

平成 21年4月2日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成19年度～平成20年度

課題番号：19790646

研究課題名（和文）Notch シグナルによる膵内分泌細胞発生機構の解明と再生医療への応用

研究課題名（英文）Revealing the role of Notch signaling in pancreatic development and its application for regenerative medicine

研究代表者 藤倉 純二 (FUJIKURA JUNJI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70378743

研究成果の概要：

膵発生の特に初期において、Notch/Rbp-j シグナルが Pdx1 発現を維持しながら膵幹細胞プールを維持していることを明らかとした。シグナルのリガンドとしては Notch2 の意義は乏しいことや、膵発生・再生関連転写因子と Notch/Rbp-j/Hes1 シグナルとの間の相互作用の存在も明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,700,000	0	1,700,000
平成20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：医歯薬学

科研ひの分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：膵臓・Notch シグナル・Rbp-j・Ptf1a (p48)・糖尿病・ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、網膜症・腎症・神経障害に加え、心血管系合併症をもたらす基礎疾患である。網膜症・腎症・神経障害については、HbA1c 6.5%未満を維持することが必要とされている(熊本スタディ)が、心血管系合併症をもたらす動脈硬化はより早期の耐糖能異常の段階でも生じてしまう。現在、様々な種類の薬物治療が行われているが、我が国における薬物治療を受けている糖尿病患者のHbA1cは平均7.26%と合併症を阻止するにはほど遠い状況である。また、現在までの1型・2型糖尿病治療に関する大規模スタディでは、血糖を低下させると重症低血糖の頻度が極端に上昇することが示されている(DCCT, UKPDS)。この様に薬物治療では健常者同様のインス

リン分泌パターンを完全に模倣することはできず、厳格な血糖コントロールを達成するためには、正常なグルコース感受性インスリン分泌能を維持した膵β細胞の移植が有用と考えられる。

膵島移植により、1型糖尿病患者においてもインスリン注射を中断できる可能性があることが報告されている。しかし、膵島のviabilityは低いため複数回の移植を必要とすることが多い。これは、一人の糖尿病を治療させるために複数のドナーを必要とすることを意味し、必然的にドナー不足が深刻な問題となる。ドナー不足の為に、膵β細胞を胚性幹(ES)細胞や他の細胞から分化させる試みが多く行われている。しかし、その殆どは再現性に乏しかったり、不適当な実験結果

の解釈によったりするものである。これらの事例からは、膵再生医療に必要な膵分化過程の知見については、未だ不明な部分が多く、本来の発生過程をより詳細に解明し、それを着実に応用してこそ膵再生医療が実現するものと考えられた。

2. 研究の目的

Notchシグナルは神経・皮膚・血液系を初めとして、多くの組織で、その分化制御や未分化状態の維持に働いており、膵でもNotchシグナルが膵内分泌細胞分化に必須な役割を果たしていることが予想されていた。ほ乳類におけるNotchシグナルはリガンドが5種類、レセプターが4種類知られている。全てのNotchシグナルはシグナル伝達分子であるRbp-Jを介するため、Rbp-Jの膵における意義を解明することは膵における全Notchシグナルの意義を見出すことに他ならない。

膵β細胞の発生や機能については、マスター遺伝子といわれるPdx1, Ptf1aを始めとして、Neurogenin3, NeuroD, Pax4, Pax6, MafAなど数多くの転写因子が関与していることが知られている。その中でNeurogenin3はそのノックアウトマウスにおいて膵内分泌細胞が全て欠如する。Notchシグナルは神経前駆細胞においてNeurogenin発現を抑制し幹細胞プールを増やす働きが知られている。

我々は以上の背景から膵におけるNotchシグナルの重要性を想定し膵特異的Rbp-j欠損マウスを作成した。このマウスの膵は、下の写真の様に膵前駆細胞プールが減少するために最終的に内分泌・外分泌の低形成を伴って生まれ、インスリン分泌低下型糖尿病を来す。

