

氏 名 (本籍)	菊 ^{きく} 川 ^{かわ} 利 ^り 奈 ^な
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2 6 2 5 号
学位授与年月日	平 成 21 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Differentiation of COPAS sorted Non- endocrine Pancreatic Cells into Insulin- positive Cells (COPAS により分離された非内分泌細胞か らのインスリン産生細胞誘導)

(主 査)

論文審査委員	教授 海 野 倫 明	教授 岡 芳 知
	教授 中 山 啓 子	

論文内容要旨

背景と目的

糖尿病はいまだ完全な治癒の困難な慢性疾患だが、2025年には世界で3億人に罹患数が増加すると予想されている。新しい治療法として膵臓移植や膵島細胞の移植が行われているが、ドナー臓器の不足により十分に機能していない。膵臓の成体幹細胞を同定し、体外で増殖・分化させることができれば、臨床的意義が大きい。膵管上皮細胞は幹細胞を含んでいるとされてきたが、膵管上皮由来幹細胞からの膵島細胞の分化誘導研究では、適切な膵管上皮細胞の表面抗原がないことより完全な分離が難しく、膵管上皮細胞の分離段階での膵ベータ細胞の混入の問題が常に残り、膵臓の幹細胞の由来についてはっきりとした結論が出なかった。私達は、膵管上皮細胞の分離において COPAS を用いて機械的に膵ベータ細胞を完全に取り除き、大量の膵管上皮細胞の分離を行い、膵管上皮由来幹細胞よりインスリン産生細胞が誘導されるかどうかを検討した。

方法と結果

COPAS は従来のセルソータと比較してはるかに大きい 500 μm までの大きさの細胞あるいは細胞塊を分離することが可能であり、これを用いて膵管上皮細胞を細胞塊として分離し、ひとつでも膵ベータ細胞を含む細胞塊を排除することによって、単細胞として分離された場合には細胞障害により培養の継続が難しかった膵管上皮細胞を多量に分離し培養することに成功した。膵管上皮細胞はインスリンプロモーターに GFP 蛋白をつけたトランスジェニックマウス (MIP-GFP) より分離され、COPAS で分析された。COPAS により分離された細胞は、従来のフローサイトメーターにて評価され、GFP 陽性細胞の混入は全く認められなかった。分離された細胞は、コラーゲンコートを用いた三次元培養にて維持され、約1週間後よりインスリンを産生し、3-4週間 *in vitro* で維持可能であった。インスリン産生細胞は塊状あるいは個々に培養皿に存在し、そのひとつひとつの細胞の遺伝子発現を調べたところ、インスリン遺伝子の誘導が確認できた。また、ほとんどのインスリン陽性細胞が膵管細胞のマーカーである CK19 陽性であり、またいくつかの細胞は PDX-1 などの膵島細胞の分化にかかわる転写因子を発現していた。生体の膵ベータ細胞中のインスリン mRNA 量と比較すると、培養により分化誘導できたインスリン産生細胞のインスリンの mRNA 量は生体のベータ細胞の 2% ほどであり (ただし培養皿全体より RNA を抽出して膵ベータ細胞と比較)、*in vitro* での成長因子などの使用や、*in vivo* の環境に移すことでインスリン発現量を増加させることは困難であった。

結語と考察

膵管上皮細胞を純粋・大量に培養することによってその中に含まれる幹細胞からインスリン産生細胞を分化誘導することができることが明らかとなった。考察としては、膵腺房細胞が培養中に形質転換して膵管上皮細胞のマーカーを獲得するという報告があり、私が分離した細胞はアミラーゼ染色陰性で膵管上皮細胞のマーカーが陽性であったが、それでもなお分化した細胞すべてが膵管上皮細胞由来であると断言できない点がある。この点をはっきりさせるには、私達の実験系でのリネッジトレースをする必要があり今後さらに明らかにしていきたい点である。

審査結果の要旨

糖尿病の根治治療として膵β細胞を幹細胞より作製して移植する研究が行われているが、胚性幹細胞は腫瘍形成や染色体異常を防ぐなどの技術的ハードルに加えて社会的問題があり利用が難しいため、成体組織幹細胞が注目されている。膵臓における幹細胞の存在は長らく示唆されているが、幹細胞を同定し体外で増殖させ分化を試みたこれまでの研究ではFACSなどの正確な細胞分離の方法を用いていないものがほとんどであり、細胞を分離した時点での生体のβ細胞の混入が大きな問題であった。本研究は、COPAS (Complex Object Parametric Analysis and Sorting) というソーターを用いて大量に純粋な膵管上皮細胞を分離し、増殖させ分化させるのに成功したという点で意義が大きく、さらに機能の優れたインスリン産生細胞を作製できれば移植により糖尿病患者の治療に用いることができるという点で、今後の発展が期待されるものである。

本研究ではCOPASでの分離が正確に行われたかを、従来のフローサイトメーターおよび定量的PCRにて厳密に検討しており、インスリン産生細胞の混入はフローサイトメーターで全く認めず、RNAレベルでも検出されなかった。MIP-GFPトランスジェニックマウスを細胞分離に用いたことは、COPASを用いた分離を可能にただでなく、体外での膵管上皮細胞よりインスリン産生細胞の分化を可視化したという点で独創的であり、染色やRNA・蛋白レベルの解析を行わなくても培養の条件の仔細な変化による幹細胞の可塑性を評価するのに有用であった。COPASにより分離された細胞を体外で増殖させたあと、マトリゲルを用いた3次元培養下で増殖因子などを用いて分化を促進したところ、一週間後よりインスリン産生細胞が認められ、3-4週間ほど維持可能であった。新しく作製されたインスリン産生細胞は、RNA・蛋白レベルでもインスリン産生が確認された。さらに、これらの分化した細胞ひとつひとつの遺伝子発現パターンを解析したところ、インスリンのみでなく膵管上皮細胞のマーカーであるCK19が大多数で保持されており、これらの結果により、膵細胞の10%を占める膵管上皮細胞よりインスリン産生細胞が産生されたことが示唆され、膵臓の再生研究における新たな一歩といえ、将来的な臨床応用に一歩近づいたと考えられる。

以上のように、本論文は新規知見に富んでおり、論理的な論文展開も見られ、東北大学医学博士の学位論文として合格と認める。