

学位論文の要旨

Cell therapy with adipose tissue-derived stem cells for insulin-dependent diabetes mellitus in mice

インスリン依存性糖尿病マウスに対する脂肪幹細胞を用いた細胞治療

077707 梶山弘光

指導教員 石浦章一

1) 本研究の背景と目的

近年の医学的研究の進展により、様々な病気に対する治療法や治療薬は急速な進歩を遂げつつある。しかし、現代の医学でも根治することが困難な病気は数多く残されている。そうした病気の1つに、インスリン依存性糖尿病が挙げられる。インスリン依存性糖尿病は、膵臓のインスリン産生細胞が破壊されることが病因であり、インスリン分泌不全により血中のブドウ糖が正常に代謝されなくなる病気である。既存の治療法としては、インスリン注射により進行をくい止めることしか出来ておらず、革新的な治療法の開発が急務とされている。現在、様々な治療法が開発が進められる中で最も有望な治療法の1つとして、細胞移植による再生医療が注目を集めており、臨床応用において有効かつ安全なドナー細胞の選択方法や利用法について、世界中で研究が進められている。

近年、皮下脂肪組織に由来する脂肪幹細胞 (Adipose tissue-derived Stem Cells、以下 ASCs と略す) が同定された。ASCs は体内に豊富に存在する皮下脂肪から採取できる点で細胞数の確保が容易であり、細胞採取に伴う危険度も低いといった利点を有している。また *in vitro* の実験で、肝臓や筋肉など多系統の細胞への分化の可能性が示唆されている。このことは、も

し仮に ASCs がインスリン依存性糖尿病に対する再生医療へ応用可能であることが証明されれば、早期の臨床応用を目指す上で画期的なドナー細胞となりうることを示している。しかしながら ASCs のもつ多分化能については、未だ十分な知見は得られていないのが現状である。

そこで私は、分化誘導を行ったマウス ASCs のインスリン依存性糖尿病に対する治療効果を評価するために、同細胞をインスリン依存性糖尿病モデルマウスへ移植し、ドナー細胞としての応用可能性について検討を行った。

2) 方法と結果

私は最初にレシピエントとしてインスリン依存性糖尿病の病態モデルマウスの作製を行った。まず、インスリン依存性糖尿病を誘発させる薬剤であるストレプトゾトシン (Streptozotocin、以下 STZ と略す) をマウス腹腔内に投与した。対照群と比較すると、STZ 投与群においては STZ 投与 5 日後に血糖値がおおよそ 4 倍に上昇した ($P < 0.01$)。これらのマウスの膵組織切片を作製し、抗インスリン抗体を用いて免疫染色した結果、STZ 投与群でインスリン産生細胞が崩壊していた。以上より、STZ 投与によってインスリン依存性糖尿病の病態モデルマウスを作製できたと判断した。

ドナー細胞として用いる ASCs としては、GFP トランスジェニックマウスの鼠径部脂肪組織を採取し、脂肪細胞を除去して得られた細胞を使用した。細胞移植後に ASCs が長期間膵臓に生着し、病態を改善させる細胞へと分化するためには、生体内のインスリン産生細胞本来の機能を ASCs に獲得させるような分化誘導条件を探索する必要があるがあった。近年、インスリン産生細胞への分化実験においては、*in vitro* で終末分化させずに *in vivo* のシグナルを利用する分化誘導方法が注目されつつある。そこで私は、ASCs の分化誘導を行う上で、全工程を *in vitro* での培養条件だけで行うのではなく、*in vivo* で生体内本来のインスリン産生細胞への分化シグナルを作用させる工程も含めて終末分化させる手法を試みた。つまり *in vitro* では終末分化させずに、インスリン産生細胞の分化系譜への方向付けのみを行い、その後、細胞の機能を決定づける終末分化を促進するために生体内へ移植し、膵臓組織内のインスリン産生細胞への分化シグナルを利用するという方針を立てた。

