

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590378

研究課題名(和文) 遺伝子治療による膵臓内での膵島再生

研究課題名(英文) Reproduction of pancreatic islet in the pancreas by gene therapy

研究代表者

小島 秀人 (KOJIMA, HIDETO)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00225434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン依存型糖尿病モデルマウスの糖尿病を治癒させることを目的として、ナノダイヤモンドを基材とする遺伝子治療ベクターを作成し、膵管上皮の前駆細胞から膵島の分化誘導を試みた。蛍光色素の発現を検討したところ膵管の位置に一致して色素の発現が観察されたことから、ベクターシステムとして十分稼働していることが明らかになった。今後、膵島再生のためのベクターとしての有用性をさらに検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：For the treatment of a mouse model of insulin-dependent diabetes mellitus, we used nanodiamonds to deliver DNA for gene-therapy aiming the differentiation of the pancreatic islet from progenitor cells localized in the pancreatic duct epithelium. By an application of plasmid DNA coding a fluorescent dye we clearly observed the dye expression at the position of pancreatic duct, indicating that the vector system performed its role for gene delivery to the pancreatic ducts. Next, we need to examine the usefulness of the vector in the pancreatic islet regeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療により膵島を再生させ、インスリン欠乏型糖尿病の治癒させる方法について検討してきた。これまでの研究により、肝臓内にある体性幹細胞(前駆細胞)に対し、膵島の分化誘導に重要な転写因子を強制発現させることにより、in vivo にて膵島の分化誘導にさせること明らかにした (Kojima et al Nat Med 2003, Yechoor et al Dev Cell 2009)。

しかし、より自然なインスリン分泌を実現するためには、膵島を肝臓内で再生させるよりも、本来の臓器位置である膵臓内で再生させることによるメリットが高いと考えられる。例えば、膵島だけでなく導管や膵外分泌を同時に再生させたとしても、肝臓内で外分泌が再生した際に生じるような炎症反応は起こらないと考えられる。また、インスリンは直接肝臓内から分泌されるのではなく、門脈を経由して働くので、腸管からの糖吸収と膵島からのインスリン分泌の間でアンバランスが生じない。

本研究では、肝臓内における膵島再生と同様に、膵島発生の鍵となる転写因子を用いて、膵臓内で膵島を再生させることを目的として、インスリン分泌が枯渇した糖尿病マウスモデルを用いて基礎研究を行った。

2. 研究の目的

糖尿病モデルマウスにおいて本来の臓器位置である膵臓内での膵島再生を計画した。当初は、膵管に存在する膵管細胞へと特異的なウイルスベクターを作成し、遺伝子治療の基礎研究を行う予定であった。しかし、ウイルスベクターに装着するための特異ペプチドが得られなかった。そこで、非ウイルスベクターとして、ナノダイヤモンド(ND)を用いて遺伝子輸送可能なベクターの作成を試みた。膵管内に存在する前駆細胞を標的とする遺伝子治療ベクターを作成し、ベクター内に膵島の分化誘導因子と増殖因子遺伝子を組み込み逆行性に膵管からベクターを投与し、治療することを目的とする。

3. 研究の方法

当初、膵管にあると考えられる膵島前駆細胞内への遺伝子輸送方法として、膵管内の前駆細胞へと目的遺伝子を標的化輸送できる様なヘルパー依存型アデノウイルスの作成を計画した。そのための標的化の方法として、ファージディスプレイを用いた7桁ペプチド配列の採取を試みた。しかし、膵管上皮特異的なペプチド配列の採取が困難であった。本

研究ではこの作成が困難であった場合の対処法としてナノダイヤモンドを用いた非ウイルスベクターの作成も同時に行っていた。そこで、ウイルスベクターから非ウイルスベクターであるナノダイヤモンドベクターに変更した。

ナノダイヤモンドベクターは直径 30~50 nm のダイヤモンド結晶に、ポリグリセロールを化学結合させダイヤモンド自身を水溶性とした。この水溶性ナノダイヤモンドの表面に陽性電荷を持たせ、なおかつ細胞内への輸送を促進させると考えられるオクタアルギニン(R8)を結合させた(ND-R8)。実際にダイヤモンド表面の電位を測定したところ陽性の電荷が得られた。

一方、膵島の分化誘導を行うための発現遺伝子として、目的遺伝子の強発現を実現できるEF1プロモターの後ろにPdx1遺伝子を接着し、プラスミドベクターを作成した。また、実際に目的遺伝子の細胞内での発現の有無を確認するためのベクターとしてEF1プロモターの後ろに黄色蛍光色素(yellow fluorescence protein, YFP)を結合させたプラスミドを作成した。これらのプラスミドをND-R8とともに静電結合させ、遺伝子治療ベクターを完成させた。

また、インスリン分泌が枯渇した糖尿病モデルとして、C57BL/6マウスにストレプトゾトシン(STZ) 150mg/kg を尾静脈より静脈内投与して作成した。

4. 研究成果

(1) 水溶性ナノダイヤモンドベクターの作成

新しい人工ベクターシステム ND-R8 は電位が陽性を示し、陰性荷電を持つ黄色蛍光色素(YFP)を組んだプラスミドと静電結合させ、電気泳動を行ったところ、重量比でND-R8:YFP プラスミド = 3:1 で安定な結合を生じた。

