

# Tissue engineering により作製したインスリン産生細胞における インスリン分泌調節性に関する研究

中 井 望 根 本 昌 実 佐々木 敬  
田 嶋 尚 子

東京慈恵会医科大学内科学講座糖尿病・代謝・内分泌内科

(受付 平成 19 年 11 月 16 日)

## DEVELOPMENT OF A REGULATORY SYSTEM FOR INSULIN SECRETION FROM GENETICALLY ENGINEERED CULTURE CELLS

Nozomu NAKAI, Masami NEMOTO, Takashi SASAKI, and Naoko TAJIMA

*Division of Diabetes, Metabolism and Endocrinology,  
Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine*

To develop a novel control method for the secretion of insulin by tissue-engineered cells, we evaluated the inducible secretion of substances from engineered culture cells at both the transcriptional and exocytotic levels *in vitro*. To evaluate transcription, we took advantage of a physically inducible promoter, the heat shock element (HSE) of the heat shock protein gene, by ligating it to either a modified human proinsulin cDNA (INS/fur) that mediates processing of insulin in nonendocrine cells or to the secreted alkaline phosphatase (SEAP) gene. Significant increases in the concentration of human insulin in the culture medium were observed only when we stimulated the engineered C2C12 mouse myoblasts with teprenone (geranylgeranylacetone), a drug commonly used to treat gastritis and ulcers, but failed to detect any significant increase in the insulin concentration in any other cell types. Significant increases in SEAP activity in culture media following heat shock were observed with all cell types evaluated. The results suggest the feasibility of transcriptional control of transgene expression by activation of the HSE combined with heat shock or chemicals. To examine exocytosis, on the other hand, we used glucagon-like peptide-1 (GLP-1), which is secreted from small intestinal cells and is a combined receptor of pancreatic B cells, and stimulated insulin secretion in different types of cell lines, including endocrine cells that constitutively express the insulin gene and were engineered with the GLP-1 receptor gene. When insulin-secreting AtT20 cells were stimulated with GLP-1, a significant increase in the concentration of insulin was observed in the culture medium. However, no significant change in insulin secretion was detected when nonendocrine engineered cells were used. The results suggest that the combination of engineered cell types and the level of control must be considered in the construction of regulatory systems with engineered insulin-secreting cells.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2008 ; 123 : 151-61)

Key words: heat shock protein, insulin, glucagon-like peptide-1, teprenone

### I. 緒 言

私たちは、今までに生物学的に活性を持つインスリン分泌が可能な細胞を作製し、1型糖尿病や

インスリン分泌能が著しく低下した2型糖尿病の基礎インスリン分泌を補う新規治療法の開発を行ってきた<sup>1)2)</sup>。その中でマウス線維芽細胞由来の前脂肪細胞である3T3-L1細胞にインスリン遺伝

子を導入し, streptozotocin 誘発性 1 型糖尿病モデルマウスの腹腔内に細胞移植を行ったところ, 移植しないコントロール群では高血糖が持続したのに対し, 移植マウスでは血糖は低下したものの低血糖のため死亡した. この実験結果から, インスリン産生細胞の治療効果は認められたが, その効果を制御することが重要な課題として残された. 生理的にはインスリンは膵臓の  $\beta$  細胞で合成され, 細胞質の分泌顆粒内に蓄えられる. 最も強力な分泌刺激因子はグルコースである. グルコースが糖輸送担体を介して細胞外から細胞内に移動し, 細胞内で代謝され ATP を産生する. これが  $K_{ATP}$  チャネルを閉鎖して細胞膜の脱分極をおこし, 電位依存性 Ca チャネルを活性化する. こうして  $Ca^{2+}$  の細胞内への流入を経て, 細胞質に存在するインスリン分泌顆粒が細胞膜と融合し, 細胞外へ開口放出される (Fig. 1)<sup>3)</sup>. 本研究では遺伝子改変によりインスリン分泌の調節を可能にするため, 2 つの方法を検討した. 第一は, 転写レベルで調節を行う方法である. プロモーター活性を変

化させ, 下流に存在するインスリン遺伝子の mRNA 転写レベルでの調節性が得られれば, インスリン分泌を調節することができると考えられる. そこで今回はプロモーターと接続したインスリン遺伝子あるいは分泌型 alkaline phosphatase (SEAP) 遺伝子をマウス筋芽細胞の C2C12, マウス下垂体内分泌細胞の AtT20, マウス前脂肪細胞の 3T3-L1 等の培養細胞へ遺伝子導入した. 作製した各種遺伝子導入細胞株を熱または薬剤で刺激し, インスリンや SEAP の反応性を観察した. 第二の方法はインスリン開口放出レベルにおける分泌調節機構の開発研究である. 転写レベルの調節では, 刺激を加えてからインスリンが分泌されるまでに数時間を要すると考えられる. そこで私たちは, より速いタイミングで代謝調節を行うために,  $\beta$  細胞に対するインスリン分泌刺激因子である glucagon like peptide-1 (GLP-1) を用いて開口放出レベルでの分泌調節の検討を行った. GLP-1 はインクレチンの一種であり, 下部小腸に存在する L 細胞から放出される消化管ホルモン

