

## A human $\beta$ -cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes

成島道樹<sup>a\*</sup>, 小林直哉<sup>a</sup>, 興津輝<sup>b</sup>, 田中斎仁<sup>c</sup>, 李順愛<sup>d</sup>, 陳勇<sup>a</sup>,  
三木厚<sup>a</sup>, 田中公章<sup>a</sup>, 中路修平<sup>c</sup>, 竹居孝二<sup>d</sup>, Alejandro Soto Gutierrez<sup>a</sup>,  
Jorge David Rivas-Carrillo<sup>a</sup>, Nalu Navarro-Alvarez<sup>a</sup>, Hee-Sook Jun<sup>e,f</sup>,  
Karen A Westerman<sup>g</sup>, 野口洋文<sup>b</sup>, Jonathan R T Lakey<sup>h</sup>, Philippe Leboulch<sup>g,i</sup>,  
田中紀章<sup>a</sup>, Ji-Won Yoon<sup>e</sup>

<sup>a</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・腫瘍外科学, <sup>b</sup>京都大学医学部附属病院 移植外科,

<sup>c</sup>クラレメディカル株式会社, <sup>d</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生化学,

<sup>e</sup>Rosalind Franklin Comprehensive Diabetes Center, Chicago Medical School,

<sup>f</sup>Department of Biochemistry, Chosun University School of Medicine,

<sup>g</sup>Massachusetts Institute of Technology, Division of Health Sciences and Technology,

<sup>h</sup>Human Pancreatic Islet Transplant Program, The University of Alberta Harvard Medical School and  
Division of Hematology, Department of Medicine

キーワード：ヒト膵 beta 細胞株, 可逆性不死化, 細胞移植, 1型糖尿病

### 要 旨

1型糖尿病に対して膵島移植が注目されているが、移植用膵臓の不足は深刻な問題である。ヒト膵島 beta 細胞株の樹立は、低コストで大量培養が可能となるため、糖尿病を標的とした移植医療やバイオ人工膵の開発にとって重要である。今回我々は、Cre/loxP システムを用いて不死化遺伝子 (SV40T, hTERT) を導入し可逆性不死化ヒト膵 beta 細胞株 (NAKT-15) を樹立した。In vitro 環境下において、NAKT-15細胞の insulin 発現は、Northern blot, Western blot, insulin

測定において、正常ヒト膵島細胞の約40%程度であった。また実際に糖尿病マウスに移植すると、マウスの高血糖は改善され200日以上生存を確認し、糖尿病の完全なコントロールが可能であった。腎摘後、速やかにマウスは高血糖を呈し、血糖コントロールは細胞移植による効果であると示された。さらに、摘出したグラフトの評価を行うと、in vivo 環境下では NAKT-15細胞の insulin 発現は、Northern blot, Western blot, insulin 測定において、正常ヒト膵島細胞の約60%程度であった。このように、可逆性不死化ヒト膵 beta 細胞株 NAKT-15は、in vitro 及び in vivo の検討において、正常ヒト膵島に匹敵する機能を有しており、1型糖尿病治療におけるドナー不足克服に向けた第一歩となる可能性がある。

平成19年2月受理

\*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-7257 FAX：086-221-8775

### プロフィール



成島 道樹

平成11年岡山大学医学部卒業。同年第一外科学に入局。平成15年より第一外科研究生。平成16年に岡山大学大学院医歯薬学総合研究科に入学。今回の研究テーマは、研究生時代から始め大学院入学後も継続されました。

## 緒 言

1型糖尿病はT細胞を介した自己免疫反応によって、insulinを産生する膵beta細胞が破壊されることにより生じる病態である<sup>1)</sup>。この2~30年の間、血糖を厳格にコントロールし1型糖尿病の根治療法となりうると期待されて、膵島移植は発展を遂げてきたが、ドナー膵の不足を克服することは困難であった<sup>2,3)</sup>。

今回の研究は、beta細胞に機能的に匹敵し移植に向けて安価に増殖可能なヒト膵beta細胞株を樹立するためにはじめられた。我々が樹立した可逆性不死化ヒト膵beta細胞株(NAKT-15)の膵beta細胞としての性質やglucose応答性insulin分泌機能に関して、*in vitro*及び*in vivo*において正常ヒト膵島と比較検討した。

