

## 学位論文題名

Transduction of exogenous constitutively activated Stat3 into dispersed islets induces proliferation of rat pancreatic  $\beta$ -cells(ラウ島細胞への活性化型 Stat3 導入による膵  $\beta$  細胞増殖活性誘導)

## 学位論文内容の要旨

【背景・目的】本研究では、糖尿病細胞移植療法に向けた有効な膵ラウ島細胞増殖法の確立を目的に、膵ラウ島分散遺伝子導入法を用いた活性化型 Stat3-C 遺伝子導入によるインスリン分泌機能を維持した膵 $\beta$ 細胞増殖法の研究を行った。膵ラウ島移植は低浸襲であり、移植の反復が可能といった利点を持ち、2000年のShapiroらによるエドモントンプロトコルの発表により、1型糖尿病患者に対する有効な治療法として脚光をあびた。しかしながら、課題として、膵ラウ島移植患者がインスリン離脱を得るためには、最低限9000IEq/kgと大量の膵ラウ島が必要とされる点と、膵ラウ島移植後のインスリン離脱率の経時的低下がある。5年間の多施設臨床試験の報告では、1年80%、2年60%、5年25%とインスリン離脱率が年々低下してくることが明らかとなっている。従って、膵ラウ島移植には、反復した治療が不可避であり、膵ラウ島移植の普及には必要時に十分量の移植細胞源をいかに確保することができるかが重要な課題である。これまで、*in vitro*におけるヒト膵 $\beta$ 細胞の株化、増殖因子やペプチドの添加、extracellular matrixと増殖因子の併用法などの膵 $\beta$ 細胞増殖法の確立に向けた多くの研究がなされてきたが、膵ラウ島 $\beta$ 細胞移植治療に用いることが可能な膵 $\beta$ 細胞増殖法の確立には至っていない。そこでわれわれは、細胞増殖に関与しているJAK/STAT経路の一つであるStat3に着目し、活性化型Stat3をコードする遺伝子Stat3-Cを膵 $\beta$ 細胞に導入し、膵 $\beta$ 細胞の増殖活性を図ることを目的として本研究を行った。Stat3は細胞内転写因子として、*pim-1*, *cyclin D*, *myc*, *fos*などの細胞周期制御に関する遺伝子や*Bcl-2*, *Bcl-X*などの抗アポトーシス遺伝子などを活性化し、細胞分裂、細胞生存および細胞分化の制御に重要な役割を果していることが報告されている。一方、膵 $\beta$ 細胞への遺伝子導入法のこれまでの研究では、遺伝子は主に膵ラウ島の辺縁構成細胞に導入されるのみで、その導入効率は20%未満と低率であった。本研究では、遺伝子導入前に分離された膵ラウ島をさらに個々の膵ラウ島細胞に単離してから遺伝子導入を行い、その後膵ラウ島細胞の再凝集機能を応用して再組織化膵ラウ島の形成を行い、膵 $\beta$ 細胞の増殖とその機能発現を検討した。また、各種の増殖因子が膵 $\beta$ 細胞増殖を促進するとの報告があるため、増殖因子がStat3-C遺伝子導入膵 $\beta$ 細胞の増殖活性に相乗的効果を発現するかどうか併せて検討を行った。【方法】実験には9~11週齢の雄性Wistar ratを用いた。膵ラウ島分離には、コラゲナーゼ消化法およびFicoll-Conray比重遠心法を用いた。膵ラウ島細胞分散は、EGTAおよびディスパーゼ消化により行った。遺伝子導入には、活性化型Stat3 mutant (FLAG-tagged Stat3-C)を組込みこんだアデノウイルスベクター(AxCAS3-C)を用いた。AxCAS3-C導入後の膵ラウ島細胞は、浮遊培養下にて位相差顕微鏡により再凝集塊の形成過程を確認した。AxCAS3-C導入および発現評価は、FLAG蛋白をWestern blot法および免疫染色法にて評価した。AxCAS3-C導入による膵 $\beta$ 細胞増殖

