

報告書

平成14年度 丸木記念特別奨学研究費 B 研究実績報告書

膵臓ランゲルハンス島β細胞の再生と糖尿病治療への応用

受賞者 松本 征仁 (埼玉医科大学分子生物学教室)

糖尿病は、一度発症すると治療が困難であり、網膜症・腎症・神経障害・脳卒中・心臓病などの合併症を引き起こす重篤な慢性的疾患である。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、そのためには膵臓の発生・分化を理解することが不可欠であると考えられる。本研究は、遺伝子改変マウスを用いて膵臓の発生・分化のしくみを分子レベルで解明し、さらに糖尿病治療を目指した再生医療の基礎から臨床応用へ進展させることを目的としている。

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必要がある。bHLH型転写因子のNeurogenin3(Ngn3)は膵内分泌細胞・胃腸管組織の発生に重要であり、膵において前駆細胞で特異的に発現が認められる。このことはNgn3を発現する細胞を同定できれば、膵内分泌前駆細胞を単離できることを意味している。そこで私どもは、2重蛍光標識した遺伝子改変マウスを作製し、個体および試験管内で前駆細胞から膵β細胞分化のモニタリングを可能にする時系列分化システムを確立した。このマウスの特徴は、膵臓内分泌の前駆細胞に特異的に発現する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、さらにインスリン遺伝子の制御下に赤色蛍光タンパク質(DsRed)を発現するため、GFPで標識した前駆細胞を生体内でSVTにより増幅できると共にβ細胞に分化すると赤色蛍光を発するのでリアルタイムで膵β細胞分化を個々の細胞レベルで検出できる事である。これらのマウスの解析の結果、消化管の一部に緑色の蛍光陽性の細胞の存在が観察され、また耐糖能の低下と膵ランゲルハンス島の部分的な形成不全が観察された。さらに興味深いことに、5ラインのうち3ラインの生存率が生後1年後において40%以下であることが判明し、膵・十二指腸周辺に実体蛍光顕微鏡観察下でGFP陽性の腫瘍の組織形成が認められ、中には脾・肝臓の肥大とともに腫瘍細胞

の浸潤または腫瘍が形成される個体が確認された。腫瘍組織の免疫組織染色の結果、これらの腫瘍細胞が抗SVT抗体および抗Ngn3抗体で陽性であることが確認されたが、インスリンやCA19-9などの膵臓内分泌または外分泌由来ならびに神経系やその他の腫瘍マーカーの発現を認めない。従って、これらの腫瘍細胞が未分化な前駆細胞に由来していることが期待される。さらに、2重蛍光標識の遺伝子改変マウス由来のGFP陽性DsRed陰性の膵臓細胞を細胞分離ののち、ニコチンアミド存在下で約2週間細胞培養を行った結果、DsRed陽性の細胞が観察された。すなわち、このことは生体内で起こる膵β細胞の分化を試験管内でリアルタイムで再現できたことを示唆しており、現在詳細な解析を行っている。

研究発表リスト

○原著論文

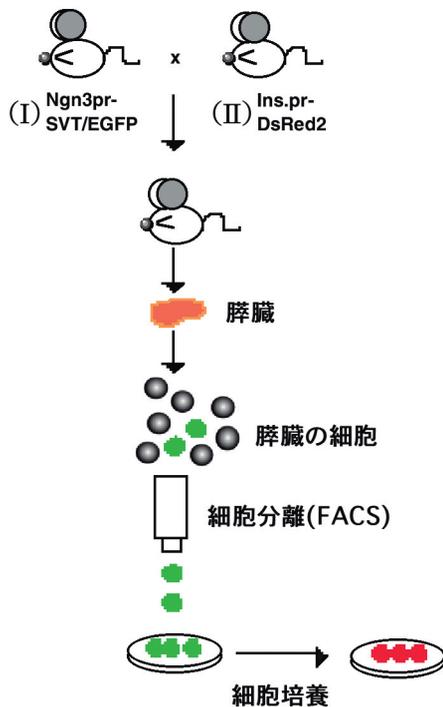
1. Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Takayanagi, H., Tsujimoto, M., Katayama, S., Hisatake, K. and Nogi, Y. Essential role of p38 MAP Kinase in Cathepsin K Gene Expression during Osteoclastogenesis through Association of NFATc1 and PU.1. (2004) J. Biol. Chem. in revision.
2. Fukuda, A., Nakadai, T., 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. in press.
3. Fukuda, A., Tokonabe, S., Hamada, M., Matsumoto, M., Tsukui, T., Nogi, Y., Hisatake, K. Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIIH. (2003) J. Biol. Chem. 278(17), 14827-31.
4. Nakagawa, K., Hisatake, K., Imazawa, Y., Ishiguro, A., Matsumoto, M., Pape, L., Ishihama, A., and Nogi, Y. The fission yeast RPA51 is a functional homolog of the budding yeast A49 subunit of RNA polymerase

I and required for maintaining transcription of ribosomal DNA. (2003) *Genes Genet. Syst.* 78, 199-209.

5. Maruyama, S., Sumita, K., Shen, H., Kanoh, M., Xu, X., Sato, M., Matsumoto, M., Shinomiya, H., Asano, Y. Identification of IFN regulatory factor-1 binding site in IL-12 p40 gene promoter. (2003) *J. Immunol.* 170(2), 997-1001.