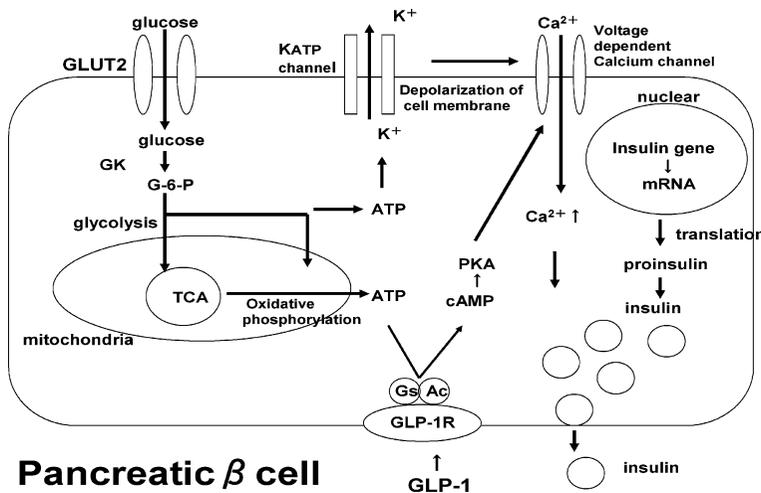


Fig. 1. Glucose-induced insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells.

After uptake into cells via the glucose transporter 2 (GLUT2), glucose is catalyzed into glucose-6-phosphate by glucokinase, a key enzyme for the sequent glycolytic pathway and TCA cycle. The increase in ATP/ADP ratio and concentration of ATP produced by the glycolysis in  $\beta$  cell results in closure of the KATP channel, followed by depolarization of the membrane, opening of the voltage-dependent calcium channel (VDCC), and increase in intra-cellular concentration of calcium ions that leads to exocytosis of the insulin-containing granule.

The GLP-1 stimulates the cAMP PKA pathway to secrete insulin granules that is coupled to a stimulatory G-protein (Gs) and a calcium-calmodulin-sensitive adenylyl cyclase (Ac).

の一つである。主に食後に分泌されて膵臓β細胞に働きG蛋白共役型膜受容体である受容体を介して細胞内cAMP濃度を高めることで、インスリン分泌を促す<sup>4)5)</sup>。このGLP-1の受容体であるGLP-1 receptor (GLP-1R)を、インスリン分泌が可能な非膵β細胞に遺伝子導入した。さらに作製した細胞に対して、GLP-1での刺激を行い、インスリン分泌調節を検討した (Fig. 1)。

## II. 材料と方法

### 1. プラスミドの構築

生理的なインスリンのプロセッシングは膵β細胞の細胞質に存在する prohormone convertase (PC1/3, PC2) によって行われる<sup>6)</sup>、非内分泌、非膵β細胞においては、そこで発現するプロテアーゼ, furin によってプロセッシングを受けるよう認識部位の塩基配列を変換した改変型インスリン遺伝子, *insfur*<sup>7)</sup>を用いた。発現ベクターでは *insfur* 遺伝子を heat shock protein (*hsp70*) 由来のプロモーターである heat shock element (HSE) の下流に挿入した。さらにレトロウイルスベクターのエンハンサー/プロモーターである Long Terminal Repeat (LTR) の影響を避けるため、LTRの方向とは転写が逆向きに起こるように接続してベクタープラスミドを作製した (Fig.

2)。

これらの目的のためプラスミド構築を以下の通り行った。制限酵素 *Sal* I と *Bgl* II にて pSEAP2-Basic (全長 4.7 kbp, Clontech, CA, USA) より SEAP 遺伝子を切り出した。一方ベクター pLXSN (Clontech, CA, USA) の LTR の下流に *insfur* 遺伝子が組み込まれた pLinsfurSN (6.2 kbp) から *Eco*R I と *Bam*H I にて *insfur* 遺伝子を切除し、ここに SEAP 遺伝子を pLXSN の LTR とは反対の方向に転写されるように組み込むことで pLSEAPSN (7.7 kbp) を作製した。これに HSE をクローニングするため pLSEAPSN を *Eco*R I にて切断し、LTR とは逆向きに SEAP 遺伝子が転写される方向となるように HSE を ligation し、pLSEAP-HSESN (8.9 kbp) を構築した。次に LTR と同じ方向に *insfur* 遺伝子が組み込まれた pLinsfurSN から *Bam*H I, *Eco*R I にて *insfur* 遺伝子を切り出し、逆方向に ligation することで pLinsfurSN (6.2 kbp) を作製した。これを *Eco*R I で切断し、HSE を *insfur* 遺伝子に LTR とは逆の方向へ ligation し、pLinsfur-HSESN (7.4 kbp) を構築した。HSE 遺伝子は、マウス熱誘導タンパク質である *hsp70A1* (GenBank; M76613, bases 1 to 1040) を用いた。GLP-1R 遺伝子は、Bernard Thorens 教授 (スイス Lausanne 大学) より分与された<sup>8)</sup>。以上のプラ