## 方 法

不死化ヒト膵beta細胞株を樹立するため、新鮮ヒト膵島を分離し単層化培養の後に、simian virus 40 large T-antigen (SV40T)発現レトロウイルスベクター SSR#69を導入し、ハイグロマイシンで選別。次にbeta細胞選別のためMoFloを用いてNewport Green

(NG)陽性細胞を回収し、そのpopulationに対してhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT)発現レトロウイルスベクター SSR#197を感染させ不死化を完成(図1)。271個のクローンを得、そのうちsevere combined immunodeficiency (SCID) miceへの皮下移植(1×10<sup>6</sup> cells)にて腫瘍性がみられなかった253個のクローンを得た。これらに対して、insulinとIsl-1, Pax6, Nkx6.1, Pdx-1の発現の有無をreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)にて検討したところ、全ての転写因子とinsulinを発現しているのは、唯一クローン#15だけでありNAKT-15細胞と名付けた。NAKT-15細胞からの不死化遺伝子の除去は、Cre酵素発現アデノウイルスベクターの感染後に、G418選別とガンシクロビル処理とMoFloを用いたenhanced green fluorescent protein (EGFP)陰性細胞の回収にて行なった。この復帰NAKT-15細胞を用いて検討をすすめた。

NAKT-15細胞, 復帰NAKT-15細胞, 正常ヒト膵島に対して、insulin及び膵beta細胞に特徴的な転写因子(Isl-1, Pax6, Nkx6.1, Pdx-1, prohormone convertase (PC)1/3, PC2), 及び分泌顆粒蛋白(chromogranin A, synaptophysin)の発現の有無を、

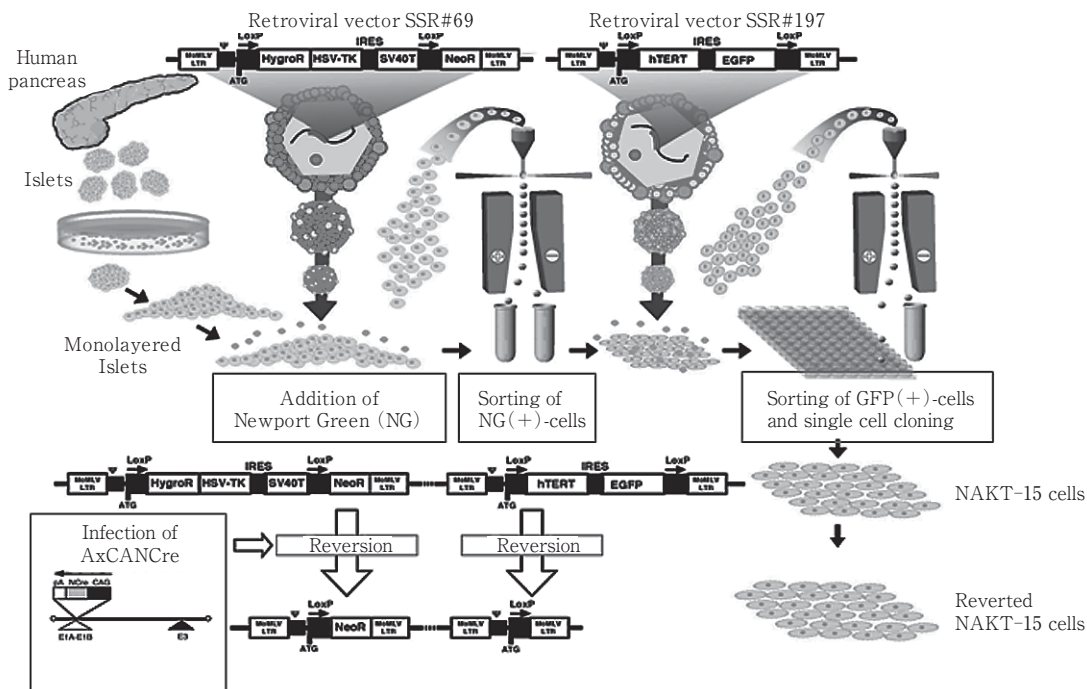


図1 可逆性不死化ヒト膵β細胞株(NAKT-15)樹立のシエーマ  
新鮮ヒト膵島を分離し単層化培養した後に、レトロウイルスベクター SSR#69 (SV40Tをcode)を導入。Newport Green陽性細胞をsortingした後に、レトロウイルスベクター SSR#197 (hTERTをcode)を導入。EGFP陽性細胞をsingle cell cloningすることで株化。不死化遺伝子(SV40T, hTERT)の切り出しは、Cre組換え酵素をcodeしたアデノウイルスベクター AxCANCreを用いる。

