

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591516
 研究課題名（和文） 膵臓内・外分泌前駆細胞間相互作用を応用した細胞リプログラミングとその解析
 研究課題名（英文） The analysis of liver-to-pancreas reprogramming based on cellular interaction
 研究代表者
 小林 聡（KOBAYASHI AKIRA）
 信州大学・医学部・准教授
 研究者番号：90334903

研究成果の概要（和文）：

我々は同様の非ウイルス性遺伝子導入手法により再生過程にあるマウス肝組織中に Pdx1 と Ngn3 を共発現させることにより、*in vitro* の系と同様に肝組織内でインスリン産生を誘導しうることを発見した。更に Pdx1, Ngn3 に *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A (MafA)* を加えることによりこのような *reprogramming* が増強されうる可能性があることを同定した。今回の検討により、生体内においても、非ウイルス性遺伝子導入手法により肝臓細胞からインスリン産生細胞を誘導しうる事が同定された。導入遺伝子の最適化には更なる検討が必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We introduced Pdx1 and Ngn3 into regenerative liver using non-viral gene transfer technique. Co-expression of Pdx1 and Ngn3 activated the transcription of various islet-related genes, and induced insulin synthesis in the liver. Furthermore, it was suggested that this reprogramming was enhanced by co-expression of triple factors adding *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A (MafA)*. In conclusion, the reprogramming will occur even *in vivo* without the need for viral vectors. Further investigation might be needed to optimize the combination of transgene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：再生医療，遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省による人口動態調査によれば、2004 年の本邦における膵癌による死亡数は 22,260 人で、癌の死因別では男女とも第 5 位であるが、年々増加傾向にある。膵癌は、

初期に無症状であることが多く、また後腹膜臓器である解剖学的特性により早期発見が困難な癌種として知られている。実際、症状出現時には既に周囲臓器・器官への浸潤が認められることが多いため、手術を含めた治療

法の選択に難渋する症例にしばしば遭遇する。特に膵全摘出術を要する症例においては、術後の膵内分泌機能の欠損により、特に血糖値のコントロールが困難となる症例が大半であるため患者の QOL の視点から術式を選択に躊躇することも少なくない。また膵部分切除症例においても、65%以上の膵切除を行った場合には一定期間の潜在性糖尿病の後にインスリン依存性糖尿病へと進展することが報告されている。このように手術後の膵内分泌機能の保全は膵臓外科領域における重要な命題である。

近年、このような膵切除後内分泌機能不全に対する膵島移植も pre-clinical study として報告され一定の成果を挙げているが、膵島移植の免疫抑制プロトコールが未だ模索されている昨今においては、免疫抑制下の発癌リスク検証の必要性という見地も踏まえ、臨床応用までの道のりは遠いと言わざるを得ない。

他方、遺伝子治療の見地からは、自己免疫疾患である I 型糖尿病に対して膵臓発生関連特異的転写因子を膵臓以外の細胞に対して異所性に発現させることにより膵島内分泌細胞への reprogramming を惹起しうることが多数報告されている。これらの遺伝子導入のホストとして複数の細胞種が報告されているが、その発生学的相同性から肝臓細胞はもっとも有効な細胞ソースとして期待されている。2000 年 Ferber らによって、アデノウイルスベクターを用いて膵臓発生特異的転写因子 Pancreatic and duodenal homeobox 1(Pdx1)をマウス肝臓に異所性発現させることにより肝臓から膵臓内分泌細胞への reprogramming を惹起しうることが報告されて以降、*in vitro / in vivo* の両実験系で複数の検討がなされているが、その多くは viral vector を用いた検討であった。Viral vector による、特に生体内における細胞障害作用は、このような再生医学的手法を臨床ベースに底上げする上で大きな障壁である。

我々は従来遺伝子導入が困難とされるマウス初代培養肝細胞に対して、非ウイルス性遺伝子導入手法を用い Pdx1 と Ngn3 を共発現させる事により膵β細胞様細胞への reprogramming を効率的に惹起しうることが世界に先駆けて報告したが、初代培養肝細胞という導入対象細胞の特性上、インスリン産生/分泌という獲得形質は一過性の事象に留まった。またこのような reprogramming を惹起する上で、転写因子 2 種類による組み合わせが最適なのか否かも検証する必要があった。