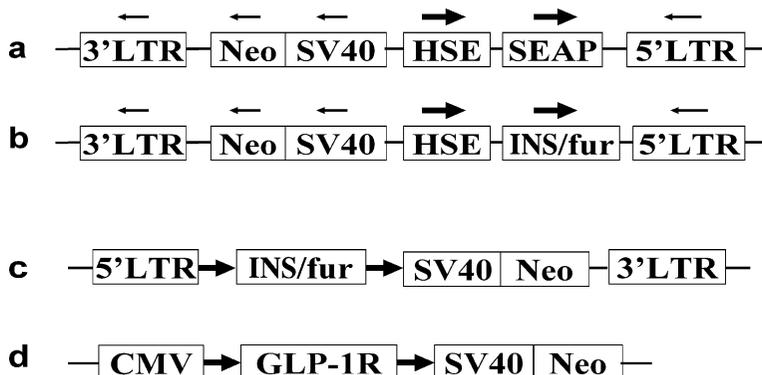


Fig. 2. Plasmid construction

a, b The retrovirus vector for expression of SEAP and the modified insulin cDNA (*insfur*) under control of the HSE promoter that is connected in an opposite direction to LTRs.

c *Insfur*-expression vector with LTRs.

d GLP-1receptor (GLP-1R) expression vector with the CMV promoter.

Plasmid a and b; for the evaluation of the level of transcription, plasmid c and d; for the evaluation of exocytosis.



トから培地を採取し、SEAP 活性またはインスリン濃度を測定した。SEAP 活性の測定には Reporter Assay Kit SEAP (東洋紡) を用いた。各群の培地を 20  $\mu$ l ずつ 96 ウェルマイクロプレート (C96 WHITE MAXISORP 437796, Nunc, DK) に移し、20  $\mu$ l の内在性 AP 阻害液を加え混合し、37°C で 30 分間反応させた。その後、1 分間氷上に静置し、160  $\mu$ l の化学発光試薬 (Lumi-Phos Plus, 東洋紡) を混合した。遮光状態のまま 37°C で 30 分間反応させ、ルミノメーターを用いて 7 秒間の発光量を測定した。SEAP 活性値は、刺激を付加していない細胞培地中の細胞  $1 \times 10^6$  個あたりの SEAP 活性を 1 とした相対値で評価した。一方インスリンは、それぞれの細胞における培養上清から刺激前と刺激後 900  $\mu$ l ずつ培地を採取し、抗原抗体反応を用いた 2 ステップサンドイッチ Enzyme Immunoassay 法 (LS 試薬栄研インスリン, 栄研化学) により測定した。

## 2) 開口放出レベル

GLP-1 (amide fragment 7-36 human, SIGMA-ALDRICH MI, USA) は 1% 酢酸溶液で溶解した。この 100  $\mu$ M 溶液を無血清の DMEM により作製した。C2C12/pLinsfur-GLP-1RSN および AtT20/pLinsfur-GLP-1RSN の 6 穴プレートより、刺激前、100 nM の GLP-1 による刺激後 30 分、60 分、120 分での培養上清を採取し、抗原抗体反応を用いた 2 ステップサンドイッチ Enzyme Immunoassay 法によりインスリン濃度を測定した。

## III. 結 果

### 1. 至適 teprenone 濃度の検討

Teprenone 刺激を行うに先立ち、プロモーター (hsp) を活性化し、その下流の遺伝子を発現させるために最適な teprenone の培地中濃度を探索した。C2C12/pLinsfur-HSESN に対し、異なる濃度の teprenone 含有培地、および teprenone を含まないコントロールにて、培養細胞に対し刺激を行った結果、 $1 \times 10^{-4}$  M 濃度の teprenone 刺激が、コントロールに対し有意なインスリンの増加を示した (Fig. 3)。一方  $1 \times 10^{-5}$  M、 $1 \times 10^{-6}$  M 濃度の teprenone 刺激では、コントロールと比較し有意

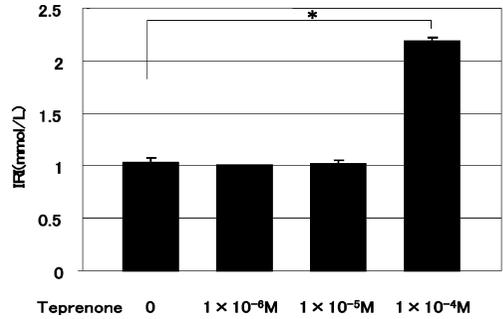


Fig. 3. Teprenone-induced insulin secretion from C2C12/pLinsfur-HSESN cells.