mRNA 発現に関しては Northern blot を，蛋白発現に関しては Western blot を行った。細胞の形態学的検討に関しては，insulin/Pdx-1 免疫染色及び insulin 免疫電顕にて検討した。insulin 分泌能に関しては，glucose 及び非 glucose 性 insulin 分泌促進物質に対する応答性を検討した。*In vivo* に関しては，復帰 NAKT-15 細胞を，streptozotocin (STZ) で薬剤誘導性に糖尿病にした SCID mice に移植 ( $3 \times 10^6$  cells) することで移植効果を検討した。

## 結 果

復帰 NAKT-15 細胞における Isl-1, Pax6, Nkx6.1, Pdx-1 の発現を，Northern blot, Western blot にて検討したところ，不死化 NAKT-15 細胞よりは強く発現していたが，正常ヒト膵島と比べると発現は弱かった (図 2)。復帰 NAKT-15 細胞において，prohormone convertase (PC) 1/3, PC2 や分泌顆粒蛋白の

chromogranin A, Synaptophysin の発現が認められたが，非 beta 細胞ホルモンである glucagon や somatostatin の発現は認められなかった (図 2)。復帰 NAKT-15 細胞に対する insulin 分泌試験に関しても，glucose 応答性に insulin 分泌が認められ，insulin content, C-peptide content も正常ヒト膵島の約 40% の量が認められていた (図 3)。復帰 NAKT-15 細胞を Matrigel 上で培養すると aggregation 形成する。細胞質の insulin と核内の Pdx-1 を免疫染色にて確認すると，aggregation に伴って insulin 発現が強くなっている (図 4 a-f)。また免疫電顕にて，insulin 陽性の分泌顆粒が確認された (図 4 g-j)。

復帰 NAKT-15 細胞の機能を *in vivo* にて評価するために，薬剤誘導性糖尿病マウス腎被膜下に移植して効果を確認した。復帰 NAKT-15 細胞移植マウスでは，2 週間以内に血糖が正常化し，以後 30 週まで生存し血糖も正常レベルを維持できた。一方，移植されていな

