

Title	β -cell neogenesis induced by adenovirus-mediated gene delivery of transcription factor pdx-1 into mouse pancreas
Author(s)	谷口, 秀典
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43940
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	谷口 秀典
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 17328 号
学位授与年月日	平成 14 年 10 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	β -cell neogenesis induced by adenovirus-mediated gene delivery of transcription factor pdx-1 into mouse pancreas (アデノウイルスベクターを用いたマウス膵への pdx-1 遺伝子導入による膵 β 細胞の新生)
論文審査委員	(主査) 教授 宮崎 純一 (副査) 教授 松澤 佑次 教授 金田 安史

論文内容の要旨

【目的】近年、マウスやヒトの膵管上皮由来の細胞を *in vitro* でインスリン分泌細胞へ分化させた報告や、マウスの肝臓へ pdx-1 遺伝子を導入することでインスリン産生細胞の出現を認めた報告などから、生体内における内分泌前駆細胞の存在が注目されている。再生医療の観点から、内分泌前駆細胞へ分化関連転写因子遺伝子を導入し分化を誘導することで内分泌細胞を再生することは、糖尿病の新たな治療法として期待できる。今回、我々はアデノウイルスベクター (AdV) によるマウスの膵への遺伝子導入法を開発すると共に、膵内分泌細胞の分化関連転写因子である pdx-1 及び neurogenin3 遺伝子を導入し、膵内分泌細胞の再生に及ぼす効果を検討した。

【方法】AdV の作成にあたり、今回我々は当研究室において開発した「Cre-loxP 組み換え系を利用した AdV 作成法」を用いた。この方法は、従来の方法の様な相同組み換えの過程を経ないため野生型のアデノウイルスの混入が理論上なく、また短期間に大量の AdV を作成できるため、生体への投与に適していると考えられる。このベクターの発現カセットには、哺乳類の細胞で強い発現活性を持つ CAG あるいは AG プロモーター下に、膵内分泌細胞分化関連転写因子である pdx-1、neurogenin3 を組み込み、更にその下流に IRES、EGFP を組み込むことで、目的の転写因子遺伝子の発現と共に GFP が発現し、遺伝子導入された細胞が緑色蛍光により判別可能となるよう工夫した。作成した AdV のマウス生体への投与にあたり、我々は、総胆管・十二指腸合流部位から逆行性に注入する方法、すなわち経総胆管的投与方法を用いた。マウス生体への遺伝子導入にはこれまで静脈内投与が主な経路であるが、肝以外の臓器特異性が乏しく、膵への導入効率は非常に低いことが知られている。一方、経総胆管的投与方法はマウスの膵へほぼ選択的に投与できると同時に、ヒトでは内視鏡的逆行性膵・胆管造影 (ERCP) などの非観血的で安全性の高い技術がすでに確立されており、臨床応用も期待できる方法であると考えられる。AdV 投与後、7-12 日で各種検討を行った。

【成績】AdV の経総胆管的投与により、マウス膵に広範な導入遺伝子の発現が認められた。また、pdx-1 遺伝子の導入では、膵実質内に多数の膵管の増殖像と共に、新生インスリン陽性細胞の出現を認めた。更に、定量的 RT-PCR による解析から、そうした組織学的変化は、内因性の pdx-1 や CK19 遺伝子の活性化との関連が示唆された。

【総括】今回、我々はマウス総胆管から AdV を注入することで、これまで困難とされてきた膵への遺伝子導入に成功した。また、pdx-1 遺伝子の導入では膵実質内に膵管の増生像とインスリン産生細胞の新生像を認めた。生体膵組

織における転写因子遺伝子導入による分化誘導の試みはこれまで初めてであり、遺伝子導入による糖尿病の治療にむけた大きな可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

近年、マウスやヒトの膵管上皮由来の細胞を *in vitro* でインスリン分泌細胞へ分化させた報告や、マウスの肝臓へ **pdx-1** 遺伝子を導入することでインスリン産生細胞の出現を認めた報告などから、生体内における内分泌前駆細胞の存在が注目されている。再生医療の観点から、内分泌前駆細胞へ分化関連転写因子遺伝子を導入し分化を誘導することで内分泌細胞を再生することは、糖尿病の新たな治療法として期待できる。本研究はアデノウイルスベクター (AdV) によるマウスの膵への遺伝子導入法を開発すると共に、膵内分泌細胞の分化関連転写因子である **pdx-1** 及び **neurogenin3** 遺伝子を導入し、膵内分泌細胞の再生に及ぼす効果を検討したものである。AdV の発現カセットには、哺乳類の細胞で強い発現活性を持つ CAG あるいは AG プロモーター下に、膵内分泌細胞分化関連転写因子である **pdx-1**、**neurogenin3** を組み込み、更にその下流に IRES、EGFP を組み込むことで、目的の転写因子遺伝子の発現と共に GFP が発現し、遺伝子導入された細胞が緑色蛍光により判別可能となるよう工夫している。作成した AdV のマウス生体への投与方法として、総胆管・十二指腸合流部位から逆行性に注入する方法、すなわち経総胆管的投与を開発した。マウス生体への遺伝子導入にはこれまで静脈内投与が主な経路であるが、肝以外の臓器特異性が乏しく、膵への導入効率は非常に低いことが知られている。一方、経総胆管的投与方法はマウスの膵へほぼ選択的に投与できると同時に、ヒトでは内視鏡的逆行性膵・胆管造影 (ERCP) などの非観血的で安全性の高い技術がすでに確立されており、臨床応用も期待できる方法であると考えられる。AdV 投与後、マウス膵に広範な導入遺伝子の発現が認められた。また、**pdx-1** 遺伝子の導入では、膵実質内に多数の膵管の増殖像と共に、新生インスリン陽性細胞の出現を認めた。更に、定量的 RT-PCR による解析から、そうした組織学的変化は、内因性の **pdx-1** や **CK19** 遺伝子の活性化との関連が示唆された。本研究は、生体膵組織における転写因子遺伝子導入による分化誘導の試みであり、遺伝子導入による糖尿病の治療にむけた大きな可能性を示唆しており、学位に値するものと認める。