We generated C2C12/pLinsfur-HSESN cells by transfecting C2C12 with the vector in which the insur cDNA is expressed by the HSE promoter. We stimulated the cells with different concentrations of teprenone. Twenty-four hours after stimulation, we measured human insulin levels in the medium. Human insulin was significantly increased in the  $1 \times 10^{-4}$  M teprenone exposure group compared to the control group (\* $P < 0.01$ ,  $N = 3$ ). However no significant difference was observed in the  $1 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M teprenone exposure group and the control group.

差を認めなかった。以上の結果より C2C12/pLinsfur-HSESN に対しては、 $1 \times 10^{-4}$  M 濃度の teprenone を用いることとした。

### 2. Teprenone 刺激によるインスリン濃度または SEAP 活性の変化

Hsp プロモーターによりインスリンあるいは SEAP が発現する筋芽細胞 C2C12 を用いて、teprenone の効果を検証した。Teprenone で刺激した群では 1.38  $\mu$ U/ml のインスリンを検出可能であったが、コントロールではインスリンは検出されなかった (Fig. 4)。同条件下で分泌産物をインスリンの代わりに SEAP として検討した結果、コントロールと比較して、 $1 \times 10^{-5}$  M 濃度の teprenone 刺激で SEAP 活性に有意差を認め、teprenone 刺激による転写亢進を検出した (Fig. 5)。また  $1 \times 10^{-4}$  M 濃度の刺激では活性が大幅に低下し、 $1 \times 10^{-6}$  M 濃度の刺激では有意差を認めず、転写亢進は検出できなかった。次に hsp プロモーターによりインスリンあるいは SEAP が発現する内分泌細胞 AtT20 を用いて、teprenone の効果を検証した。刺激 24 時間後の培地中インスリンを

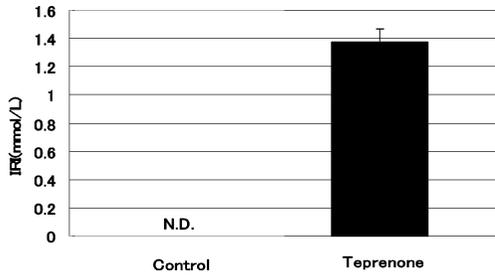


Fig. 4. Teprenone-induced insulin secretion from the C2C12/pLinsfur-HSESN cells. We stimulated C2C12/pLinsfur-HSESN cell with  $1 \times 10^{-4}$  M teprenone. After 24 hrs, we measured human insulin in the medium. The level human insulin was  $1.38 \mu\text{U/ml}$  in the teprenone exposure group, but was not detected in the control group (N.D., Not Detected;  $N=3$ ).

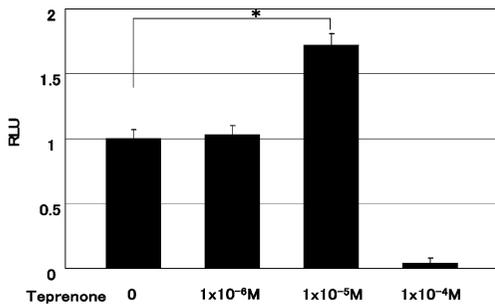


Fig. 5. Teprenone-stimulated SEAP excretion from the C2C12/pLSEAP-HSESN cells. SEAP activity was measured in the medium after stimulation for 24 hrs. SEAP activity was significantly increased by exposure to the  $1 \times 10^{-5}$  M teprenone compared to the control ( $*P < 0.01$ ,  $N=3$ ). RLU, relative luciferase unit.

測定した結果, teprenone 刺激の有無に関係なく, インスリンは検出感度以下であった. 同条件下で分泌産物をインスリンの代わりに SEAP として検討したが, teprenone 刺激による転写亢進は検出できなかった. 同様に hsp プロモーターによりインスリンあるいは SEAP が発現する前脂肪細胞 3T3-L1 を用いた場合も teprenone によるインスリンの転写亢進は検出できなかった. しかし同条件下で分泌産物をインスリンの代わりに SEAP として検討した結果, 培地のみコントロールと比較し,  $1 \times 10^{-5}$  M 濃度の teprenone 刺激で有意な転写亢進を検出した (Fig. 6). また  $1 \times 10^{-4}$  M 濃度の刺激では SEAP 活性は大幅に低下

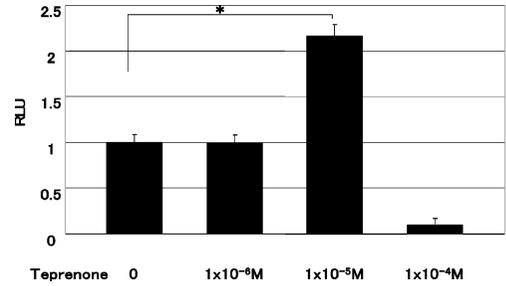


Fig. 6. SEAP activity of the culture medium after 24 hrs stimulation of the 3T3-L1/pLSEAP-HSESN cells by different concentrations of teprenone. SEAP activity was increased significantly compared to the control group when the cells were exposed to the  $1 \times 10^{-5}$  M teprenone ( $*P < 0.01$ ,  $N=3$ ).