効果は、抗インスリン抗体と抗 BrdU 抗体2重染色法を用いて BrdU-labeling 法により評価した。さらに、増殖因子の併用効果は、epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor-basic (bFGF) および hepatocyte growth factor (HGF)を検討した。再凝集ラ島の機能評価は、グルコース応答性インスリン分泌能で評価した。【結 果】 膵ラ島細胞は、分散後およそ16時間より2から3個の細胞を含んだ小細胞凝集体を形成し、培養1日目から3日目にかけてより大きな凝集塊となった。その後、細胞凝集塊は球状形態をとり、5日目まで径の変化なく浮遊もしくはルーズな接着状態で維持され、単離された膵ラ島細胞は培養することで経時的に再凝集塊を形成することが明らかであった。膵 $\beta$ 細胞内の FLAG 蛋白の発現は、AxCAS3-C 導入3日目において80-90%であり、高率の遺伝子導入を認めた。AxCAS3-C 導入群における膵 $\beta$ 細胞の BrdU 陽性率は、非導入群に比べ培養3、5日目において、各々2.3倍、2.8倍と有意に増加した。さらに、増殖因子の添加では、HGF 群および EGF、bFGF、HGF の3種併用群において、培養3、5日目の膵 $\beta$ 細胞 BrdU 陽性率が各々3.5倍、3.9倍と有意に増加し、併用による相乗効果を認めた。再凝集膵ラ島細胞のグルコース応答性インスリン分泌能は、培養3日目において膵ラ島と比べて応答能の低下を認めたが、培養5日目においては、膵ラ島および非導入コントロール群と同様に low glucose および high glucose に対して良好なインスリン分泌能を示し同等の機能発現を認めた。【考 察】 今回採用した膵ラ島細胞単離直後に遺伝子導入を行い、膵ラ島細胞の再凝集をさせるという遺伝子導入法はわれわれが開発した新規遺伝子導入法である。この方法では、1MOI という低力価のアデノウイルスベクターで80%以上の膵ラ島細胞に効率よく遺伝子が導入されており、膵ラ島細胞への有効な遺伝子導入法であると考えられた。低力価のアデノウイルス力価で導入可能であるということは、ウイルスベクターによる細胞障害のリスクが極めて軽微であることを意味しており、このことは膵ラ島細胞の再凝集能が阻害されず、5日間の培養においてフラグメンテーションが認めなかったことや膵ラ島細胞再凝集塊の機能発現が維持されたことより明らかである。本法は、膵ラ島細胞への遺伝子導入法として優れた方法であると考えられる。しかし、グルコース応答性インスリン分泌能からみると、培養初期の段階では低いものの回復に5日間を要し、機能発現には5日目の培養が必要と考えられた。一方、増殖活性からみると、AxCAS3-C 導入群において膵 $\beta$ 細胞の BrdU up-take がおよそ3倍となり、AxCAS3-C 導入が膵 $\beta$ 細胞増殖に有効であることが確認され、膵 $\beta$ 細胞において Stat3 の活性化を介した細胞増殖機構の存在が示唆された。また、今回検討した3種の増殖因子の中でも HGF を含むものが AxCAS3-C 導入膵 $\beta$ 細胞増殖において有効であったことから、Stat3 の活性化による増殖促進経路と HGF を介した PI-3/AKT 活性化に伴う増殖促進経路の相乗効果が寄与したものと考えられる。【結 語】 新規膵ラ島分散遺伝子導入法により導入された Stat3-C 遺伝子は、膵 $\beta$ 細胞の機能を維持しつつ増殖活性を有意に上昇させ、膵 $\beta$ 細胞の増殖法として有用であることが示唆され、HGF の併用は Stat3 の増殖効果をさらに促進させることが明らかとなった。Stat3-C 遺伝子を用いた膵ラ島分散遺伝子導入と HGF の併用は、糖尿病の細胞移植療法に向けた膵ラ島細胞増殖法として期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 清 水 宏  
副 査 教 授 藤 堂 省

## 学位論文題名

### Transduction of exogenous constitutively activated Stat3 into dispersed islets induces proliferation of rat pancreatic $\beta$ -cells

(ラ島細胞への活性化型 Stat3 導入による膵  $\beta$  細胞増殖活性誘導)

申請者は、糖尿病細胞移植療法に向けた有効な膵ラ島細胞増殖法の確立を目的に、膵ラ島分散遺伝子導入法を用いた活性化型 Stat3 (Stat3-C) 遺伝子導入によるインスリン分泌機能を維持した膵 $\beta$  細胞増殖法の研究を行った。さらに、各種の増殖因子添加による、Stat3-C 遺伝子導入膵 $\beta$ 細胞の増殖能相乗的効果についても併せて検討を行った。Stat3-C を組み込んだアデノウイルスベクターは、1MOI という低力価にて膵ラ島細胞に効率よく遺伝子が導入され、かつ浮遊培養下において膵ラ島細胞再凝集塊を形成した。Stat3-C 遺伝子を単離膵ラ島細胞に導入することにより、膵 $\beta$ 細胞機能（グルコース応答性インスリン分泌能）を保持したまま、BrdU 陽性率がおよそ3倍となり、膵 $\beta$ 細胞増殖効果は、HGF 添加によりさらに増強した。本研究において、新規膵ラ島分散遺伝子導入法により導入された Stat3-C 遺伝子は、膵 $\beta$ 細胞の機能を維持しつつ増殖活性を有意に上昇させ、膵 $\beta$ 細胞の増殖法として有用であることが示唆された。

