

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790632

研究課題名（和文） 膵幹細胞の未分化維持機構の解明

研究課題名（英文） Characterization of mouse pancreatic stem cells

研究代表者

奥野 正顕 (OKUNO MASAOKI)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：40359790

研究成果の概要：

幹細胞はさまざまな組織に存在し、個体維持のために新たな細胞を供給することが報告されている。しかし、膵幹細胞の存在については、未だ統一的な見解が得られていない。研究代表者は成体マウスの膵組織から一年以上に渡り旺盛に増殖し続ける細胞を単離する方法を確立した。Gene Chip により遺伝子発現を網羅的に解析した結果、この細胞は複数の転写抑制因子を発現していることが明らかとなった。これら転写抑制因子の発現を siRNA により低下させたところ、膵細胞特異的遺伝子群の発現誘導が認められた。以上の結果は、膵幹細胞が複数の転写抑制因子の働きにより未分化状態で維持されていることを示唆する。今後、生体内でその抑制機構を解除することができれば膵細胞の再生医療につながるものと期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：移植・再生医療 / 再生医学 / 遺伝子発現制御 / 発生分化 / 転写抑制因子

## 1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞とは成体の組織中に存在し、細胞分裂によって新たな幹細胞を生み出す自己複製能と複数の異なる種類の細胞に分化する多分化能を併せ持つ未分化な細胞

のことである。血液、皮膚、腸上皮などさまざまな組織において幹細胞が存在し、個体維持のために新たな細胞を供給することが知られている。一方、膵臓における組織幹細胞の存在については、未だ議論が多く、コンセンサスは得られていない。このような状況下、

2004年にMeltonらのグループは、成体マウスの膵細胞は膵幹細胞からの分化によって維持されるのではなく、細胞自身の複製によって維持されることを Genetic lineage tracing の手法を用いて証明することに成功した。これは、成体膵に幹細胞が存在することを否定するものではないにも関わらず、この発表を契機に成体膵に幹細胞が存在すること自体を疑う考えが数多く見られるようになった。しかしながら、研究代表者は、膵幹細胞は生体内に存在するが、積極的に未分化状態を維持する機構が存在するため、そのほとんどが休止状態にあると推測している。

## 2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでに成体マウスの膵腺房細胞が分化転換によって膵細胞と類似したインスリン分泌特性を有する細胞に変化できることを明らかにしており、その分化転換には EGF シグナルの活性化が必須であることを示すなどメカニズムの一端を解明してきた。さらに、糖尿病患者自身の腺房細胞を *in vitro* で分化誘導した後、体内に戻す自家移植治療につながる基礎的な検討として、一型糖尿病モデル動物からインスリン分泌細胞を誘導することが可能であることを明らかにしている。

研究代表者らは、これらの研究を行う過程で成体マウスの膵腺房細胞を含む膵外分泌画分の細胞を種々の条件で培養したところ、一定のスピードで増殖し続ける小型で均一な細胞を再現性良く単離することに成功した。本研究では増殖能、分化能、遺伝子発現プロファイリングを解析することにより、この細胞が膵幹細胞のモデルとして有用であることを見出した。さらに、膵幹細胞の未分化維持機構とくに転写抑制因子の果たす役割について検討した。

## 3. 研究の方法

膵幹細胞様細胞の増殖能について検討するために、細胞の倍加時間ならびにテロメア長を測定した。さらに、Gene Chip を利用して、膵幹細胞様細胞と膵島との間で遺伝子発現を網羅的に比較した。siRNA を用いて、膵幹細胞様細胞で強く発現することが判明した転写抑制因子の発現を低下させた。それに伴う膵内分泌細胞特異的転写因子や膵細胞特異的機能分子の発現変化を定量 RT-PCR で解析することによって、膵幹細胞の未分化維持における転写抑制因子の役割を明らか

にすることを試みた。

## 4. 研究成果

研究代表者らによって成体マウスの膵組織から単離された膵幹細胞様細胞（写真）は小型で均一な形態を維持したまま一年以上に渡り一定のスピードで増殖し続けた。細胞の倍加時間は約48時間であった。さ



らに、テロメア長を比較すると、ES細胞と同等かやや短く、マウス尻尾のそれよりは長いことが明らかとなった。

RT-PCRによる遺伝子発現解析を行った結果、この細胞は膵幹細胞としての重要な特性を有することが明らかとなった。すなわち、膵発生初期段階と非常に近い転写因子発現プロファイル (Pdx1, HNFs, Sox17などの発現が認められた。)を示し、且つ、膵内分泌ホルモンを全く発現しないことが見出された。旺盛な増殖力を持ち、遺伝子発現プロファイルが膵発生初期段階と非常に近似したこの細胞は膵幹細胞の有用なモデルであると考えられる。