Table 1. Summary of the results of the transcriptional induction experiments.

Three kinds of transformed cell lines were stimulated by heat shock or teprenone exposure, and the concentration of human insulin or SEAP activity were measured in the culture medium. Following teprenone exposure, human insulin and SEAP activity were increased significantly in the medium of C2C12 cells compared to control cells. The SEAP activity was also increased significantly in the culture medium of 3T3-L1 cells compared to control cells. However, there was no significant difference between the SEAP activity of AtT20 cells and control cells. In the heat shock experiments, SEAP activity was significantly increased in the C2C12/SEAP-HSESN and AtT20/SEAP-HSESN cells compared to the control cells. There was no significant difference detected between the SEAP activity with 3T3-L1/SEAP-HSESN cells and the control cells.

Cell	Plasmid	Stimulation	
		Teprenone	Heat
C2C12	Insfur	↑	→
C2C12	SEAP	↑	↑
AtT20	Insfur	→	→
AtT20	SEAP	→	↑
3T3-L1	SEAP	↑	→

し,  $1 \times 10^{-6}$  M 濃度の刺激ではコントロールと比較し有意な転写亢進を検出できなかった (Table 1).

### 3. 熱刺激による培地中インスリン濃度またはSEAP活性の変化

HspプロモーターによりインスリンあるいはSEAPが発現する筋芽細胞C2C12を用いて、熱刺激の効果を検証した。熱刺激24時間後に培地中のインスリンを測定した結果、熱刺激の有無に関わらずインスリンは検出感度以下で、熱による転写亢進を検出できなかった。同条件下で分泌産物をSEAPとして検討した結果、熱刺激を加えた群は熱刺激を加えない群と比較し1.5倍のSEAP活性増加を認め、熱による転写亢進を検出した(Fig. 7).

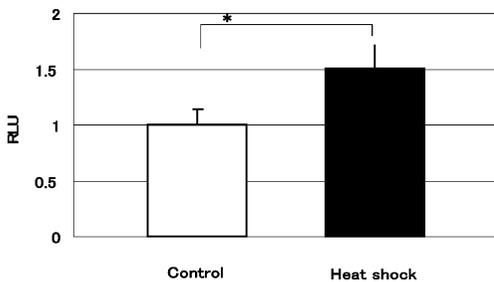


Fig. 7. SEAP activity of the culture medium of C2C12/pLSEAP-HSESN cells after heat shock.

SEAP activity of the culture medium 24 hrs after stimulation of the C2C12/pLSEAP-HSESN cells with heat shock (42°C, 1.5 hrs). The SEAP activity was significantly increased by the heat shock compared to the non-stimulated group (\* $P < 0.01$ ,  $N = 6$ ).

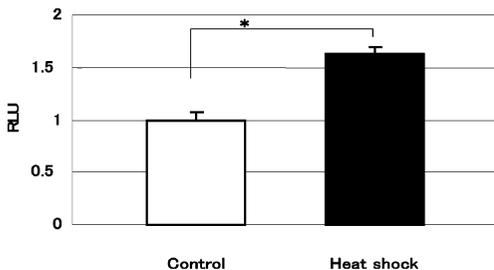


Fig. 8. SEAP activity of the culture media of AtT20/pLSEAP-HSESN cells, after stimulation by heat shock.

SEAP activity of the culture media 24 hrs after stimulation of the AtT20/pLSEAP-HSESN cells by the heat shock (42°C, 1.5 hrs). The SEAP activity was increased significantly by the heat shock compared to the non-stimulated group (\* $P < 0.001$ ,  $N = 6$ ).

7). 同様に hspプロモーターによりインスリンあるいはSEAPが発現する内分泌細胞AtT20を用いて熱刺激の効果を検証した。熱刺激の有無に関わらずインスリンは検出感度以下であったが、分泌産物をSEAPとして検討した結果、熱刺激を加えた群では熱刺激を加えない群と比較し1.63倍のSEAP活性増加を認め、熱による転写亢進を検出した(Fig. 8)。同様の実験をhspプロモーターによりインスリンあるいはSEAPが発現する前脂肪細胞3T3-L1を用いて行ったが、熱刺激の有無に関わらず、インスリン、SEAPとも熱による転写亢進を検出できなかった(Table 1).