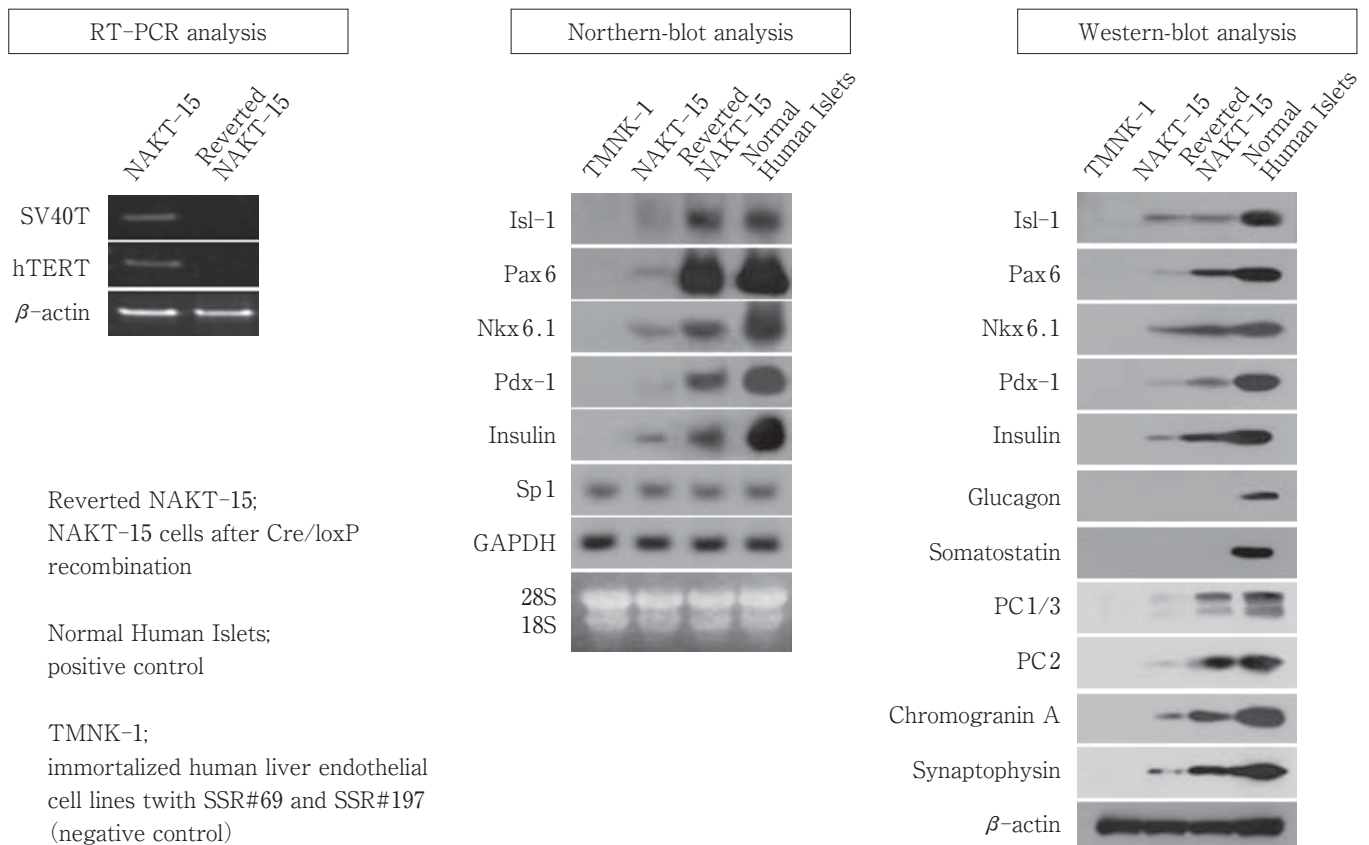


図 2 NAKT-15 細胞の分子学的検討

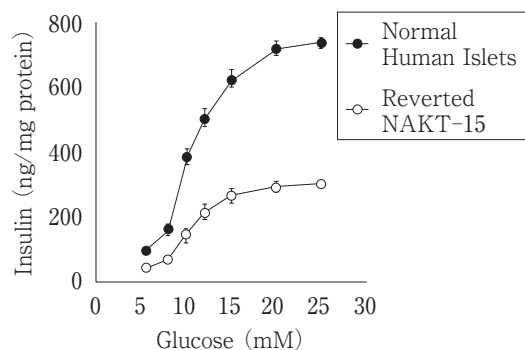
(a) RT-PCR (30 cycles) : NAKT-15 細胞と復帰 NAKT-15 細胞中の SV40T 及び hTERT の検出。(b) Northern blot analysis : insulin 及び転写因子 (Isl-1, Pax6, Nkx6.1 and Pdx-1) の mRNA レベルの検出。Human islets and TMNK-1 cells served as a positive and negative control, respectively。(c) Western blot analysis : insulin 及び転写因子 (Isl-1, Pax6, Nkx6.1 and Pdx-1) の蛋白レベルの検出。Human islets and TMNK-1 cells served as a positive and negative control, respectively。

いマウスは10週以内に全例死亡した(図5 a, b). 復帰 NAKT-15細胞移植マウスからグラフトを摘出すると, 速やかに高血糖に至るが, このことは移植細胞が血糖をコントロールしていたことを示す. 復帰 NAKT-15細胞移植マウスの血糖負荷テストにても, 血糖変化は正常パターンを示した(data not shown). ヒト特異的な insulin と C-peptide の測定キットを用いて, 移植マウスの血清中 insulin/C-peptide を測定したところ, とともに血糖応答性の分泌が確認された(data not shown).

