インスリン治療が不可欠な高齢糖尿病患者の治療を目的とした インスリン分泌脂肪細胞作製の基礎研究

千葉大学医学部附属病院 糖尿病・代謝・内分泌内科
助教　石川 耕

（共同研究者）
国保旭中央病院　　医長　横尾 英孝
千葉大学予防医学センター　　助教　橘 香穂里

はじめに

インスリン治療が必要な高齢糖尿病患者は一定数存在し、そのうち認知症、老老介護、抑うつ症などの精神疾患を合併しインスリン自己注射ができない、あるいはその家族もインスリン注射をすることができない患者が存在する。今後、我が国でも高齢化社会がますます進むために、該当者も増えてくる事が予想される。そのような患者は高血糖のみが問題で、基本的には元気であるにもかかわらず、インスリン注射のために入院を余儀なくさせられ、患者本人の負担と医療費の増大を招くことになる。このような糖尿病患者を対象に糖尿病ケトアシドーシスに陥らない程度の基礎インスリン補充を目的として図１のようなインスリン分泌脂肪細胞自己移植による糖尿病治療の確立を目指して本研究はまずヒトインスリンをヒト脂肪細胞より分泌させることを目的とする。

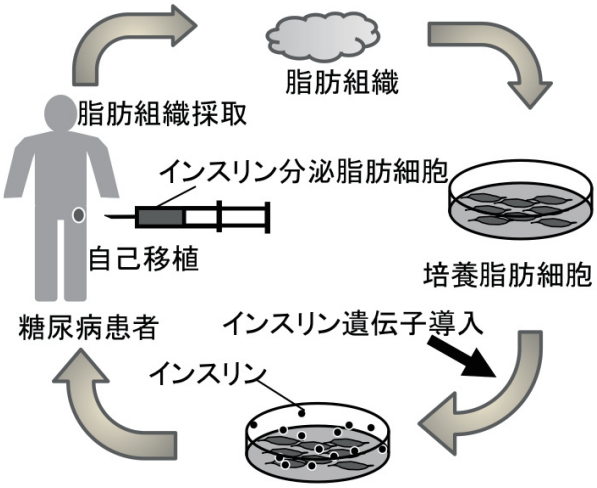

図1　インスリン分泌脂肪細胞自己移植による糖尿病治療

我々のグループは以前にマウスの脂肪細胞からインスリンを分泌させ、移植することにより血糖値を低下させることを報告した[(1)]。更に脂肪細胞移植を利用したタンパク補充療法として家族性lecitin-cholesterol acyltransferase（LCAT）欠損症患者に対して臨床治療の予定であり[(2)]、将来的にはインスリン分泌脂肪細胞を自己移植する際にはこの技術を応用する。

本研究ではヒトインスリンを分泌するヒト脂肪細胞の作製法を確立する技術を基礎検討することである。

結　果

１．ヒト脂肪細胞の作成

当院倫理委員会で承認を得ているプロトコールに沿って説明し、同意を得られた健康成人ボランティアの皮下脂肪組織を当院　形成外科医師の協力により採取する。約1g程度の重量に加工した後に Hank's balanced salt solution (HBSS) に入れて、クリーンベンチのある実験室に運搬する。

クリーンベンチ内で滅菌されたハサミを用いて脂肪組織を細切する。2mg/ml濃度のコラゲナーゼと40μg/ml濃度のゲンタマイシンに調整したHBSS 3mlに脂肪組織片を入れる。37℃にした恒温槽の中で静かに揺らしながら１時間インキュベーションする。20%のfatal bovine serum (FBS) と40μg/mlのゲンタマイシンに調整したDullbecco's modified Eagle's medium (DMEM) / F12-HAM (DMEM/FBS) 10mlを用意して、そこに脂肪組織片をインキュベーションした細胞液を加える。よく混和した後に400×gで１分間　遠心操作を加える。細胞液の上部には脂肪細胞を含む浮遊層があるためこの浮遊層を新しいDMEM/FBSに移して再度、遠心操作を行う。この操作をあと２回繰り返す。浮遊層を500μmのフィルターを通す。DMEM/FBSで満たしたフラスコに細胞浮遊液を入れて天井に接着させるように浮遊させた状態で37℃のインキュベーターに静置する。７日後に培養液を吸引して天井部を底部にひっくり返して、光学顕微鏡で観察すると図２から図５のように培養脂肪細胞の線維芽様細胞を得る事ができた。