今後、膵幹細胞を維持する際に、Notch/Rbp-jシグナルをもたらす上流、及びシグナル下で作用する下流の分子を逐一明らかにしながら、膵発生再生医療を実現させたいと考えている。

3. 研究の方法

①Notchシグナルが作用するタイミングについての検討

報告した膵特異的Rbp-j欠損マウスは、Pdx1プロモーターによりRbp-jが欠失するモデルである。他に、膵特異的ではあるがPdx1より後期に発現するPtf1aを用いたPtf1a.creマウスを用いて、膵発生のより後期におけるNotchシグナルの意義を検討することとした。

②膵発生に必要なNotch受容体の種類についての検討

Notch2の発現は胎生期より膵管様細胞で認められ終生持続する。膵管様構造には膵幹細胞が存在するとされている。Notch2 floxed

マウスを用いて、Rbp-j同様に膵特異的Notch2欠損マウスを作成し膵において働くNotch受容体の種類について検討を行った。実際に主要な役割を担っているNotch受容体の種類が判明すれば、合成リガンド作成等の創薬の近道となると考えられる。

③膵発生におけるNotchシグナル下流の分子機構の解明

報告した膵特異的Rbp-j欠損マウスの胎児膵においてはPdx1の発現が非常に低下していることを見出した。Notch/Rbp-jシグナルと膵関連転写因子との相互作用を検討するために、マウス由来膵上皮細胞株へ、Notch/Rbp-jシグナル関連遺伝子（Rbp-j, Rbp-L, Hes1）及び膵発生関連転写因子（Pdx1, Ptf1a, Neurogenin3）を発現するベクターをトランスフェクションし、薬剤選択後蛋白を採取し、Westernプロットにより各々の蛋白量の変化を検討した。

4. 研究成果

①Ptf1a.creによる膵特異的Rbp-j欠損マウスの作成と解析

Pdx.creより約1日遅く膵にてCreを発現するPtf1a.creマウスによりRbp-jのコンディショナルノックアウトマウスを作成した。驚くべきことにわずか1日の欠失の遅れにより新生児期の膵は小さいもののその後数週間のうちに膵臓は対照と同程度の大きさにまで成長し、外分泌・内分泌機能共に低下をきたさなかった。以上の解析から、Rbp-jが決定的に重要な役割を果たすのは膵発生の非常に早期であることが示唆された。

②Pdx.creによる膵特異的Notch2欠損マウスの作成と解析

胎生期膵管細胞で発現しているNotch2をPdx.creトランスジェニックマウスを用いて膵特異的にノックアウトしたマウスを作成した。Notch1~4全てのco-factorとして働くRbp-jの欠損は内分泌細胞の早期分化と最終的な膵低形成、インスリン分泌低下をもたらしたが、Notch2のみの膵特異的ノックアウトマウスにおいては同様のフェノタイプは認められなかった。以上の解析から、Notch2を介するシグナルは膵発生や膵内分泌細胞機能における作用としては不可欠なものではないことが示唆された。

③Notch/Rbp-jシグナルと膵関連転写因子との相互作用

Rbp-jはRbp-LやHes1の発現を増加させた。Rbp-LはHes1の発現を増加させたがRbp-jの発現に変化はなかった。Hes1はRbp-jの発現を低下させるとともにRbp-Lの発現を上昇させた。Pdx1はRbp-jの発現を上昇させたが、

Rbp-L や Hes1 の発現を低下させた。Ptf1a は Rbp-j と Pdx1 の発現を低下させ、Rbp-L と Hes1 の発現を増加させた。Neurogenin3 は Rbp-j の発現を低下させ、Rbp-L と Hes1 の発現を増加させた。

以上の結果から、膵細胞において、Notch/Rbp-j シグナルと膵発生関連転写因子との間に相互作用があることが示唆され、膵発生再生医療を可能にする上で重要な知見であると考えられた。

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6件)