○ 学会発表等

- 1 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
- 2 Matsumoto, M., Hisatake, K., Matsumoto, H., Oshima, Y., Kayano, S., Taniguchi, H., and Nogi, Y.



図の説明. (I) 緑色蛍光タンパク質(GFP)トランスジェニック(Ngn3pr-SVT/EGFP)マウスの作製 このマウスのNgn3を発現する前駆細胞は, GFPと不死化遺伝子SV40ラージT抗原を一過性に発現するため, 増殖した前駆細胞を細胞分離装置(セルソーター; FACS)で分離することができる. さらにCreリコンビナーゼを発現するアデノウイルスを用いたCre-LoxPシステムを用いて, T抗原とGFP遺伝子を切除することで正常な細胞の性質が回復できると考えられる. (II) 赤色蛍光タンパク質(DsRed2) (Ins.pr-DsRed2)マウスの作製 インスリン遺伝子の制御下でDsRed2を発現する遺伝子改変マウスを作製し, (I)のマウスと交配させる. この遺伝子改変マウスより単離した前駆細胞は移植により生体内で, または試験管内培養でβ細胞の分化に伴って緑色から赤色蛍光として検出できる.

Establishment of isolation of pancreatic endocrine precursor cells. *Keystoe Symposia, Diabetes Mellitus*, Mar. 4-10. 2004 Banff

- 3 松本征仁, 久武幸司, 松本英子, 茅野秀一, 谷口英樹, 禾泰壽 遺伝子改変マウスを利用した膵内分泌前駆細胞の単離と性質の検討 第26回日本分子生物学会年会 ワークショップ 2003
- 4 松本英子, 松本征仁, 久武幸司, 禾泰壽 インシュリンプロモーターを用いたトランスジェニックマウスモデルによる膵β細胞分化の検出系の確立 第26回日本分子生物学会年会 2003
- 5 松本征仁 再生医療を目指した膵臓β細胞のリアルタイム分化検出システムの開発 特別講演:新潟大学 神経科学研究所 2003
- 6 松本征仁 多因子性疾患, 骨粗鬆症と糖尿病に関わる破骨細胞と膵臓β細胞をモデルとした転写因子を介した細胞分化の分子機構の解明—p38MAPキナーゼを介した破骨細胞分化, 再生医療を目指した膵臓β細胞のリアルタイム分化検出システムの開発 特別講演:埼玉がんセンター 2003
- 7 松本征仁, 甲川昌和, 久武幸司, 和田誠基, 禾泰壽 破骨細胞分化に伴うp38MAPKの標的因子NFATc1はPU.1との協調作用によりカテプシンK遺伝子の発現を誘導する 第26回日本分子生物学会年会 2003
- 8 Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Katayama, S., Hisatake, K. and Nogi, Y. Essential role of p38 MAP kinase signaling pathway for receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)-induced expression of marker genes in osteoclastogenesis. 1st Joint Meeting of IBMS-JSBMR 2003. Jun.7, Osaka.
- 9 Matsumoto, M., Nakagawa, K., Hisatake, K., and Nogi, Y. Establishment of isolation of pancreatic endocrine precursor cells. *Keystoe Symposia, Islet Biology*, Jan.21-26.2003 Keystone
- 10 松本征仁, 中川香を, 茅野秀一, 濱田光浩, 久武幸司, 禾泰壽 すい臓内分泌細胞の前駆細胞の単離のための検出システムの構築 第25回日本分子生物学会年会 2002

その他共同研究発表

- 1) M. Kogawa, S. Wada, M. Matsumoto, S. Yasuda, M. Iitaka, Y. Nogi, S. Katayama Differential regulation by cell adhesion on CT-induced ERK and p38 MAPK signaling in mature mouse osteoclasts 1st Joint Meeting of IBMS-JSBMR 2003
- 2) 安田重光, 甲川昌和, 和田誠基, 松本征仁, 禾泰壽, 飯高誠, 片山茂裕 成熟破骨細胞におけるカルシトニンシグナル伝達機構とMAPK関与の検討第76回日本内分泌学会学術総 2003
- 3) 今澤由紀子, 久武幸司, 中川香をり, 光澤浩,

- 津久井 通, 松本 征仁, 濱田 光浩, 石浜 明, 村松 實美, 禾 泰壽 分裂酵母 RNA ポリメラーゼI の新規サブユニットと RPA21, Rrn3p との相互作用 第25回 日本分子生物学会年会, 2002.
- 4) 福田綾, 床鍋 繁喜, 濱田 光浩, 松本 征仁, 津久井 通, 禾 泰壽, 久武 幸司 c-fos 遺伝子の転写調節機構の解析 第25回 日本分子生物学会年会 2002.
- 5) Hisatake K., Fukuda A., Tokonabe S., Hamada M., Matsumoto M., Tsukui T., Nogi Y. A regulatory role for TFIIF in transcriptional activation 第25回日本分子生物学会年会, シンポジウム, 2002.
- 6) 甲川 昌和, 安田 重光, 和田 誠基, 松本 征仁, 禾 泰壽, 片山 茂裕 成熟破骨細胞におけるカルシトニンシグナル伝達機構と MAPK 関与の検討 第4回骨粗鬆症学 2002
- 7) Hisatake K., Fukuda A., Matsumoto M., Tsukui T., Nogi Y. Stimulation of Promoter Escape by a Coactivator PC4 5th EMBL Transcription Meeting, August 24-28, 2002.