

氏 名	きのした なおこ
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2381 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 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	医学研究科分子医学専攻
学位論文題目	REGULATION OF CELL PROLIFERATION USING TISSUE ENGINEERING IN MIN6 CELLS. (組織再生工学を使った MIN6 細胞の細胞増殖の調節)
論文調査委員	(主 査) 教授 清水 慶彦 教授 笹井 芳樹 教授 今村 正之

論 文 内 容 の 要 旨

組織再生工学を使った MIN6 細胞の細胞増殖の調節

膵ラ島移植の克服すべき最大の問題は、臓器・細胞移植一般に言えるドナー不足であるが、この点を解決するために、ドナーとしてヒト細胞を使用する以外に組織再生工学により修飾をほどこした異種動物細胞や人工臓器を使う方法が検討されている。今回、膵ラ島移植のドナー源としてインスリンプロモーター下に SV40T 抗原を発現させたトランスジェニックマウスから得た正常 β 細胞に類似したグルコース反応性インスリン分泌能を有する細胞株 MIN6 に着目した。MIN6 は細胞株であるが故に、豊富なドナー源となり得るが、一方で移植後に腫瘍を形成する可能性があるという問題点をもつ。MIN6 の腫瘍性増殖を抑えるために MIN6 細胞の球状型を作製し、球状型 MIN6 に細胞外マトリクス成分を添加することによりグルコース反応性インスリン分泌能の維持をはかり、さらに宿主の免疫系からの隔離作用を有するアガロースビーズへの包埋を行なった。(方法) MIN6 細胞を非吸着性培養皿上で三次元培養し球状型 (SMIN6) を作製したのち、直径・生細胞数の経時変化・グルコース反応性インスリン分泌を測定した。また、培養液中に 5 段階の濃度 (25%, 6.25%, 1.56%, 0.39%

Fig. 1

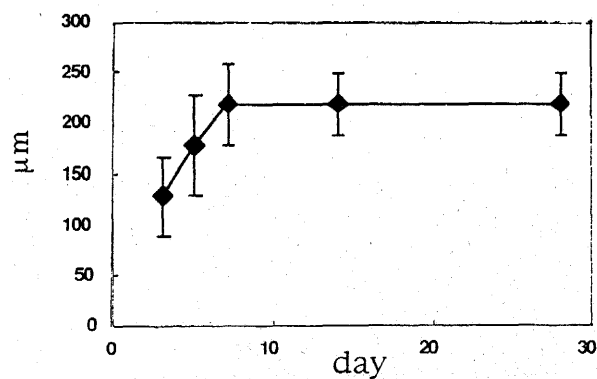
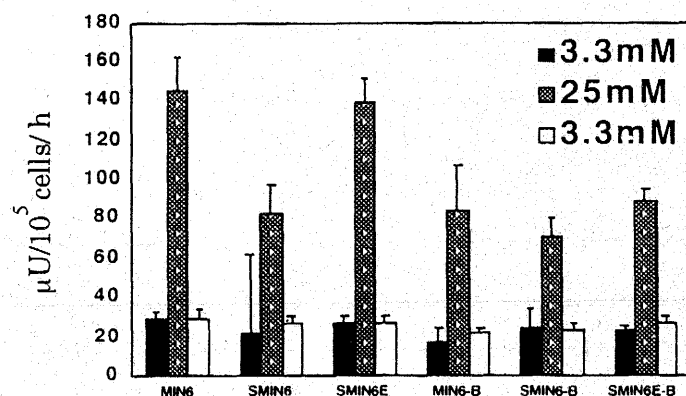


Fig. 2



, 0.097%) の細胞外マトリクス成分を添加し同様の方法で球状型の作製を試みたところ, 0.39%, 0.097%の細胞外マトリクスを添加したときに球状型 (SMIN6E) が形成されたので, SMIN6 と同様の測定を行った。さらに MIN6, SMIN6, SMIN6E をアガロースビーズで包埋した MIN6-B, SMIN6-B, SMIN6E-B でグルコース反応性インスリン分泌を測定した。(結果) SMIN6 と SMIN6E, SMIN6-B と SMIN6E-B の間に形態上の差異を認めなかった。MIN6 細胞播種後 1 日目で球状型が形成され始め, 直径は次第に増加したのち 7 日目以降 $220 \pm 40 \mu\text{m}$ と定常に達した。(Fig. 1) 生細胞数は, WST-1 アッセイで測定したところ 7 日目以降ほぼ 10^3 であった。腫瘍性増殖抑制効果が得られた可能性がある。

グルコース反応性インスリン分泌については, SMIN6 では, 反応性は MIN6 よりも有意に劣っていた ($p < 0.05$)。SMIN6E では, 0.39%の細胞外マトリクスを添加したときに MIN6 に匹敵する反応性が見られた。アガロースビーズで包埋した場合, MIN6-B, SMIN6E-B では各々 MIN6, SMIN6E に比べて反応性は劣っていた。(Fig. 2) (考察) MIN6 細胞は組織再生工学を用い球状型 (SMIN6) にすることで, 腫瘍性増殖抑制効果を得られた。グルコース反応性インスリン分泌については, SMIN6 の反応性は MIN6 よりも有意に劣っていた ($p < 0.05$) が, 細胞外マトリクスを添加することで, MIN6 に匹敵する反応性を維持できるようになった。さらに, 宿主免疫系からの隔離作用のあるアガロースビーズに包埋することも可能であった。SMIN6-B, SMIN6E-B のグルコース反応性インスリン分泌を MIN6 に匹敵させるためには今後さらなる検討が必要である。MIN6 細胞に組織再生工学を用いた本研究は糖尿病の移植治療に β 細胞株を利用できる可能性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

糖尿病の治療法としてインスリン分泌細胞の移植が試みられている。ヒト膵臓の入手が限られていることから, 異種動物の膵臓あるいは膵ラ島細胞株が移植源として有用である。膵臓ラ島の正常 β 細胞類似のグルコース反応性インスリン分泌能を持つマウス細胞株 MIN6 は膵島細胞移植のドナー源として最も有力な候補である。しかし, 臨床応用のためには MIN6 細胞株の腫瘍性増殖を制御する必要がある。申請者は三次元培養により球状に集合した MIN6 細胞の作成法を確立し, 腫瘍性増殖を制御できることを示した。さらに, グルコース反応性インスリン分泌能の維持のために細胞外マトリクス成分を添加することが有効であることを明らかにした。また, 球状型の MIN6 細胞集団をアガロースマイクロビーズに包埋できることを示し, 異種移植による拒絶反応を回避できる可能性を示した。以上の研究は, 組織再生工学による細胞増殖の調節に貢献し, β 細胞株を移植源として用いる糖尿病の細胞移植治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13年2月26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。