in vitro でインスリン産生細胞へ方向付けされた ASCs を作製するために、転写因子である Pancreas duodenum homeobox 1 (以下 Pdx1 と略す)を用いることとし、レトロウイルスを用いて ASCs へ導入した。Pdx1 は、膵臓発生及びインスリン産生細胞への分化において中心的な役割を担っていることが知られている。一般に細胞の分化においては、分化状態特異的な遺伝子発現を直接制御する転写因子群により、強力に分化が進行していくことから、Pdx1 はインスリン産生細胞への分化誘導に有用であると考えられた。Pdx1 を導入した ASCs (以下 Pdx1-ASCs と記す) では、Pdx1 の RNA 及びタンパク質の発現が認められた。しかし、インスリン産生細胞のマーカであるインスリン 1 及びインスリン 2 の発現は、Pdx1-ASCs においては認められなかった。以上の結果から、Pdx1-ASCs はインスリン産生細胞の分化系譜への方向付けのみがなされている可能性が示唆された。

Pdx1-ASCs の *in vivo* での終末分化を目指し、かつその治療効果を検討するために、Pdx1-ASCs をドナー細胞として、尾静脈からの注入によってインスリン依存性糖尿病モデルマウスへと移植した。対照群及び ASCs 移植群と比較して、Pdx1-ASCs 移植群では細胞移植 14 日後に飽食時血糖値が減少し始め、その後有意に減少した ($P<0.05$)。また Pdx1-ASCs 移植群では空腹時血糖値も細胞移植 10 日後に減少し始め、その後有意に減少した ($P<0.05$)。さらに各移植群において細胞移植 30 日後の血清インスリン濃度の測定と耐糖能試験を行い、その病態を解析した。血清インスリン濃度を ELISA 法により測定したところ、対照群及び ASCs 移植群と比較して、Pdx1-ASCs 移植群では血清インスリン濃度が優位に上昇した ($P<0.05$)。また腹腔内にブドウ糖液を注入し耐糖能試験を行った結果、対照群及び ASCs 移植群と比較して、Pdx1-ASCs 移植群では有意に耐糖能が上昇した ($P<0.05$)。以上の結果より Pdx1-ASCs 移植群において、血糖値の減少、血清インスリン濃度及び耐糖能の上昇が認められインスリン依存性糖尿病の病態の改善が認められた。次にこの病態改善に移植細胞がどのように寄与しているのか検討するために、細胞移植 30 日後の膵臓、肝臓、肺、脂肪、骨格筋、心筋、腎臓を各移植群より採取し、凍結組織切片を作製し、各切片に対して抗 GFP 抗体による免疫染色を行った。その結果、Pdx1-ASCs 移植群で、膵臓以外の各臓器には GFP 陽性細胞 (移植された細胞) の存在を確認できなかったものの、GFP 陽性細胞は膵臓でその存在を確認できた。そこで組織学

的により詳細な解析を行った。生体内ではグルカゴン産生細胞とインスリン産生細胞はともに隣接して島構造を形成している。従って、膵組織切片に対して抗 GFP 抗体及び抗グルカゴン抗体による免疫染色を行い、GFP 陽性細胞（移植された細胞）及びグルカゴン陽性細胞の位置関係を解析した。その結果、大多数の GFP 陽性細胞（移植された細胞）はグルカゴン陽性細胞の近傍に位置していることが明らかになった。以上より、移植細胞はインスリン依存性糖尿病モデルマウスの本来インスリン産生細胞が位置していた近傍に生着した可能性が示唆された。次に膵組織切片に対して抗インスリン抗体による免疫染色を行った。その結果、Pdx1-ASCs 移植群では、GFP 陽性細胞（移植された細胞）においてインスリンの陽性所見が認められた。以上の結果から、Pdx1-ASCs が病態モデルマウスの膵臓に生着し、インスリンを産生したことにより、インスリン依存性糖尿病の病態改善が認められた。

インスリン依存性糖尿病モデルマウスの血糖値の減少、血清インスリン濃度及び耐糖能の上昇、並びに移植細胞の膵臓への生着が認められた本研究は、ASCs において *in vitro* で Pdx1 の発現を上昇させればインスリン依存性糖尿病に対する細胞移植治療のドナー細胞として ASCs が有用であることを示している。