膵幹細胞様細胞を膵細胞へと分化誘導することを試みた。膵幹細胞様細胞では発現せず成熟細胞で発現する複数の転写因子 (Isl-1, MafA, Ngn3, NeuroD, Pax4, Pax6, Hlx9, Nkx2.2, Nkx6.1など)を導入しても、膵内分泌細胞特異的分子の発現がわずかに誘導されるのみであった。機能的により成熟した細胞にまで分化誘導することが困難であった原因として、膵幹細胞には積極的に未分化状態を維持する機構が存在すると推定した。

Gene Chip を利用して、膵幹細胞様細胞と膵島との間で遺伝子発現を網羅的に比較した。その結果、膵幹細胞様細胞で多数の転写抑制因子が発現していることが明らかとなった。これらの中には膵幹細胞の未分化維持に関わる転写抑制因子が含まれている可能性が推察される。

膵幹細胞様細胞では発現するが、膵島では発現しないことが判明した転写抑制因子群の発現を siRNA により低下させたところ、インスリン産生、グルコース応答性、開口分泌などに関わる膵細胞特異的機能分子群の発現誘導が認められた。従って、先に述べたように膵幹細胞には転写抑制因子による未分化状態維持機構が存在することが示唆さ

れた。

これまで、膵細胞の発生・分化に関する研究は、遺伝子改変マウスを用いた転写因子の機能解析を中心に行われてきた。その知見を基に数多くの研究者が種々の細胞から膵

細胞への分化誘導を試みたが、十分な成績は得られていない。本研究において、転写因子ではなく転写抑制因子に主眼を置き、膵幹細胞が積極的に未分化状態を維持するメカニズムについて検討した。このような試みはこれまでに無く、独創的であると考えられる。さらに、転写抑制因子による未分化維持機構を解除することができれば、生体内外で膵幹細胞から膵細胞を再生する技術の開発につながるものと予想される。従って、本研究は、膵細胞再生医療の基盤構築に大きな貢献をもたらすことが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

T. Takahashi, M. Okuno, T. Okamoto, T. Kishi: NADPH-dependent coenzyme Q reductase is the main enzyme responsible for the reduction of non-mitochondrial CoQ in cells, *Biofactors*, 32, 59-70 (2008) 査読有

N. Ishizuka, K. Minami, A. Okumachi, M. Okuno, S. Seino: Induction by NeuroD of the components required for regulated exocytosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354, 271-277 (2007) 査読有

[学会発表](計5件)

藤田 翔、大森 義朗、Ladda Chuworachet、Prangthip Pattaneeya、奥野 正顕、岡本 正志:「還元型コエンザイム Q10 経口摂取時のラット生体内挙動」、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26 日(木)~28 日(土)、於 国立京都国際会館(京都)

T. Okamoto, A. Kettawan, K. Chitsopa, M. Okuno, T. Takahashi, R. Kongkachuichai, and T. Kishi: 「Protective effects of Coenzyme Q10 against oxidative stress induced by aerobic exercise」、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26 日(水)~28 日(金)、於 パシフィコ横浜(横浜)

奥野 正顕、A. Kettawan, C. Kunthida、高橋 隆幸、紀氏 健雄、岡本 正志:「酸化型ならびに還元型コエンザイム Q10 の生体内挙動の異同」、日本コエンザイム Q 協会第 5 回研究会、2008 年 1 月 25 日(金)、於 東京工科大学片柳研究所棟(東京)

T. Okamoto, A. Kettawan, C. Kunthida, M. Okuno, T. Takahashi, K. Watabe, and T. Kishi: 「Distribution of reduced form of coenzyme Q homologues in dietary foods and health supplements」、The 5<sup>th</sup> Conference of the International Coenzyme Q10 Association, 2007 年 11 月 9 日(金)~12 日(月)、於 神戸学院大学ポートアイランドキャンパス(神戸)

A. Kettawan, C. Kunthida, M. Okuno, T. Takahashi, R. Kongkachuichai, P. Sungpuag, T. Kishi, and T. Okamoto: 「Protective effects of Coenzyme Q10 against oxidative stress induced by aerobic exercise」、The 5<sup>th</sup> Conference of the International Coenzyme Q10 Association, 2007 年 11 月 9 日(金)~12 日(月)、於 神戸

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

奥野 正顕 (OKUNO MASA AKI)  
神戸学院大学・薬学部・助教  
研究者番号: 40359790

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者