### 4. GLP-1R刺激を介する培地中インスリン濃度の変化

内分泌細胞を用いたインスリン産生細胞に、GLP-1R遺伝子を導入して作製したAtT20/pLinsfur-GLP-1RSNの6つの細胞クローンA~Fに対しGLP-1溶液で曝露刺激を行った。100 nMのGLP-1溶液で刺激したクローンA, B, Cでは、刺激120分後の培地中インスリンに増加を認めた。しかし刺激を加えなかったクローンD, E, Fでは、インスリンは検出感度以下であった(Table 2)。次に筋芽細胞を用いたインスリン産生細胞にGLP-1R遺伝子を導入して作製したC2C12/pLinsfur-GLP-1RSNのクローンA~F

Table 2. Insulin secretion from AtT20/pLinsfur-GLP-1RSN cells, by GLP-1 stimulation.

After 120 minutes of stimulation of AtT20/pLinsfur-GLP-1RSN cells with 100 nM GLP-1, the concentration of human insulin in the culture medium was increased with clones A, B, and C, while human insulin was not detected with clones D, E, and F (control with no GLP-1). IRI (mol/L): immunoreactive insulin.

	Clone	Before GLP-1	After GLP-1 (120 min)
+	A	1.16	3.95
	B	1.10	6.58
	C	<1.00	1.52
-	D	<1.00	<1.00
	E	<1.00	<1.00
	F	<1.00	<1.00

に対し、同条件下で GLP-1 の刺激を行ったが、GLP-1 刺激の有無に関係なく、刺激 120 分後の培地中インスリンは検出感度以下であった。

#### IV. 考 察

1 型糖尿病や内因性インスリン分泌が著しく低下した 2 型糖尿病に対しては、頻回の皮下インスリン注射法が現在最も確立された治療法であるが、この注射法に代わる治療法として、ポンプ療法や膵島移植がある。可溶性インスリンを専用ポンプで微量づつ持続的に皮下注入する CSII (Continuous Subcutaneous Insulin Infusion) は、頻回注射では不安定な血糖コントロールの患者に適応となる<sup>10)</sup>。一方、膵島移植は、ドナーの膵臓から分離した膵島を移植する治療方法で、エドモントンプロトコールと呼ばれている良好なプロトコールがある<sup>11)</sup>。しかし免疫抑制や倫理面で大きな問題を抱えている。私たちは、この様な従来の治療とは異なる、自己の細胞治療の基礎的検討を行った。自己の細胞を用いて tissue engineering を行い、作製した細胞を自身へ移植することで、非自己を排除するという免疫の問題もクリアできるのではないかと考えた。これまでの研究結果から、インスリン分泌に調節性を加えることが不可欠ということがわかっていたので、糖尿病に対する遺伝子治療の実現を目指し、転写レベルと開口放出レベルでのインスリン分泌調節について検討した。

転写レベルでのインスリン分泌調節の検討のために、熱ショックタンパク質 (hsp) の転写調節領域に存在し、ストレス時の発現を制御する HSE をプロモーターとして利用した。Hsp は通常、細胞への 42°C、1.5 時間の熱刺激で活性化される特徴を持つことから、HSE をインスリン遺伝子と接続しプロモーターとして用いることで、インスリンの分泌に調節性を加えることが可能となり得ると考えたのである。本実験を行う前に予備実験として、HSE と接続した SEAP 遺伝子を C2C12 細胞に導入して作製した細胞に対して熱刺激を行い、その時間経過を追跡した。その結果、熱刺激 16 時間後より培地中の SEAP 活性の上昇が起こり、30 時間付近まで SEAP 活性値の上昇が確認できた (data not shown)。培地中の SEAP 活性