腎被膜下からグラフトを回収し, 移植された復帰 NAKT-15細胞(移植 NAKT-15細胞)の性質を検討した. 移植 NAKT-15細胞における Isl-1, Pax6, Nkx6.1,

Pdx-1 の発現を, Northern blot, Western blot にて検討したところ, *in vitro* での復帰 NAKT-15細胞よりは強く発現していたが, 正常ヒト膵島と比べると発現は弱かった(data not shown). 移植 NAKT-15細胞における insulin content, C-peptide content も移植された正常ヒト膵島の約60%の量が認められていた. 移植マウスの腎・膵の組織を免疫染色にて検討すると, 腎被膜下の移植細胞は insulin 陽性であり, マウスの膵島は insulin 陰性であった(図6 a-j). また, 免疫電顕にて, insulin 陽性の分泌顆粒が確認された(図6 k, l).

reverted NAKT-15 細胞における  
グルコース応答性インスリン分泌



reverted NAKT-15 細胞における  
インスリン含有と C-peptide 含有

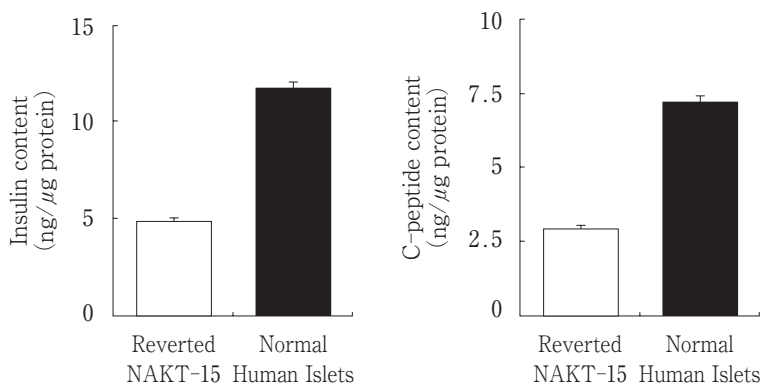


図3 Reverted NAKT-15細胞におけるインスリン分泌, インスリン含有及び C-peptide 含有

Reverted NAKT-15細胞は, グルコース応答性にインスリンを分泌する. また, インスリン含有量及び C-peptide 含有量は, 正常ヒト膵島に比べて約4割程度であった.

図4 Reverted NAKT-15細胞の形態学的検討

(a, b, c)位相差顕微鏡像(mono-layer cultures of reverted NAKT-15 cells after 3 h (a), 24 h (b) or 48 h (c) culture on Matrigel. (d, e, f)インスリン染色(red; cytoplasm)と Pdx-1 染色(green; nucleus) at 3 h (d), 24 h (e), and 48 h (f). Aggregation formation (b, c) enhanced the production of insulin (e, f) in the reverted cells. Original magnification 200. 免疫電顕: インスリン分泌顆粒が陽性, reverted NAKT-15 cells (g, h) and human islets (i, j). Bars: (g, i)300nm, (h, j)200nm.

図5 糖尿病マウスに対する Reverted NAKT-15細胞の移植効果

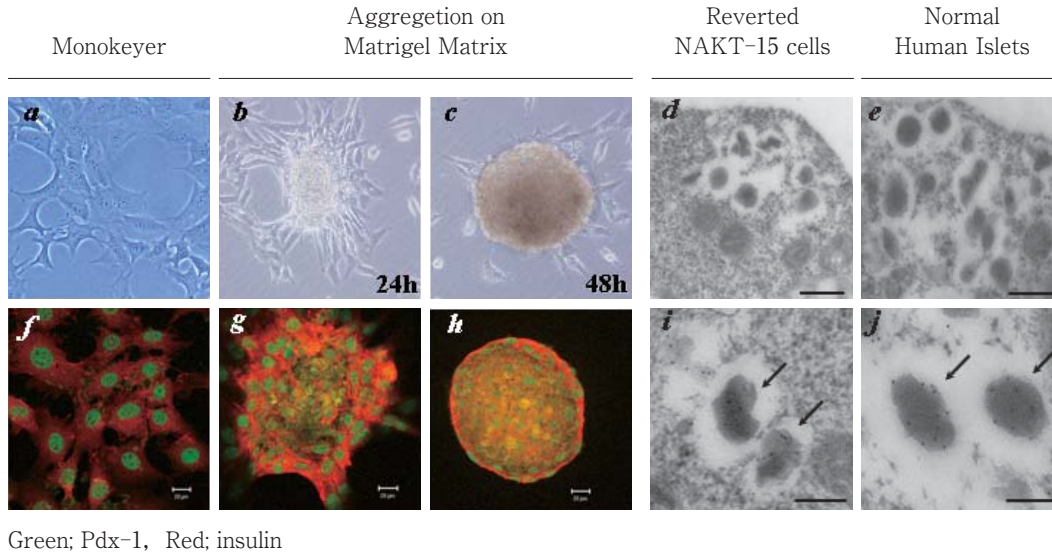
(a, b)薬剤誘導性糖尿病マウス(SCID mouse)の腎被膜下に Reverted NAKT-15細胞を移植し, 血糖値を測定. (a)血糖値, (b)生存曲線. 移植後30週目に左腎(移植片)を摘出.

