

|             |                                                                                                                                               |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | うえ の ひろ ゆき<br>上 野 宏 行                                                                                                                         |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                     |
| 学 位 記 番 号   | 医 博 第 2924 号                                                                                                                                  |
| 学位授与の日付     | 平 成 18 年 1 月 23 日                                                                                                                             |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                       |
| 研 究 科 ・ 専 攻 | 医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻                                                                                                                           |
| 学 位 論 文 題 目 | Nestin - Positive Cells in Adult Pancreas Express Amylase and<br>Endocrine Precursor Cells<br>(成体の膵臓におけるネスチン陽性細胞はアミラーゼを発現している膵内分<br>泌前駆細胞である) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 中 尾 一 和      教 授 野 田      亮      教 授 横 出 正 之                                                                                     |

### 論 文 内 容 の 要 旨

糖尿病治療は正常血糖の維持を目指しており、膵島移植は最も優れた治療法の一つだが、ドナー不足は深刻である。そこで膵内分泌の前駆細胞の同定が求められている。

神経幹細胞マーカーであるネスチンは膵臓においてもその発現が認められる。申請者は、ネスチン遺伝子のプロモーターによって発現調節される蛍光蛋白 EGFP (enhanced green fluorescent protein) 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (Tg マウス) を用いて膵島以外の組織も含めて、EGFP 陽性細胞の膵内分布と遺伝子発現を fluorescence activated cell sorting (FACS) 及び蛍光免疫染色を行うことによって、ネスチン陽性細胞の解析を行った。

Tg マウスの膵臓をコラゲナーゼ法で処理し、濃度勾配に従って膵島分画と膵島外分画へと分別し、それぞれの分画を個々の細胞へ分散した上で FACS により EGFP 陽性細胞を分取した。その細胞から mRNA を抽出し cDNA 合成後、real time RT-PCR 法で様々な遺伝子発現を検討した。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて EGFP 陽性細胞の膵内分布を検討した。

FACS では EGFP 強陽性の細胞は膵島外組織に多数認められた。膵島には EGFP 強陽性の細胞は無く、中等度陽性の細胞しか認められなかった。FACS で回収した細胞を用いて、インスリン染色を行ったところ、EGFP 中等度陽性の細胞群は強く染色されたが、EGFP 強陽性群と陰性群では全く染色されなかった。定量的 RT-PCR 法では、EGFP 強陽性群ではネスチンの発現とともに、膵外分泌細胞マーカーであるアミラーゼ、p48 が強発現、膵内分泌細胞マーカーであるインスリン-1、グルカゴンなどが中等度発現を認めた。また、EGFP 中等度陽性群では、ネスチンの発現はなく、膵内分泌細胞マーカーの強発現が確認された。さらに、EGFP 陰性群では膵管マーカーである CK-19 の強発現が確認され、膵内・外分泌細胞マーカーの発現は全く認められなかった。マウスの週齢に分けて、EGFP 陽性細胞の膵臓における割合を FACS で測定した。すると、週齢が小さいと EGFP 陽性細胞は 7% 程度であったが、週齢が進むにつれ、陽性細胞の割合は徐々に減少し、2% 程度まで低下した。次に、抗 EGFP 抗体を用いた蛍光免疫染色を行ったところ、膵島ではなく膵島外分画の、特に外分泌領域から多数の EGFP 陽性細胞が確認された。また、膵島形成前のマウス胎仔では膵管を形成する細胞の一部に EGFP 陽性細胞が多数確認された。以上のことから、ネスチン陽性細胞は膵内分泌細胞へ分化する膵内分泌前駆細胞と考えられた。すなわち、アミラーゼとネスチンの mRNA が発現している EGFP 強陽性群が、分化とともにアミラーゼやネスチンの発現が消失し、EGFP 中等度陽性の細胞群へと移行する。同時にインスリンなどの膵内分泌系の mRNA を発現し、内分泌細胞へ分化すると考えられた。

以上のことから、ネスチン陽性細胞は外分泌領域に存在し、膵外分泌のマーカーを発現している膵内分泌前駆細胞であることが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

糖尿病治療は正常血糖の維持を目指しており、膵島移植は最も優れた治療法の一つだが、ドナー不足は深刻である。そこで膵内分泌前駆細胞の同定が求められている。

申請者は、神経幹細胞マーカーであるネスチンに注目し、ネスチン遺伝子のプロモーターに発現調節される蛍光蛋白 EGFP 遺伝子を組込んだトランスジェニックマウスを用いて、EGFP 陽性細胞の膵内分布と遺伝子発現を FACS 及び蛍光免疫染色を行い、膵臓のネスチン陽性細胞を解析した。

FACS と抗 EGFP 抗体を用いた免疫染色で EGFP 強発現（H 群）の細胞は膵島外組織に多数認めた。膵島では EGFP 中等度発現（M 群）の細胞しか認めなかった。定量的 RT-PCR では、H 群にネスチンと膵外分泌マーカーの強発現、膵内分泌マーカーの中等度発現を認めた。M 群ではネスチンを発現せず、膵内分泌マーカーの強発現を認めた。更に膵島形成前のマウス胎仔で膵管様細胞の一部に EGFP 陽性細胞を多数認め、成体膵での割合は高週齢ほど減少した。すなわち、アミラーゼとネスチンを発現する H 群が、分化に従い発現が消失し、M 群へ移行する。同時にインスリンを発現し、内分泌細胞へ分化すると考えられた。以上より、ネスチン陽性細胞は外分泌領域に存在し、膵外分泌のマーカーを発現している膵内分泌前駆細胞であると判明した。

以上の研究は、膵前駆細胞の解明に貢献し、糖尿病の再生・細胞移植医療に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年11月29日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。