

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2009

課題番号：20790652

研究課題名（和文） 初期膵臓領域化を規定する新規膵臓分化誘導因子の特定

研究課題名（英文） Analysis of the pancreas regionalization factor in the pre-pancreas region.

研究代表者

勝本 恵一（KATSUMOTO KEIICHI）

熊本大学・発生医学研究所・COE リサーチ・アソシエイト

研究者番号：40398227

研究成果の概要（和文）：

膵臓の起源を探る為に、DiI 結晶を用いて初期ニワトリ胚内胚葉をマークした。この方法により、詳細な内胚葉の細胞追跡実験が可能となり、詳細な細胞運命予定地図作成が初めて可能となった。それぞれ初期胃、膵、腸の前駆細胞は、原腸陥入直後に出現した。移植実験より、内胚葉の領域化は、胃、腸、膵の順番で決定することを明らかにした。また、予定腸内胚葉を、予定胃領域に移植した所、異所的に *insulin*, *glucagon* が発現した。これより、膵臓誘導シグナルは、初期体節期において、予定胃領域と予定膵領域に存在していることが分かった。また移植実験結果より、初期内胚葉において、膵臓誘導シグナルに反応できる領域は、予定膵領域と予定腸領域であることが分かった。これらの結果より、初期膵臓領域化は、シグナルを受け取る内胚葉とシグナルを出す中胚葉の“ズレ”によって規定されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To study the developmental origin of the pancreas we used DiI crystals to mark regions of the early chick endoderm: this allowed correlations to be established between specific endoderm sites and the positions of their descendants. Endodermal precursor cells for the stomach, pancreas and intestine were found to segregate immediately after completion of gastrulation. Transplantation experiments showed that region-specific endodermal fates are determined sequentially in the order stomach, intestine, and then pancreas. Non-pancreatic endoderm transplanted to the stomach region generated ectopic pancreas expressing both *insulin* and *glucagon*. These results imply that a pancreas-inducing signal is emitted from somitic mesoderm underlying the pre-pancreatic region, and this extends rostrally beyond the stomach endoderm region at the early somite stage. Transplantation experiments revealed that the endoderm responding to these pancreatic-inducing signals lies within the pre-pancreatic region and extends caudally beyond the region of the intestinal endoderm. The results indicate that pancreatic fate is determined in the area of overlap between these two regions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：膵臓、Dil 結晶、細胞運命予定地図、移植実験、insulin、ニワトリ胚、内胚葉、*Pdx1*

1. 研究開始当初の背景

本研究は、内胚葉形成メカニズムに焦点を絞り、**膵臓形成に着目**した。

マウス胚では、原腸陥入終了後に内胚葉は、隣接する中内胚葉からのシグナルより、前後軸に沿って領域化される(Wells and Melton, 2000)。最も初期の膵臓マーカー遺伝子 *Pdx1*(pancreas duodenum homeobox 1)が発現するのは、胎生 8.5 日目からである。予定背側膵臓領域は、脊索からの誘導シグナルを受ける。脊索からの activin と FGF2(fibroblast growth factor 2)シグナルにより、*Shh*(sonic hedgehog)の発現が抑制される。この *Shh* 発現抑制が *Pdx1* 発現に必須であることがわかっている(Kim et al, 1997, Lammert et al, 2001)。背側膵臓領域化には、*Ptf1a*(pancreas specific transcription factor-1a)の発現も関与する。ツメガエルを用いた実験より、*Pdx1* と *Ptf1a* を後方内胚葉(小腸領域)に強制発現させると、膵臓が後方に拡大し肥大する (Afelik et al 2006)。

腹側内胚葉に関しては、膵臓の分化がデフォルトである。隣接する心臓中胚葉、横隔膜からの *Shh*, FGF, BMP(bone morphogenetic protein)シグナルにより、一部腹側膵臓分化が抑制され、肝臓の分化が誘導される (Gualdi et al 1996)。Notch シグナル伝達系に関与する *Hes1*(Hairly and enhancer of split 1) をノックアウトすると、一部胆管組織が内分泌細胞、外分泌細胞を含む膵臓に転換する (Sumazaki et al 2004)。

ニワトリ胚では膵臓原基について、次の報告がある。

- (1) 18 体節期で将来背側膵臓に分化する細胞は、7-15 体節領域に存在する(Le Douarin 1964, 放射性同位体を用いた細胞追跡実験)。
- (2) **10 体節期で将来背側膵臓に分化する細胞は、4-7 体節領域に存在する**(Matsushita 1996, Dil 溶液を用いた細胞追跡実験)。
- (3) 予定腹側膵臓は、10 体節期で 7-9 体節側方に存在し、予定腹側膵臓を単独で培養しても膵臓に分化せず、隣接する中胚葉と培養することで腹側膵臓に分化する(Kumar et al,

2003, CM-Dil を用いた細胞追跡実験)。

背側膵臓領域は、脊索と接する 22 体節前後まで脊索から膵臓誘導シグナルを受け、25 体節期より *Pdx1* が発現するという報告がある(Kim et al 1997)。しかし**前後軸に沿った膵臓領域化を、頭部から尾部にかけ存在する、脊索からの誘導シグナルだけでは説明することは困難であり、まだ不明な点が多い。**