Diabetic mice, diabetic SCID mice; Diabetic mice+reverted NAKT-15, diabetic SCID mice transplanted with reverted NAKT-15 cells; Diabetic mice+normal human islet, diabetic SCID mice transplanted with normal human islets (2,000 islets); Normal mice, normal SCID mice,  $n=10/\text{group}$ . \* $P<0.05$  by ANOVA (a) or Mann-Whitney U test (b). Vertical bars show the s.d.

図6 移植マウスにおける腎被膜下・膵・肝の組織学的検討

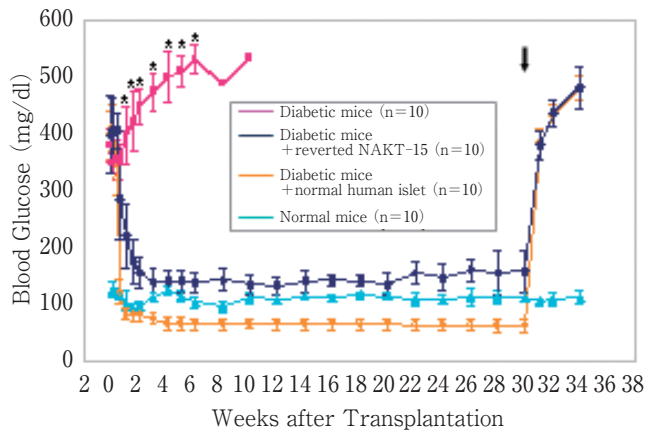
(a-d)HE染色: reverted NAKT-15細胞を含む腎被膜(a), 膵(b, c), 及び肝(d). (e-j)腎被膜下のインスリン免疫染色(red) (e), 膵(f, g), 及び肝(h)のインスリン免疫染色(red). (i, j)膵のグルカゴン染色(green). 腎被膜下の Reverted NAKT-15細胞はインスリン陽性であるが, 膵と肝においてインスリン陽性細胞は認められず. Pancreatic sections from normal mice stained with insulin (g) or glucagon (j). Original magnification: 100 (a, e, d, h); 200 (b, c, f, h-j). (k, l)インスリン免疫電顕にて transplanted NAKT-15細胞中のインスリン分泌顆粒を検出. Bars: (e, h)100m, (k)300nm, (l)200nm, (f, g, i, j)20m.