は hsp の活性化を経て一定時間後の活性化状態を示している。よって転写実験には分泌タンパク質の上昇が確実と思われる 24 時間後に評価することにした。

転写レベルにおける分泌調節の検討として、teprenone 刺激による SEAP 活性またはインスリン濃度を測定した。その結果、insfur 遺伝子を導入した C2C12 細胞および SEAP 遺伝子を導入した C2C12 細胞と 3T3-L1 細胞で teprenone  $1 \times 10^{-4}$  M ~  $1 \times 10^{-5}$  M によるインスリンまたは SEAP の分泌亢進を認めた。すなわち teprenone が HSE システムを介して下流の遺伝子であるインスリンあるいは SEAP の mRNA 転写を促進したと考えられた。ところが他の細胞を用いた実験では、 $1 \times 10^{-4}$  M の teprenone 刺激にて多くの細胞が死亡した。この結果から、高濃度の teprenone 曝露による細胞毒性のため、細胞の形態変化は認めないが、傷害を受けた細胞からインスリンが漏出した可能性も考えられた。転写レベルでの実験に用いた teprenone は臨床的に胃炎や潰瘍などに対し頻用されている薬剤である。Teprenone を用いた *in vitro* の実験では、細胞の種類は異なるが主に  $1 \times 10^{-6}$  ~  $1 \times 10^{-8}$  M 程度の teprenone 刺激で細胞内 hsp の増加が認められている<sup>12)</sup>。本実験では、通常の実験に用いられるよりも高濃度の teprenone を用いたことは、細胞傷害の可能性が支持される。Teprenone が効果を発現するには、細胞質に存在する HSF-1 を活性化し、活性化され三量体となった HSF-1 が核内の DNA 上流にある HSE へ結合し、下流遺伝子の mRNA 転写を促進するという過程が必要である<sup>12)13)</sup>。HSF-1 の活性化が無効あるいは HSF-1 の HSE への結合が無効な場合は、理論的に全ての細胞でインスリン濃度や SEAP 活性は増加しないと考えられる。高い分泌能力を期待し、内分泌細胞の AtT20 細胞を用いたが、導入遺伝子の種類に有意な関係は認められなかった。Teprenone 刺激が効果を発揮できない原因として、上記の過程に問題がある可能性が考えられる。本実験では下流に接続した遺伝子により teprenone の有効濃度が異なった結果が得られたが、唯一インスリン濃度の増加が確認できた C2C12 細胞での結果が細胞毒性によるものではないと仮定すれば、下流遺伝子の

mRNA 転写促進に問題があると考えられる。その理由は導入遺伝子の種類により至適 teprenone 濃度は異なるためと考察される。

熱刺激の結果、HSE-SEAP 遺伝子を導入した C2C12 細胞や AtT20 細胞ともに、熱刺激 24 時間後に熱刺激なしの群と比較し有意な SEAP 活性の増加を認めたことから、42°C、1.5 時間の熱刺激が mRNA の転写亢進を引き起こしたと考えられた。この実験では、異なった細胞種でも熱刺激が有効であることが確認できた。しかし 3T3-L1 細胞を用いた同様の実験では、熱刺激 24 時間後に SEAP 活性の増加を認めず、熱による転写亢進は検出できなかった。HSE-SEAP 遺伝子を導入した 3T3-L1 細胞では teprenone 刺激にて SEAP 活性の増加を認めているが、熱刺激に反応しなかった原因としては、HSE-insfur 遺伝子を導入した同細胞も、熱刺激による反応を認めていないことから (data not shown)、3T3-L1 細胞自体が熱による傷害を受けた可能性が考えられた。

また insfur 遺伝子を導入した C2C12 細胞と AtT20 細胞に対し上記同様の熱刺激を行った結果、熱刺激後にインスリンを検出することはできず、熱による転写亢進は検出できなかった。この結果からは、導入遺伝子 SEAP とインスリンの違いが考えられた。SEAP はインスリンと比較して、非常に安定したタンパク質であり、その分泌過程も単純である。しかしインスリンは細胞内での産生から、細胞外への分泌にいたるまでの過程はきわめて複雑であり、細胞外へ分泌されたインスリンも、SEAP と比較して不安定である。これらの導入遺伝子の違いより、同様の条件下での熱刺激実験においても SEAP では活性の増加が確認できたが、インスリンは検出感度以下であったと考えられた。各種細胞に対し teprenone 刺激と熱刺激にて実験を行った結果、インスリンが検出感度以下となることが多いため、ベクター pLXSN には既に 3'LTR に polyA signal が付加されているが、target gene であるインスリン遺伝子の下流に mRNA 安定化を目的として polyA signal の付加を行った。AtT20 細胞へ polyA signal を付加した insfur 遺伝子を導入し、作製した細胞に熱刺激を行った結果、熱刺激前に検出感度以下であったインスリンは、熱刺激後に検出可能

となったが、熱刺激を行った群では熱刺激を行わない群よりも培地中インスリンは抑制された。この結果から熱刺激がインスリン分泌に対し悪影響を与えた可能性が考えられたため、同様の AtT20 細胞を用いて  $1 \times 10^{-5}$  M 濃度の teprenone 刺激を行った。しかし teprenone 刺激を行った群では、熱刺激と同様に培地中インスリンが抑制された (data not shown)。なぜ polyA signal を付加したことで、熱刺激や teprenone 刺激によりインスリン分泌を抑制する結果となるのかは不明である。本実験では恒久的な遺伝子導入細胞を作製するためにレトロウイルスベクターを用いたが、hsp プロモーターを介して下流遺伝子の活性化を評価するための実験には、LTR を持たない一般的な CMV プロモーターを持つベクターを用いて同様のプラスミドを構築し、さらなる条件の検討が必要であると考えられる。

