

Title	Tetracycline-regulated expression of pdx-1 in embryonic stem cells and mice : Promotion of in vitro differentiation of insulin-producing cells
Author(s)	宮崎, 早月
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46200
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	宮崎卓月
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第20165号
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Tetracycline-regulated expression of pdx-1 in embryonic stem cells and mice —Promotion of in vitro differentiation of insulin-producing cells— (ES細胞とマウスにおけるテトラサイクリンによる pdx-1 の発現制御—インスリン産生細胞の in vitro 分化の促進—)
論文審査委員	(主査) 教授 宮崎 純一 (副査) 教授 仲野 徹 教授 金田 安史

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

糖尿病においては、膵臓や膵島細胞の移植が抜本的な治療法とされているが、多数の患者の治療に必要な数のヒト膵島を得ることは困難である。そこで、ES細胞や組織幹細胞を用いた膵β細胞の再生医療に大きな期待が集まっている。中でもES細胞は、in vitro で膵β細胞へ分化させることができれば、移植用細胞の無限の供給源として利用できる。近年、ES細胞のインスリン産生細胞への分化誘導に関していくつかの報告がなされたが、インスリン産生細胞への分化効率も低く、産生されるインスリン量も十分ではなかった。本研究では、膵発生において重要な転写因子である pdx-1 を発現制御できる系を ES 細胞へ導入し、分化誘導時に pdx-1 を発現させて分化を方向づけることにより、効率的にインスリン産生細胞へと分化させることを目的とした。さらに、pdx-1 発現制御系がノックインされたマウス作製し、その解析を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

マウス ES 細胞の ROSA26 領域のプロモーターの下流に Tet-Off 発現制御カセット (SA-loxP-neor-pA-loxP-tTA-pA-insulator-hCMV*1-intron-pdx-1-IRES-EGFP-pA) をエレクトロポレーション法で組み込んだ。Long PCR 法で確認したところ、43 クローン中 2 個のノックインクローンが得られた (RTFN-pdx-1 ES 細胞)。Tetracycline の誘導体である doxycycline (Dox) 存在下で、その ES 細胞に pCAG-cre-IRES-puro プラスミドを導入し cre 遺伝子を一過性に発現させると、loxP に挟まれたネオマイシン耐性遺伝子が切り出された。Dox 非存在下では tTA が作用し、その下流の hCMV*1 プロモーターを活性化させることで pdx-1 および EGFP が発現するようになった。Pdx-1 抗体を用いたウェスタンブロットティングや免疫染色の結果、pdx-1 の発現が厳密に制御されることが確認できた。

分化誘導実験は Moritoh ら (DIABETES, 2003) の方法に従い、5 段階の異なる培養段階を経てインスリン産生細胞へ分化誘導させる方法を用いた。本研究では、同一の ES クローンにおける pdx-1 の発現の有無の効果を解析でき

る点で他の報告と大きく異なる。そこで、異なる培養段階で時期特異的に外因性 pdx-1 を発現させて分化誘導し、RT-PCR を行った。胚様体形成時から外因性 pdx-1 を発現させて分化誘導した場合、インスリン2の他、膵臓特異的遺伝子であるソマトスタチンやグルコキナーゼなどの mRNA の発現も確認された。それに対し、無血清培養時から外因性 pdx-1 を発現させて分化誘導した場合、インスリン2の発現量は低く、ソマトスタチンや Kir6.2 以外の膵特異的遺伝子の発現はほとんどなかった。さらに、外因性 pdx-1 を発現させずに分化誘導した場合は、インスリン2やソマトスタチンが低く発現するのみであった。胚様体形成時から外因性 pdx-1 を発現させて分化誘導させた条件では、さらに継代が可能であり、継代回数が5回目の分化誘導細胞では、インスリン2の発現が増強した。一方、インスリン1や Glut2、内在性 pdx-1 の遺伝子発現はどの段階においても見られなかった。

さらに TUNEL 染色を行い、コロニーを形成している細胞のほとんどはアポトーシスを起こしていないことを示した。また、インスリンの新規合成の副産物である C-peptide に対する抗体を用いた免疫染色の結果、多くの細胞においてインスリンが発現していることも示された。効率的にインスリン産生細胞を作製することには成功したが、グルコース応答性のインスリン分泌は不十分で、培養液中に分泌されるインスリン量も膵β細胞と比べるとかなり少量であった。さらに STZ 処理糖尿病マウスへの移植実験においても糖尿病が是正されることはなかった。

次に RTFN-pdx-1 ES 細胞からキメラマウスを得、CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配し外因性 pdx-1 を全身で発現制御できるマウスを作製した。このマウスでは、飲用水から Dox を除去すると約3週間後すべての主要臓器において外因性 pdx-1 が均一に発現し、かつ厳密に発現制御されることが RT-PCR 解析などの結果、確認された。

[総 括]

外因性 pdx-1 を発現させて分化誘導することで、インスリン産生細胞への分化誘導が促進されることが示された。得られたインスリン産生細胞は、C-peptide 抗体で染色されたことから、培養液中のインスリンを取り込んだものではなかったが、インスリン分泌量は膵β細胞と比べるとかなり少量であった。

外因性 pdx-1 を発現制御できるマウスは、さまざまな臓器における pdx-1 の効果の解析に利用できる他、Dox は胎盤を透過し授乳中のマウスのミルクからも供給可能であることから、胎生期や授乳中におけるマウスの解析にも利用可能である。

論文審査の結果の要旨

糖尿病の再生医療の一つとして ES 細胞からの効率良いインスリン産生細胞の分化誘導系の構築が注目されている。In vitro 分化系では内胚葉系の細胞が得られにくいことから、膵臓の発生分化に必要な不可欠な転写因子である pdx-1 を発現制御できる系を ES 細胞に組み込み、5段階の異なる培養条件を経てインスリン産生細胞を分化誘導させた。時期特異的に pdx-1 を誘導発現させて分化誘導した結果、pdx-1 誘導発現細胞においてインスリンの mRNA の増加、インスリン陽性細胞数の増加や膵関連遺伝子の発現が確認され、インスリン産生細胞への分化誘導が促進されることが示された。

一方、マウスにおいても同様の系を用いて pdx-1 発現制御マウスを作製し、その解析を行った。このマウスでも、主要臓器すべてにおいて pdx-1 が厳密に発現制御されることが示された。

本研究は、pdx-1 誘導発現系を用いた in vitro におけるインスリン産生細胞の分化再生研究に貢献し、また作製された pdx-1 発現制御マウスは in vivo における膵β細胞の再生研究において重要なツールになると考えられたため、学位論文に値する。