y, Meisternt M, and Hisatake K. A transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates a high level of transcription activation by GAL4-VP16. (2004) *Mol. Cell. Biol.* 24, 6525-35

学会発表

- 1) 松本征仁. 2重蛍光標識マウスを用いた膵臓内分泌細胞の分化の分子機構 第143回日本獣医学会学術集会【招待講演】2007.
- 2) Matsumoto M, Kawashimo K, Hisatake K, Ishikawa M, Taniguchi H, Nogi Y. Development of pancreatic endocrine cells mediated by a negative feedback regulation of transcription factor *ngn3*. The 7th Annual Rachmiel Levine Diabetes and Obesity Symposium. 2006.
- 3) Matsumoto M, Ishikawa M, Taniguchi K, Nogi Y. Development of pancreatic endocrine cells mediated by a negative feedback regulation of *Ngng3*. The 19th Naito Conference 2006.
- 4) Matsumoto M, Kawashimo K, Ishikawa M, Hisatake K, Taniguchi H, Nogi Y. Development of pancreatic endocrine cells mediated by a negative feedback regulation of *Ngng3*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 2006.
- 5) 松本征仁, 中野滋子, 久武幸司, 石川桃太郎, 茅野秀一, 谷口英樹, 禾泰壽. 内胚葉系未分化細胞株 *Tec-3* の樹立と *ngn3* 遺伝子の制御機構 第49回日本糖尿病学会年次学術集会 2006.
- 6) Matsumoto M, Kawashimo K, Ishikawa M, Hisatake K, Taniguchi H, and Nogi Y. Identification of a factor that supports differentiation of pancreatic endocrine cells mediated by a negative feedback regulation of *Ngng3*. Keystone Symposia【招待講演】2006.
- 7) 松本征仁, 川下金明, 宮城有美, 久武幸司, 茅野秀一, 石川桃太郎, 谷口英樹, 禾泰壽. 内胚葉系前駆細胞から膵β細胞への分化制御システムと可塑性の検討 第48回日本糖尿病学会年次学術集会ワークショップ 2005.
- 8) 松本征仁, 久武幸司, 石川桃太郎, 茅野秀一, 谷口英樹, 禾泰壽. C57BL/6*ngn3*-svtマウスを用いた内胚葉系未分化細胞株 *Tec-3* の樹立と性質の検討 第28回日本分子生物学会年会 2005.
- 9) Matsumoto M, Kawashimo K, Hisatake K, Ishikawa M, Oshima Y, Taniguchi H and Nogi Y. Isolation and characterization of progenitors that differentiate into pancreatic endocrine cells. Keystone Symposia 2005.

- 10) 松本征仁, 川下金明, 宮城有美, 久武幸司, 茅野秀一, 石川桃太郎, 谷口英樹, 禾泰壽. 内胚葉系前駆細胞の単離による膵β細胞の分化制御システム第27回日本分子生物学会年会 2004.
- 11) 松本征仁, 久武幸司, 松本英子, 大島祐二, 茅野秀一, 谷口英樹, 禾泰壽. トランスジェニックマウスを用いた前駆細胞の単離と膵β細胞分化のリアルタイム検出系の開発 第47回日本糖尿病学会 2004.
- 12) 松本征仁, 甲川昌和, 久武幸司, 和田誠基, 高柳広, 片山茂裕, 禾泰壽. p38MAPKの標的因子NFATc1はPU.1と協調的にカテプシンK遺伝子の発現を誘導する 第22回日本骨代謝学会 2004.
- 13) 松本征仁, 甲川昌和, 和田誠基, 久武幸司, 片山茂裕, 禾泰壽. p38 MAPキナーゼを介した転写因子による破骨細胞の分化段階的制御 第77回日本生化学会大会 ワークショップ2004.
- 14) Matsumoto M, Hisatake K, Matsumoto H, Oshima Y, Kayano S, Taniguchi H and Nogi Y. Establishment of isolation of pancreatic endocrine precursor cells Keystone Symposia, Diabetes Mellitus 2004.