2. 研究の目的

膵臓前駆細胞がいつの時期に出現し、どこに存在するのかを明らかにする目的で、ニワトリ胚を用い、細胞運命予定地図を作製した。ニワトリ胚の利点は、発生様式がヒトに近い、内胚葉にアプローチしやすい、移植実験、遺伝子強制発現による解析がしやすい点である。従来の Dil 溶液を用いることなく、**Dil 結晶細胞標識法より内胚葉特異的に 10 個前後の細胞をマーク**することが、可能となった。これより詳細な細胞運命予定地図作成が可能となり、**直接膵臓前駆細胞にアプローチ**することが、初めて可能となった。

3. 研究の方法

原腸陥入直後から、Dil 結晶を用いて背側膵臓領域に関する詳細な細胞運命予定地図を作成した。経時的な写真撮影を行なうことにより、背側膵臓前駆細胞の移動経路も特定した。この細胞運命予定地図に基づいて、細胞移植実験を行ない、膵臓誘導活性がいつの時期よりどの領域に存在するのか、調べた。

さらに、予定腹側膵臓領域に関する細胞運命予定地図も作成することにより、予定背側膵臓に関する細胞運命予定地図と比較し、その起源と分化メカニズムの違いを比較した。

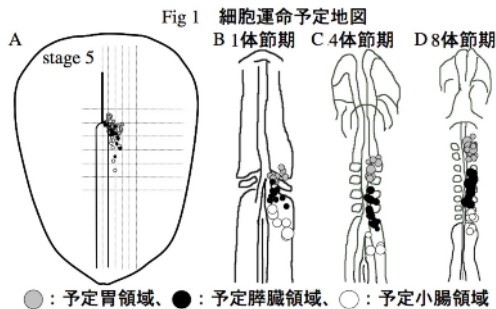
4. 研究成果

背側膵臓前駆細胞がいつの時期に出現し、どこに存在するのかを明らかにする目的で、ニワトリ胚を用い、細胞運命予定地図を作製した。細胞運命予定地図に基づいた細胞移植実験より、初期内胚葉の領域化は、胃、腸、膵の順番で決定する事がわかった。さらに膵臓誘導シグナルは、予定胃、膵臓領域中胚葉に存在して、膵臓誘導シグナルに回答できる内胚葉は、予定膵臓、小腸領域内胚葉である事がわかった。初期内胚葉の領域化は、吻側からと尾側から進行し、さらに**膵臓領域が形**

成される為には、中胚葉と内胚葉が移動して位置を変え、移動速度の差により生じた中胚葉と内胚葉の重なりが、決定的な役割を担っている事を明らかにした。

(1) 細胞運命予定地図と細胞移植実験

Pdx1 は 10 体節期の 4-7 体節領域内胚葉で発現する。stage5 ヘンゼン結節周辺の内胚葉をマークしたところ、4-7 体節領域に特異的に移動してくる場所を特定した。10 体節期まで経時的に観察し、膵臓前駆細胞の移動経路も特定した(Fig 1)。



● : 予定胃領域、● : 予定膵臓領域、○ : 予定小腸領域

移植実験より、**予定膵臓内胚葉は、8 体節期で自律的に *Pdx1* を発現することがわかった。** 4 体節期に予定小腸内胚葉を予定膵臓領域に移植したところ、移植片で *Pdx1* が発現した。4 体節期予定小腸内胚葉は、***Pdx1* 誘導シグナルに反応できる。** 予定胃内胚葉は、2 体節期で初期胃マーカー遺伝子 *Sox2* を自律的に発現し、予定小腸領域は、5 体節期で自律的に初期小腸マーカー遺伝子 *CdxA* を発現でき、可塑性を失う。

現在の報告では、異所的な *Pdx1* 発現、異所膵が形成される場合、本来の膵臓の位置より前方にできやすい、との症例報告がされているが、その分子機構については不明であった(Mulholland et al, 2004)。初期予定胃領域中胚葉には膵臓誘導能力があり、予定胃領域内胚葉は、早期に(2 体節期) *Sox2* を発現する事が決定する為に膵臓誘導シグナルに反応できない、と仮説を立てた。

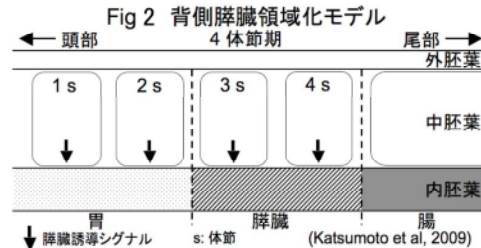
まだ運命が決定していない stage 5 側方内胚葉を 4 体節期予定胃領域に移植したところ、*insulin*, *glucagon* を発現する異所膵が形成された。よって**初期に予定胃、膵臓領域内胚葉に接している中胚葉には、膵臓誘導能力があり、シグナルを受け取る内胚葉側の応答性が、前後軸に沿った膵臓領域化に決定的に重要であることを明らかにした。**