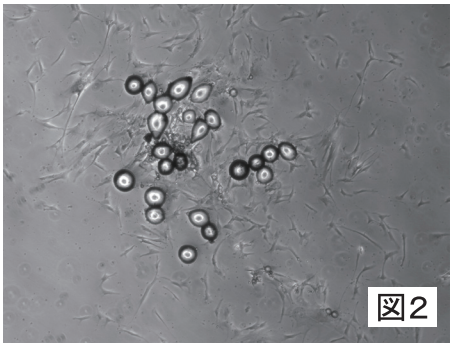
図2

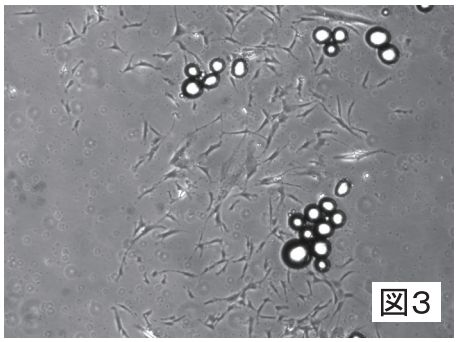
図3

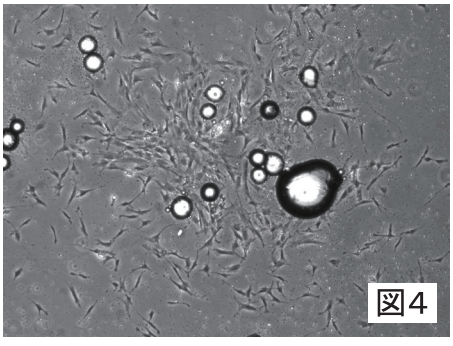
図4

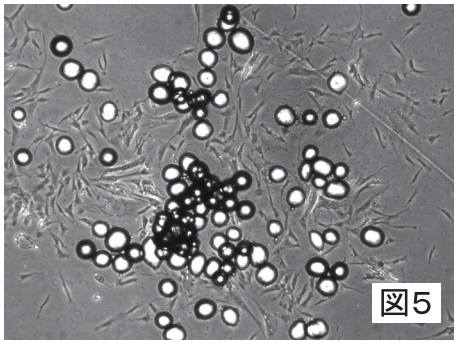
図5

得られた細胞は１週間に２回継代を行う。その後の実験に使用するためにセルバンカー中に凍結し、液体窒素タンクに保存する。

２．インスリン発現ベクターの作成

インスリン蛋白を恒常的に発現させる脂肪細胞を作るために、ベクターとしてレトロウイルスベクターを選択した。比較的安全性が高く、遺伝子を高発現させる事ができると言われているpMEI-5 Neo DNA（Takara）というレトロウイルスベクターを使用する事にした。

インスリンは膵β細胞にてプロインスリンから産生されるが、プロインスリンは図６の様に膵β細胞特異的に発現しているPC（prohormone converase）や CPE（carboxypeptidase）により切断されて、成熟したインスリンになり分泌される。脂肪細胞にプロインスリンの遺伝子をそのまま発現させてもプロセッシングがされないために成熟したインスリンを産生する事ができない。従って、遺伝子を改変する事によりPCやCPEが存在しない脂肪細胞でもインスリンを産生するようにする必要がある。ユビキタスに発現しているfurinというペプチダーゼによって切断されるように改変したプレプロヒトインスリン遺伝子はItoらによって作成されている(1)。この改変遺伝子を含むプラスミドを譲渡してもらい、プレプロインスリン遺伝子相当のシークエンスを確認したところ、制限酵素BamHIによりCペプチドが切れるように恣意的に遺伝子を改変していたため、mutagenesis kitを用いて通常の配列に戻した。このプラスミドを大腸菌にトランスフォーメーションし、LB培地にまく。翌日コロニーからピックアップして増殖後、ミニプレップしプラスミドのシークエンスを確認した。PCR法により目的とする遺伝子を増幅し、フェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿にてDNAを精製した。