審査にあたって副査の清水教授より①Stat3 の着目に至った経緯、②膵 $\beta$ 細胞特異的な Stat3 遺伝子のコンディショナル・ノックアウトモデルを用いた今後の解析、③アデノウイルスベクターの選択理由、④人への応用に向けた今後の展望についての質問を受けた。これに対し、①膵 $\beta$ 細胞に対して細胞周期を活性化する遺伝子導入の試みが報告されているが、細胞増殖に伴う細胞の脱分化やアポトーシスを誘起するといった課題がある。Stat3 は、ES 細胞や、肝幹細胞とよばれる Oval Cell における増殖と分化など、細胞の分裂および分化の制御に重要な役割を持つという報告を受け、膵 $\beta$ 細胞においても、Stat3 遺伝子導入により、膵 $\beta$ 細胞の分化状態を維持しつつ細胞増殖を促すのではなかろうかという仮説をたてた。②膵 $\beta$ 細胞特異的な Stat3 遺伝子のコンディショナル・ノックアウトモデルの作製は報告されており、膵 $\beta$ 細胞における細胞増殖および発生・分化機構における Stat3 の役割を解析するにあたり非常に有効なツールであると考えている。③遺伝子治療の最大の問題は、

ベクターの標的細胞への遺伝子導入／発現効率の低さと安全性である。本研究における標的細胞が非分裂性の細胞であったことや、外来遺伝子が宿主細胞核に組み込まれず宿主遺伝情報を攪乱しないといった安全面からアデノウイルスベクターを選択した。④本研究において、遺伝子導入ベクターとしてアデノウイルスベクターを用いたが、臨床応用を考えると、ウイルスベクターの安全性の問題点を最小限にするためにも可能な限り少ないベクター量で十分な遺伝子導入効率を得ることが非常に重要な課題であると考えている。しかしながら、遺伝子治療に伴うアデノウイルスベクター全身投与による異常免疫反応による死亡例、レトロウイルスベクターによる T 細胞白血病様症状の発症により、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療が非常に慎重になっていることから、さらに安全性を検討したウイルスベクターの開発や、ナノ粒子を用いた非ウイルスベクターによる遺伝子導入法の開発、さらには、細胞内へのタンパク質導入法の開発が望まれる、などの回答があった。続いて、主査である小池教授より①導入遺伝子に対する発現の制御、②ラットとヒトでの膵臓の形態学的差異に起因する問題点、③1 型糖尿病の要因でもある自己免疫に起因する移植細胞の拒絶の制御に対する現状と今後の展望についての質問があった。これに対して、①ベクターに Cre/LoxP システムを導入することやベクターに自殺遺伝子を組み込むことで導入遺伝子の発現制御は可能と思われる。②膵β細胞における増殖機構は同様と思われ、膵ラ島細胞の単離方法・培養条件を検討することで、同様の遺伝子導入条件および増殖条件を構築可能である。③膵ラ島移植は臓器移植に比べて副作用の少ない免疫抑制剤で拒絶反応が抑えることが可能であり、膵ラ島細胞は培養に伴い免疫原性が低下することが報告されている。自己免疫をターゲットとする実験モデルも今後の重要な検討課題であることを説明した。最後に副査の藤堂教授より、①Stat3 遺伝子導入による増殖活性をより高める方法論、②成熟膵β細胞の増殖、ES 細胞から膵β細胞への分化誘導や不死化β細胞などの方法論があるが、臨床応用に向けてもっとも有望と考えられる移植細胞源についての将来展望についての質問が出された。これに対して①本研究では、静置・浮遊培養の非常に単純な系での評価であったが、増殖因子 (HGF) との併用効果が観察されたことから、生体内への埋め込みによる種々のスキャホールド効果が期待できる可能性がある。In vitro 培養系においても、細胞外基質・フィブリンゲルの併用や、ナノスケールで制御可能な生体適合性高分子を培養基材として用い、膵β細胞増殖における有用性を検討していきたい。②ES 細胞からインスリン産生細胞への分化誘導の報告および不死化β細胞の樹立の報告はあり、ともに重要な研究課題であるが、移植医療に使用可能な膵β細胞の獲得には至っていない。成体および自家膵由来の膵ラ島β細胞における分離・増殖・保存・移植技術の確立が非常に重要である、などの回答があった。

この論文は、活性化型 Stat3 を単離膵ラ島細胞へ導入することで、膵β細胞の機能を維持しつつ増殖活性を有意に上昇させることを示した。今後、糖尿病細胞移植療法に応用可能な移植細胞源の獲得にとって有用な方法論であることが高く評価された。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。