

研究者：清川 裕貴（所属：朝日大学 小児歯科学分野）

研究題目：乳歯を用いた小児の糖尿病への新規アプローチ

目的：

1型糖尿病（Type 1 Diabetes：T1D）は膵臓のインスリン産生細胞（ β 細胞）が自己免疫によって破壊されてしまい、インスリンが欠乏することにより細胞へのグルコース取込みが阻害され、高血糖状態を引き起こす疾患である。その原因は遺伝子異常やウイルス感染といわれているが、現在では原因の特定には至っておらず、また思春期における罹患率が高いことから小児慢性特定疾病に分類される。T1Dにより高血糖状態が継続することにより、腎臓、神経、網膜、心臓の機能が低下してしまい、歯科的には歯周病の増悪を引き起こすため、全身状態への影響が大きい。T1Dは世界的にも増加傾向にあり、現在では900万人にも及ぶ患者数があるにも関わらず、その治療法はインスリン注射による血糖値コントロールという対症療法が主流であり、根治的療法が未だに確立していない疾患である。世界的にも β 細胞の再生研究が活発に行われているが、未だに有効な方法は確立されていない。

そこで本研究では、T1D患者乳歯歯髄細胞を用いてiPS細胞を作製し、さらに膵臓方向への分化を一步進めた人工的膵幹細胞（iTSC-P）を作製し、安全な β 細胞再生とT1D根治的療法開発を行うことを目的とする。

対象および方法：

まずT1D患者乳歯歯髄細胞（T1D-HDDPC）に対して初期化遺伝子（Oct3/4, SOX2など）を遺伝子導入することによりiPS細胞を作製する。またiPS細胞の培養時に未分化転換培地（LIF, Forskolinなどを含む）を用いることによって、さらに未分化状態を進めた状態であるナイーブ型であるNaïve Stem Cells（T1D-NSC）を作製する。さらにT1D-NSCに対して、分化培地を段階的に交換しながら培養を行い、膵臓方向への分化を段階的に進めることによって、膵臓細胞の特性と幹細胞の特性を併せ持つT1D-iTSC-Pを作製する。またRT-PCRによる幹細胞マーカーと膵臓マーカーの遺伝子解析、免疫染色によるインスリン抗体などの確認を行い、T1D-iTSC-Pの特性について検討を行う。

さらに作製したT1D-iTSC-PをT1D発症モデルマウスの膵臓へと移植を行うことによって、その腫瘍形成リスクの評価と β 細胞の再生について組織学的に解析を行う。また経時的にマウスの血糖値を測定することで、T1Dを実際に改善可能であるかについて検討を行う。

結果および考察：

これまで計画通りに、T1D-HDDPCからT1D-iTSC-Pの作製に成功しており（図1）、幹細胞マーカー（Oct3/4, SOX2, Nanog）と膵臓マーカー（Insulin, PDX1）の発現を遺伝子工学的に確認している（図2）。また免疫染色により、インスリンの局在について確認を行った（図3）。RT-PCRと免疫染色の結果から、今回作製したT1D-iTSC-Pは未分化性とインスリン分

泌特性を併せ持っていることが考えられた。

今後の予定として、作製した T1D-iTSC-P を T1D 発症モデルマウスに移植することにより、血糖値の改善や β 細胞の再生について、*in vivo* における組織学的解析を行っていく予定である。

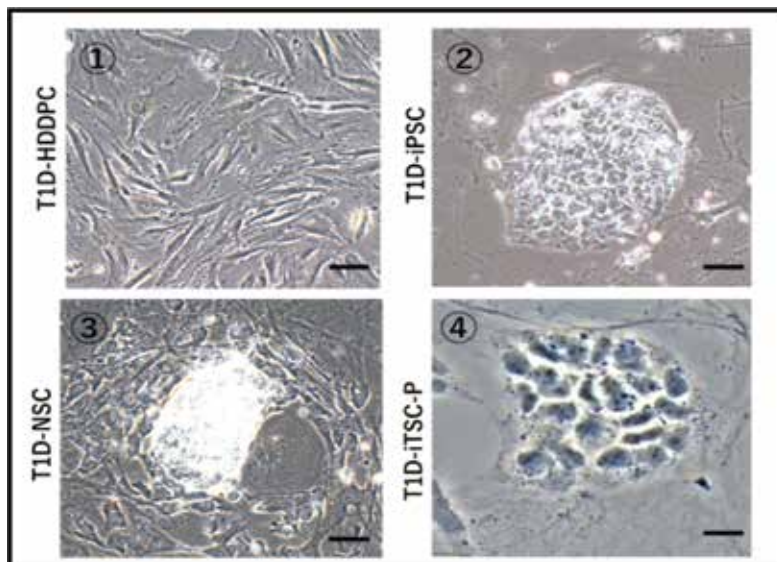


図1 T1D-iTSC-P の形態

T1D-HDDPC は単層であったが (①)、T1D-iPSC はコロニー状の細胞群を示し (②)、T1D-NSC は未分化状態の強いドーム状のコロニーを示した (③)。さらに、T1D-iTSC-P では膵島様のコロニーが観察された (④)。Bar : 100 μ m