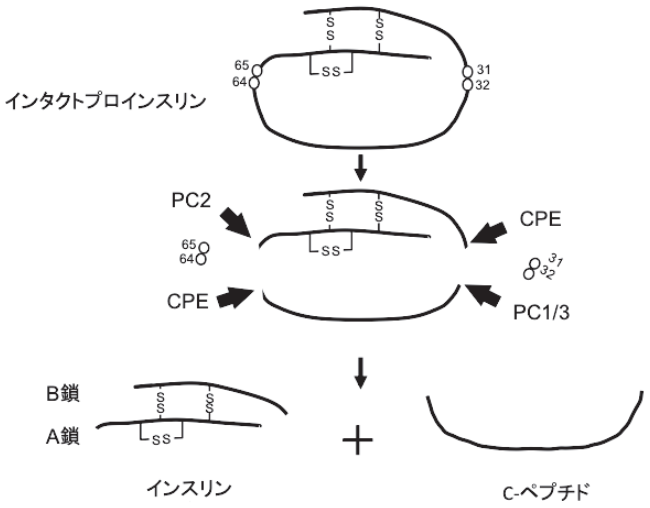

図6　プロインスリンのプロセッシング
PC: prohormone converase　　CPE: carboxypeptidase

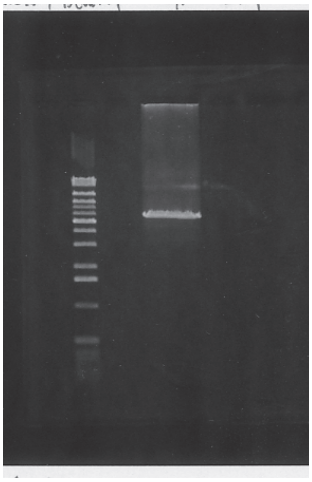

図7　pMEI-5 Neo DNA　電気泳動

pMEI-5 Neo DNAを制限酵素BamHIとSacⅡで切断したが、図７の様にアガロースゲルにきれいなバンドを得る事ができず、うまく抽出できなかった。ゲルにて精製する事は断念して、精製せずに直接インサートを入れてライゲーションをする事にした。大腸菌にトランスフォーメーションしてコロニーからPCRをしたところいくつかのコロニーでPCRがかかった。身

にプレップをしてシークエンスを確認したところうまくインサートが入っていたのを確認。大量培養を行い、602.3ng/μlの濃度のベクターを得る事ができた。

考　察

本研究により移植に用いる脂肪細胞の採取、獲得に成功した。脂肪細胞にインスリン分泌をさせるためのインスリン改変遺伝子の入ったレトロウイルスベクターを確立する事ができた。レトロウイルスベクターを作成するところでやや時間がかかったが、最終的にはシークエンスを確認して問題ないベクターができたので、次段階としてヒト脂肪細胞にトランスフォーメーションすることになる。培養脂肪細胞からインスリンが分泌される事を培養液中のインスリン濃度を測定する事により確認する。トランスフォーメーションした脂肪細胞が恒常的にインスリンを分泌するかどうか、脂肪細胞が腫瘍化しない事を培養の継続あるいは継代により有効性と安全性を確認する。以上の様に有効性と安全性の確認を様々な方法で検討する必要があるが、本実験でそのスタート地点に到達したという事である。

１型糖尿病の様にインスリン治療が必須である病態が存在し、膵臓移植や膵島移植が治療として試みられているが他者の臓器であるために免疫抑制薬を使用しなければならない問題が生じる。本研究のコンセプトであれば自己の脂肪組織を用いるので免疫抑制薬が必要ない事とiPS細胞の様に幹細胞に関わるような遺伝子操作をしていないために比較的、安全であると考えられる。

最近、幹細胞から膵β細胞を分化させ大量に培養することができたとする報告があった[3]。糖尿病の治療として多様なアプローチ法があると思うがインスリン分泌能のある脂肪細胞の利点を生かしながら臨床応用に向けて更に基礎検討を進めて行きたい。

要　約

高齢化社会を迎える日本において、インスリン治療が必須ではあるが自己インスリン注射が不可能な患者群が一定以上存在し、今後も増加する事が予想される。生存に必要な基礎インスリンの補充を目的に、インスリン分泌させた脂肪細胞を皮下に移植する事によりインスリン自己注射を不要にしたいという概念の治療法を進めるための基礎検討を目的に実験を行った。ヒト脂肪細胞初代培養を得るためにヒト皮下脂肪組織を採取し、天井培養法を用いて脂肪細胞を獲得し液体窒素に保存した。

脂肪細胞からインスリンを分泌させるためにレトロウイルスベクターを作成した。天然型ヒトインスリンの遺伝子のままではプレプロインスリンからインスリンをプロセッシングする事ができないため、furinで切断できる様に遺伝子改変したインサートを調整してベクターを作成した。

文　献

1. Ito M, Bujo H, Takahashi K, Arai T, Tanaka I, Saito Y, Implantation of primary cultured adipocytes that secrete insulin modifies blood glucose levels in diabetic mice. Diabetologia; 48（8）: 1614-20, 2005
2. Kuroda M, Bujo H, Aso M, Saito Y, Adipocytes as a vehicle for ex　vivo gene therapy: Novel replacement therapy for diabetes and other metabolic diseases. J Diabetes Invest; 2（5）: 333-40, 2011
3. Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, Peterson QP, Greiner D, Melton DA, Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro, Cell;159（2）:428-39. 2014