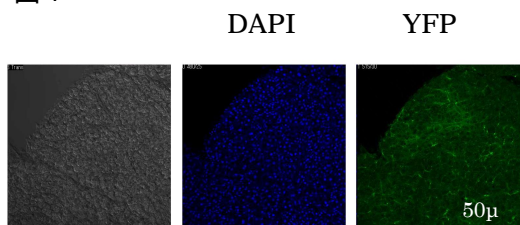
(2) 経膵管的逆行性ベクター投与方法の開発

十二指腸を切開し、ファータ乳頭より膵管へ極細カテーテルを挿入し、膵管内へのミク口注入のアプローチ手術を行った。この操作は、膵管系が大変小さく挿入が大変難しいこと、逆行性であることからマウスが膵炎を起こすことがしばしばあること、膵管壁が脆弱でカテーテル挿入時に破れやすい、などの理由から、熟練した技術を要した。最終的に術後マウスの生存率がほぼ 70%まで到達するまでに 10 ヶ月以上の試行錯誤を必要とした。

(3) 投与遺伝子の発現を確認

強発現プロモータである EF1 プロモータに蛍光色素 YFP 遺伝子を組み込み、発現プラスミドを作成した。これを ND-R8 と静電結合させ、膵管上皮へと遺伝子導入した。その結果、膵管の位置に一致して蛍光の発現が観察された（図 1 参照）。

図 1



図では YFP の発現を緑色に変換させて示している。

(4) Pdx1 遺伝子の導入

次に、実際に強発現プロモータである EF1 プロモータに膵島分化誘導因子である Pdx1 遺伝子を接着させ、プラスミドを作成し、ND-R8 と静電結合させ遺伝子治療ベクターを作成した。STZ 糖尿病マウスにベクターを注入後、3 週目に血糖値、ならびに膵臓における Pdx1 遺伝子とインスリン遺伝子の発現を、遺伝子を組んでいないコントロールベクターと比較観察した（コントロール群 3 例、治療群 3 例）。血糖値は有意に低下し、インスリンの発現が上昇した。しかし、ベクター投与量の量反応関係や投与後の時間経過などの検討がまだ行われておらず、血糖値の正常化、ならびにインスリン分泌能の正常化を得るには至っていない。引き続き検討が必要である。

膵臓内での膵島再生のための人工ベクターとしてナノダイヤモンドベクター開発した。ウイルスベクターに比し安全性が高いと考えられるナノダイヤモンドベクターは遺伝子治療を行う上で有用な治療手段であり、今後、様々な工夫を加えることにより臨床に使用できる手段へと進化させる努力が必要である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kojima H, Kim J, Chan L, Emerging roles of hematopoietic cells in the pathobiology of diabetic complications. Trends Endocrinol Metab, 査読あり, Vol.

25, 2014, 178-187.

Katagi M, Terashima T, Okano J, Nakae Y, Ogawa N, Udagawa J, Maegawa H, Matsumura K, Chan L, Kojima H, Hyperglycemia induces abnormal gene expression in hematopoietic stem cells and their progeny in diabetic neuropathy, FEBS Lett, 査読有り, Vol 588, 2014, 1080-1086.

小島秀人, 櫻美和子, 寺島智也, 前川聡, 木村博, 糖尿病合併症を誘導する異常骨髄細胞の同定と新規治療薬の開発, 滋賀貴台雑誌, 査読有り, 26 巻, 2013 年, a14-19.

〔学会発表〕(計 6 件)

小島秀人, 中江由希, Li Zhao, 櫻美和子, 寺島智也, 岡野純子, 小松直樹, 宇田川潤, 前川聡, ナノダイヤモンドを用いた膵管上皮への遺伝子輸送システムの開発, 再生医療学会, 2014 年 3 月 4 日, 京都国際会館

中江由希, 小島秀人, 寺島智也, 小川暢弘, 岡野純子, Zhao Li, 小松直也, 前川聡, 標的化ナノダイヤモンドベクターの開発: DRG 神経細胞への遺伝子輸送ベクター, 再生医療学会, 2014 年 3 月 4 日, 京都国際会館

岡野純子, 小島秀人, 櫻美和子, 中江由希, 寺島智也, 小川暢弘, 浦部博志, 宇田川潤, 骨髄移植に際する放射線照射が表皮組織に与える影響, 再生医療学会, 2014 年 3 月 5 日, 京都国際会館

櫻美和子, 小島秀人, 中江由希, 寺島智也, 岡野純子, 宇田川潤, 前川聡, 宇田川潤, 糖尿病性神経障害を誘導する異常な骨髄幹細胞の同定, 再生医療学会, 2014 年 3 月 5 日, 京都国際会館

小川暢弘, 寺島智也, 川合寛道, 小島秀人, Kazuhiro Oka, Lawrence Chan, 前川聡, TNF 発現抑制による脊髄後根神経細胞保護作用を介した神経因性疼痛への遺伝子治療, 再生医療学会, 2014 年 3 月 5 日, 京都国際会館

小島秀人, 櫻美和子, 中江由希, 寺島智也, 前川聡, 糖尿病にともなう過食に対する骨髄幹細胞の分化異常の関与, エビジェネティクス研究会, 2013 年 5 月 31 日, 奈良県新公会堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 秀人 (KOJIMA HIDETO)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：00225434

(2)研究分担者

木村 博 (KIMURA HIROSHI)
滋賀医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号：00110560