



Title	Regenerative and Therapeutic Effects of Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor on Diabetes by Gene Transduction Through Retrograde Pancreatic Duct Injection of Adenovirus Vector
Author(s)	小澤, 純二
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47431
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 小 澤 純 二

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20623 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 7 月 20 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 Regenerative and Therapeutic Effects of Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor on Diabetes by Gene Transduction Through Retrograde Pancreatic Duct Injection of Adenovirus Vector (HB-EGF 発現アデノウイルスの逆行性膵管注入法による糖尿病に対する再生治療効果)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 下村伊一郎

(副査)
教 授 宮崎 純一 教 授 荻原 俊男

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

成体膵における β 細胞の再生には、既存 β 細胞の増殖の他、膵導管細胞上に存在すると考えられる組織幹細胞ないし内分泌前駆細胞からの β 細胞への分化・新生が存在することが報告されており、膵 β 細胞の再生を利用し内因性インスリン分泌能を回復させることで、再生医療の一手段としての新たな治療法への展開が期待される。Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) は胎生期の膵臓に強く発現しており膵の発生・分化に強く関わっていると考えられる。本研究では、膵導管細胞に HB-EGF 遺伝子導入を行い、膵 β 細胞の分化・新生誘導ならびに増殖促進作用について検討した。

〔 方 法 〕

6 週齢雄 ICR マウスに対し、HB-EGF 発現アデノウイルスを逆行性に総胆管より膵管特異的に注入し、1、2、8 週後膵組織を摘出、各種免疫染色および形態計測を行った。耐糖能に与える影響を検討するために Alloxan 膵部分灌流糖尿病モデルマウスを作成、HB-EGF 発現アデノウイルスを投与、12 週間後に経腹腔内糖負荷試験 (IPGTT) を施行した。マウス成体膵より導管細胞を分離培養し HB-EGF 発現アデノウイルスを用い遺伝子導入を行い免疫染色による組織学的検討の他、RT-PCR 法を用いて膵内分泌ホルモン、膵 β 細胞の発生・分化に関わる転写因子の遺伝子発現について検討を行った。なおコントロールとして、 β ガラクトシダーゼ発現アデノウイルスを用いた。

〔 成 績 〕

アデノウイルス注入後の膵導管細胞にコントロール群では β ガラクトシダーゼの発現を、実験群では HB-EGF の発現を認め、アデノウイルスベクターの逆行性膵管注入法により膵導管細胞への遺伝子導入が可能であることが示された。注入後 1 週において導管細胞配列内にインスリン陽性細胞の出現を認め、注入後 2 および 8 週では、導管細胞配列内のインスリン陽性細胞の他、導管上あるいは導管に密接してインスリン陽性細胞を含む islet-like cell cluster (ICC) が観察され、膵導管細胞から分化・新生したと考えられるインスリン陽性細胞数はコントロール群に比し有意に増加していた (1 週 ; $P < 0.05$ 、2 および 8 週 ; $P < 0.01$)。注入後 1 週において、導管細胞、既存 β 細胞の BrdU

labeling index の有意な増加を認め、HB-EGF による両細胞系に対する増殖促進効果が認められた（導管細胞； $P<0.05$ 、 β 細胞； $P<0.01$ ）。さらに実験群において注入後 8 週における β -cell mass（ β 細胞重量）の有意な増加を認め（ $P<0.05$ ）、Alloxan 膵部分灌流糖尿病モデルマウスに対する IPGTT においては負荷後 120 分の血糖値がコントロール群に比し有意に低下（ $P<0.05$ ）、負荷後 60、120 分の血中インスリン濃度が有意に上昇しており（ $P<0.05$ ）、耐糖能改善効果が認められた。培養膵導管細胞においては、HB-EGF 遺伝子導入後 3 日にて免疫染色により C-peptide の発現を一部の細胞に認め、RT-PCR 法によりインスリン 1、2 の遺伝子発現の他、膵の発生・分化に重要とされる転写因子 Pdx-1（Pancreatic and duodenal homeobox gene-1）の発現増強、NeuroD、Nkx2.2、Nkx6.1 の発現を認め、培養膵導管細胞においても HB-EGF 遺伝子導入によりインスリン陽性細胞への分化誘導が確認された。

〔 総括 〕

逆行性膵管注入法を用いた膵導管細胞への HB-EGF 遺伝子導入により、膵導管細胞からインスリン陽性細胞への分化・新生誘導ならびに既存 β 細胞の増殖が促進され、 β -cell mass の増加、糖尿病モデルマウスでの耐糖能改善効果が認められ、in vivo β 細胞再生誘導ないし促進療法の可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

再生医療の観点から、既存の膵 β 細胞の増殖のみならず膵内分泌前駆細胞から β 細胞へ分化誘導させインスリン分泌能を回復することは糖尿病の新たな治療法につながると考えられる。近年成体膵 β 細胞の分化・新生においては既存の β 細胞だけでなく導管細胞配列上に存在する幹細胞が細胞源として重要と考えられてきている。HB-EGF は膵内分泌細胞の発生・分化に関与すると考えられ、本研究では ICR マウスに対し HB-EGF 発現アデノウイルスベクターを膵管より逆行性に注入、膵導管細胞に遺伝子導入をすることで膵島、導管、外分泌細胞の増殖促進に加え導管細胞配列から分化したと考えられるインスリン陽性細胞数の増加、膵 β 細胞重量の増加を認めた。糖尿病モデルマウスに同ベクターを投与し耐糖能の改善効果を認めた。培養膵導管細胞においては同遺伝子導入の結果、インスリン遺伝子の発現、 β 細胞の発生・分化に関わるとされる各種転写因子の遺伝子発現を認めた。成体膵への遺伝子導入による膵 β 細胞の分化・新生誘導療法は糖尿病における新たな治療法の可能性を示しており学位に値すると考えられる。