- ① Takayama I, Miyazaki S, Tashiro F, Fujikura J, Miyazaki J, Yamato E. Pdx-1-independent differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-expressing cells. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008 Feb;79(2):e8-10. 査読あり
- ② Fujikura J, Hosoda K, Kawaguchi Y, Noguchi M, Iwakura H, Odori S, Mori E, Tomita T, Hirata M, Ebihara K, Masuzaki H, Fukuda A, Furuyama K, Tanigaki K, Yabe D, Nakao K. Rbp-j regulates expansion of pancreatic epithelial cells and their differentiation into exocrine cells during mouse development. *Dev Dyn.* 2007 Oct;236(10):2779-2791. 査読あり
- ③ Arai N, Masuzaki H, Tanaka T, Ishii T, Yasue S, Kobayashi N, Tomita T, Noguchi M, Kusakabe T, Fujikura J, Ebihara K, Hirata M, Hosoda K, Hayashi T, Sawai H, Minokoshi Y, Nakao K. Ceramide and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase are two novel regulators of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity in cultured preadipocytes. *Endocrinology.* 2007 Nov;148(11):5268-77. 査読あり
- ④ Noguchi M, Hosoda K, Fujikura J, Fujimoto M, Iwakura H, Tomita T, Ishii T, Arai N, Hirata M, Ebihara K, Masuzaki H, Itoh H, Narumiya S, Nakao K. Genetic and pharmacological inhibition of Rho-associated kinase II enhances adipogenesis. *J Biol Chem.* 2007 Oct 5;282(40):29574-83. 査読あり
- ⑤ Ishii T, Masuzaki H, Tanaka T, Arai N,

Yasue S, Kobayashi N, Tomita T, Noguchi M, Fujikura J, Ebihara K, Hosoda K, Nakao K. Augmentation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in LPS-activated J774.1 macrophages--role of 11beta-HSD1 in pro-inflammatory properties in macrophages. *FEBS Lett.* 2007 Feb 6;581(3):349-54. 査読あり

- ⑥ Fujikura J, Hosoda K, Noguchi M, Ebihara K, Masuzaki H, Hirata M, Fujimoto K, Doi R, Iwanishi M, Nakao K. A case of secretin-responsive insulinoma with low serum C-peptide levels. *Endocr J.* 2007 Feb;54(1):113-21. 査読あり

[学会発表] (計4件)

- ① 藤倉 純二、野口 倫生、富田 努、岩倉 浩、細田 公則、川口 義弥、中尾 一和
膵特異的 Rbp-j ノックアウトマウスの検討
第80回日本内分泌学会総会
2007年6月16日 東京国際フォーラム
- ② 藤倉 純二、野口 倫生、富田 努、岩倉 浩、細田 公則、川口 義弥、中尾 一和
膵特異的 Rbp-j ノックアウトマウスの検討
第50回日本糖尿病学会年次学術集会
2007年5月24日 東京国際フォーラム
- ③ 藤倉純二、細田公則、川口義弥、野口倫生、岩倉浩、富田努、小鳥真司、森栄作、泰江慎太郎、石井崇子、岡田定規、日下部徹、平田雅一、海老原健、益崎裕章、谷垣健二、矢部大介、中尾一和
膵特異的 Rbp-j ノックアウトマウスの検討
第81回日本内分泌学会学術集会
2008年5月18日 青森市文化会館
- ④ 藤倉純二、細田公則、川口義弥、野口倫生、岩倉浩、富田努、小鳥真司、森栄作、泰江慎太郎、石井崇子、岡田定規、日下部徹、平田雅一、海老原健、益崎裕章、谷垣健二、矢部大介、中尾一和
第51回日本糖尿病学会年次学術集会
2008年5月24日 東京国際フォーラム

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/jpn/research/diabetes.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤倉 純二 (FUJIKURA JUNJI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70378743

(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

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10件)

- ① 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

〔学会発表〕(計5件)

- ①
- ②
- ③

〔図書〕(計2件)

- ①
- ②

[産業財産権]

○出願状況 (計□件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

6. 研究組織

(1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：