開口放出レベルでのインスリン調節性については Table 2 に示したように、AtT20 細胞にインスリン遺伝子と GLP-1R 遺伝子を導入した細胞は、GLP-1 刺激にて刺激 120 分後に培地中インスリン濃度の増加を認め、GLP-1 が GLP-1R に結合し細胞内の cAMP 濃度を上昇させ、インスリン分泌を促したと考えられた。一方 C2C12 細胞を用いた実験では GLP-1 刺激を加えても培地中インスリンは検出感度以下であった。この結果については、実験に使用した AtT20、C2C12 両細胞の性質の違いに関係していると考えられる。AtT20 細胞はマウス下垂体腫瘍由来の内分泌細胞であり、内分泌装置は発達しており、プロインスリンからインスリンへのプロセッシングに必要な酵素発現も認める。一方で C2C12 細胞はマウス筋芽細胞由来の間葉系細胞であり、インスリン分泌に必要な内分泌装置は通常存在しない。GLP-1R を遺伝子導入し受容体を持つ細胞を作製することが可能でも、分泌能力や分泌過程を有さない細胞では、GLP-1 刺激を行っても有効ではないと考えられた。

本研究結果より、転写レベルでのインスリン分泌調節については、自己の細胞を体外で *ex vivo* 処理したインスリン分泌細胞を体内移植し、teprenone や加温にて分泌を促すことで、インスリンの基礎分泌を少しでも補うことができる可能性

が示された。またこのシステムは自家移植を用いており、移植に伴う拒絶反応の問題も発生しにくいと考えられる。インスリン開口放出レベルでの分泌調節については、食事によって小腸のL細胞から分泌されたGLP-1が、自己の細胞を用いて作製したGLP-1Rを持つインスリン産生細胞を刺激しインスリン分泌を促すことで、インスリン追加分泌による食後高血糖の是正が期待できる。

## V. 結 語

Tissue engineeringにより作製したインスリン産生細胞において、hspプロモーターやGLP-1Rの利用はインスリン分泌に調節性をもたらす可能性があると考えられた。

本稿を終えるにあたり、ご指導、御校閲を賜りました東京慈恵会医科大学DNA医学研究所所長 衛藤義勝教授に謹んで謝意を表すとともに、本研究に御協力下さった同遺伝子治療研究部の諸先生方、東京工業大学大学院生命理工学研究科 小島英理助教授、柳田保子講師に深く感謝いたします。

なお、本研究は第46回日本糖尿病学会総会(2004年5月横浜)、第2回1型糖尿病研究会(2004年10月山梨)において発表した。

## 文 献

- 1) Yamasaki K, Sasaki T, Nemoto M, Eto Y, Tajima N. Differentiation-induced insulin secretion from nonendocrine cells with engineered human proinsulin cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 361-5.
- 2) Sasaki T, Fujimoto K, Sakai K, Nemoto M, Nakai N, Tajima N. Gene and cell-based therapy for diabetes mellitus: endocrine gene therapeutics. *Endocr Pathol* 2003; 14: 141-4.
- 3) Easom RA. Beta-granule transport and exocytosis. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 253-66.
- 4) Fehmann HC, Goke R, Goke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr Rev* 1995; 16: 390-410.
- 5) Gromada J, Holst JJ, Rorsman P. Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Pflugers Arch* 1998; 435: 583-94.
- 6) Steiner DF, Rouille Y, Gong Q, Martin S, Carroll R, Chan SJ, et al. The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes Metab* 1996; 22: 94-104.
- 7) Smeekens SP, Montag AG, Thomas G, Albigesrizo C, Carroll R, Benig M, et al. Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC2, and PC3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8822-6.
- 8) Thorens B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8641-5.
- 9) Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 Complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 1998; 94: 471-80.
- 10) American Diabetes Association. Continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetes Care* 2002; 25 (Suppl 1): S 116.
- 11) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-8.
- 12) Hirakawa T, Rokutan K, Nikawa T, Kishi K. Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 1996; 111: 345-57.
- 13) Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 1998; 12: 3788-96.
- 14) Davies EL, Shennan KI, Docherty K, Bailey CJ. Expression of GLUT2 in insulin-secreting AtT20 pituitary cells. *J Mol Endocrinol* 1998; 20: 75-82.
- 15) Motoyoshi S, Shirohani T, Araki E, Sakai K, Kaneko K, Motoshima H, et al. Cellular characterization of pituitary adenoma cell line (AtT20 cell) transfected with insulin, glucose transporter type2 (GLUT2) and glucokinase genes: insulin secretion in response to physio-

- logical concentration of glucose. Diabetologia 1998; 41: 1492-501.
- 16) Suda T, Katoh M, Hiratsuka M, Takiguchi M, Kazuki Y, Inoue T, et al. Heat-regulated production and secretion of insulin from a human artificial chromosome vector. Biochem Biophys Res Commun 2006; 340: 1053-61.
- 17) Wu L, Nicholson W, Wu C-Y, Xu M, McGaha A, Shiota M. et al. Engineering physiologically regulated insulin secretion in non- $\beta$  cells by expressing glucagons-like peptide 1 receptor. Gene Ther 2003; 19: 1712-20.