(2) 新しく提唱する背側膵臓領域化モデル

内胚葉に着目すると、4 体節期予定膵臓、小腸領域は、中胚葉からの *Pdx1* 誘導シグナルに反応できる。予定胃内胚葉は、2 体節期に *Sox2* を発現する事が決まる為に *Pdx1* 誘導シグナルに反応できない。中胚葉に着目すると、4 体節期予定胃、膵臓領域は、*Pdx1* 誘導

活性を持つ。予定小腸領域は *Pdx1* 誘導活性を持たない。***Pdx1* 誘導シグナルに反応性を持つ内胚葉と、*Pdx1* 誘導活性を持つ中胚葉領域が重なるところが将来膵臓となる (Fig 2, Katsumoto et al, 2009)。**

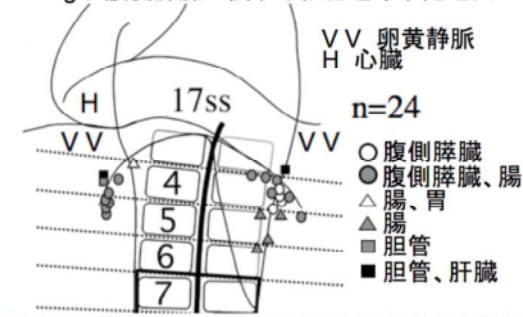
(3) 腹側膵臓前駆細胞の起源について従来



の説を覆し、新しい説を提唱

現在までのニワトリ胚予定腹側膵臓領域に関する説は、10 体節期で 7-9 体節側方に存在するものだった (Kumar et al, 2003, CM-Dil 溶液を用いた細胞追跡実験)。しかし、Dil 結晶を用いた細胞追跡実験より、10 体節期の 7-9 体節側方領域は、背側膵臓および腸に分化することを確認した。各ステージにおいて Dil 結晶を用いた細胞追跡実験を行ったところ、15 体節期までは、腹側膵臓の前駆細胞は、腸もしくは胆管と共通の前駆細胞として存在することを確認した。17 体節期になって初めて第 4 体節側方に腹側膵臓単独の前駆細胞が現れることを明らかにした (Fig 3, Matsuura*, Katsumoto* (* equal contribution) et al, 2009)。

Fig 3 腹側膵臓に関する細胞運命予定地図



(Matsuura*, Katsumoto* (* equal contribution) et al, 2009)

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 3 件)

(1) "Embryonic and adult stem cell systems in mammals: Ontology and regulation"

Keiichi Katsumoto, Nobuaki Shiraki, Rika Miki, Shoen Kume.

Development, Growth&Differentiation 52: 115 - 129 (2010) 査読あり

(2) “Conserved origin of the ventral pancreas in chicken.”

Kumi Matsuura*, Keiichi Katsumoto*,
Kimiko Fukuda, Kazuhiko Kume, Shoen Kume.
(* equal contribution) *Mechanisms of Development*, 126(10):817-827 (2009) 査読あり

(3) “Origin of pancreatic precursors in the chick embryo and the mechanism of endoderm regionalization.”

Keiichi Katsumoto, Kimiko Fukuda, Wataru Kimura, Kenji Shimamura, Sadao Yasugi, Shoen Kume. *Mechanisms of Development*, 126(7):539-551 (2009) 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

(1) ニワトリ胚における背側、腹側膵臓形成メカニズムの解析

勝本恵一 松浦公美 福田公子 桑昭苑
日本分子生物学会 2009年12月12日 パシフィコ横浜(横浜)

(2) The “sliding” between the endoderm and the mesoderm layer in the early embryo is a significant event for pancreas development.

Keiichi Katsumoto, Kimiko Fukuda, Wataru Kimura, Kenji Shimamura, Sadao Yasugi, Shoen Kume.
International Society for Stem Cell Research,
July 9, 2009, Barcelona (Spain)

(3) ニワトリ胚における膵臓前駆細胞の起源と初期内胚葉領域化メカニズムについての解析

勝本恵一 福田公子 木村航 嶋村健児
八杉貞雄 桑昭苑
日本発生生物学会 2009年5月30日
朱鷺メッセ(新潟)

〔図書〕(計1件)

(1) The potential of ES cells and tissue stem cells in the regenerative medicine of type I diabetes

Nobuaki Shiraki, Miki Rika, Keiichi Katsumoto, Shoen Kume.

Stem Cell Therapy, Transworld Research Network, 2010 in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝本 恵一 (KATSUMOTO KEIICHI)
研究者番号: 40398227
熊本大学・発生医学研究所・COE リサーチ・アソシエイト

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

桑 昭苑 (KUME SHOEN)
研究者番号: 70347011
熊本大学・発生医学研究所・教授

福田 公子 (FUKUDA KIMIKO)
研究者番号: 40285094

首都大学東京・理工学研究科・准教授

嶋村 健児 (SHIMAMURA KENJI)
研究者番号: 70301140
熊本大学・生医学研究所・教授

八杉 貞雄 (YASUGI SADAO)
研究者番号: 70011591
京都産業大学・総合生命科学部・教授