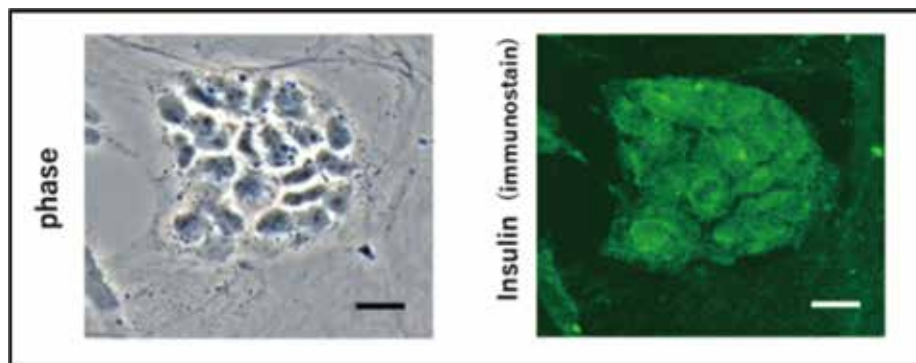


図2 RT-PCR

T1D-HDDPC は幹細胞マーカー (OCT3/4、SOX2、NANOG) をわずかに発現していたが、T1D-iPSC は幹細胞マーカーを発現していたが、膵臓マーカー (インスリン、PDX1) は発現していなかった。一方、T1D-iTSC-P 細胞は幹細胞マーカーと膵臓マーカーの両方を発現しており、T1D-iTSC-P 細胞は膵臓幹細胞様細胞であることが示唆された。

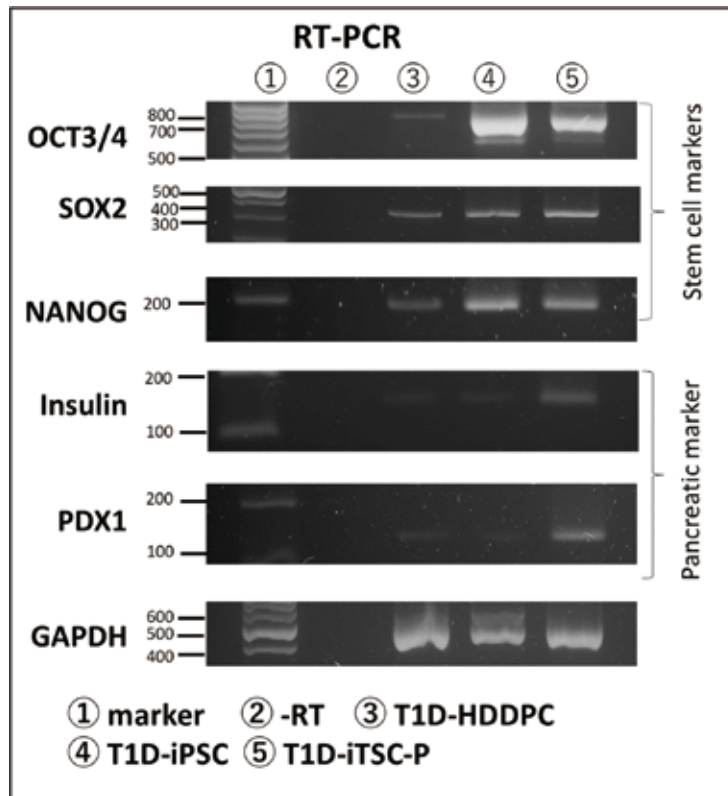


図3 T1D-iTSC-P の免疫染色
T1D-iTSC-P のコロニーは、小島様細胞形態と一致するインスリン抗体反応を示した。Bar : 100 μ m

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

- ・第62回日本小児歯科学会口頭発表「乳歯歯髄組織の初代培養における新規培養方法の開発」
予定
- ・2024年台湾小児歯科学会 ポスター発表 予定