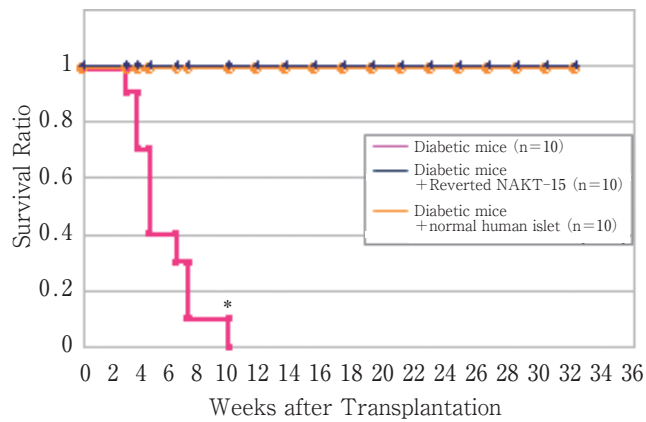


Green; Pdx-1, Red; insulin

図4 Reverted NAKT-15細胞の形態学的検討

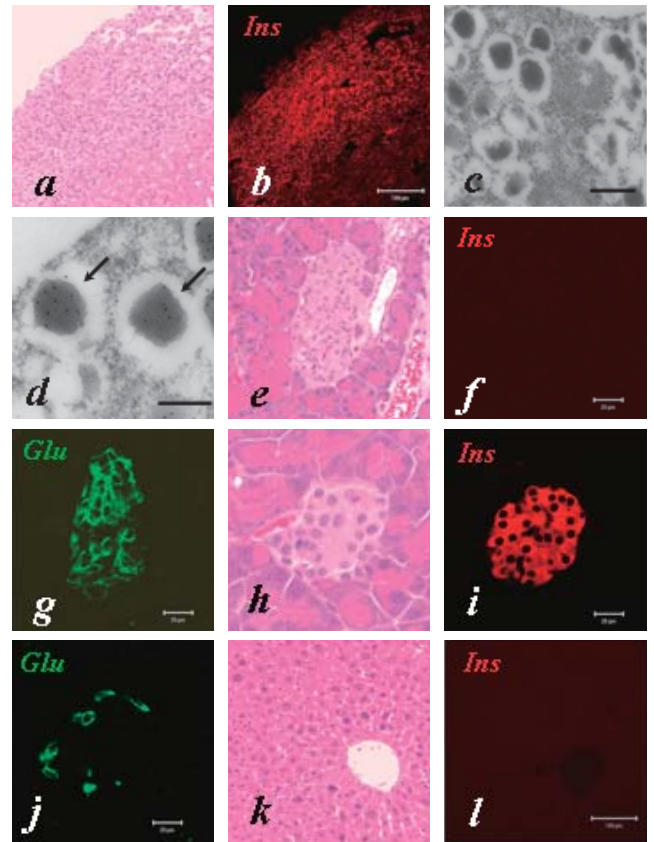


\*P<0.05 by ANOVA,  
Diabetic mice v.s. Diabetic mice+NAKT-15



\*P<0.05 by Mann-Whitney U test,  
Diabetic mice v.s. Diabetic mice+NAKT-15

図5 糖尿病マウスに対する Reverted NAKT-15細胞の移植効果



Red; insulin, Green; glucagon

図6 移植マウスにおける腎被膜下・膵・肝の組織学的検討

## 考 察

正常ヒト膵島に機能的に匹敵するヒト由来の膵 beta 細胞株の樹立は、膵島移植におけるドナー膵の不足を克服する 1 つの方法となりうる。膵 beta 細胞は増殖しないため、これまでも膵 beta 細胞を増やす試みはされてきた。しかしながら、増殖という側面と機能維持という側面を両立できた方法はこれまではなかった。我々は、この課題を、単層化培養<sup>4)</sup>と Cre/loxP システムを用いた不死化遺伝子 (SV40T, hTERT) の導入<sup>5)</sup>を用いて克服し、可逆性不死化ヒト膵 beta 細胞株 (NAKT-15) を樹立した。

NAKT-15細胞から不死化遺伝子を除去することで、glucose 応答性 insulin 分泌機能は向上し、長期継代においても機能面は維持された。*In vivo* の検討においても、糖尿病マウスへの移植にて、実際に30週間正常血糖で生存可能であった。

NAKT-15細胞の腫瘍性に関する安全性に言及すると、皮下移植の検討で腫瘍原性を持たないことが確認されているが、さらに NAKT-15細胞からの不死化遺伝子除去には、G418処理・ガンシクロビル処理・EGFP-negative cells sorting 処理と 3 つの安全弁を

備えている。

## 結 論

可逆性不死化ヒト膵 beta 細胞株 NAKT-15は、*in vitro* 及び *in vivo* の検討において、正常ヒト膵島に匹敵する機能を有しており、1型糖尿病治療におけるドナー不足克服に向けた第一歩となる可能性がある。

## 文 献

- 1) Yoon JW and Jun HS : Insulin-dependent diabetes mellitus : in Encyclopedia of Immunology, Roitt IM and Delves PJ eds, Academic Press, London (1998) pp 1390-1398.
- 2) Ricordi C and Strom TB : Clinical islet transplantation : advances and immunological challenges. Nat Rev Immunol (2004) **4**, 259-268.
- 3) Shapiro AM, Nanji SA and Lakey JR : Clinical islet transplant : current and future directions towards tolerance. Immunol Rev (2003) **196**, 219-236.
- 4) Narushima M, et al. : Adenovirus mediated gene transduction of primary isolated mouse islets. ASAIO J (2004) **50**, 586-590.
- 5) Kobayashi N, et al. : Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. Science (2000) **287**, 1258-1262.