このような背景を鑑み、我々はマウス肝再生モデルを用いて *in vitro* と同様な

reprogramming を誘導しうるかを検証した。更に上記 2 種の転写因子に加え v-maf musculo aponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MafA)を加え 3 因子共発現系とすることにより、その効率性を亢進せしめるか否かを検証した。

2. 研究の目的

①非ウイルス性遺伝子導入手法による liver-to-pancreas reprogramming は *in vivo* の環境下においても惹起しうる、②Pdx1 及び Ngn3 に MafA を加えることにより reprogramming 効率を上昇する、という二つの作業仮説を検証するため、マウス肝再生モデルの肝組織中に Pdx1, Ngn3, 及び MafA を非ウイルス性に発現させ、インスリン産生細胞の誘導性を検証する。

3. 研究の方法

膵臓発生特異的転写因子である, Pdx1, Ngn3, 及び MafA を用い, ①2 因子 (Pdx1+Ngn3), ②3 因子 (Pdx1+Ngn3+MafA) を共発現するプラスミドを作成する。これらのプラスミドを, choline-deficient, ethionine-supplemented (CDE) diet を用いた肝再生モデルマウスに対して hydrodynamic gene transfer technique により非ウイルス性に導入する。肝組織を用いた RT-PCR 及び insulin-ELISA 法により、肝組織内でのインスリン発現性を解析する。

4. 研究成果

(1) 膵臓発生特異的転写因子発現プラスミドの構築

CMV プロモーター下流で Pdx1, Ngn3, 及び MafA が蛍光タンパク質とともに発現するプラスミドを三種類作成した。予備実験としてマウス肝芽腫由来 cell line (Hepal-6) に対して electroporation 法の改変手法である nucleofection 法を用いて遺伝子導入を行った結果、約 60%の導入効率で遺伝子を導入し得た。この系においては 3 種類のプラスミドの共導入が可能であり (Fig. 1), その共発現率はほぼ 90%であった。

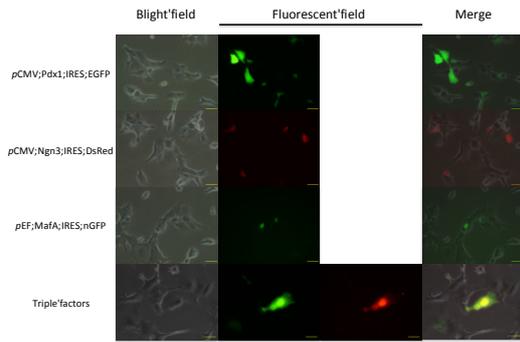


Fig. 1 Nucleofection 法による遺伝子導入

このプラスミドをマウス尾静注による hydrodynamic gene transfer technique を用いてマウス肝において異所性発現させた。この系においても同様の発現性が得られたが、その発現は一過性であったため、新たにヒトフェリチンプロモーター下流で、転写因子 2 種及び 3 種を共発現するプラスミドを再構築した (Fig. 2)。

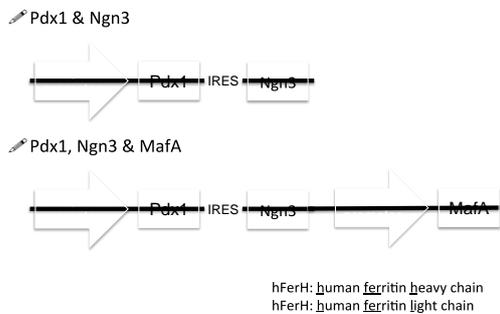


Fig. 2 ヒトフェリチンプロモーター下流発現プラスミド

このプラスミドを尾静注したマウスにおいては、連続切片の検討において 3 種類の転写因子が肝細胞内で共発現することが確認し得た (Fig. 3)。加えて、約 14 日間の発現維持が可能であることを確認した。

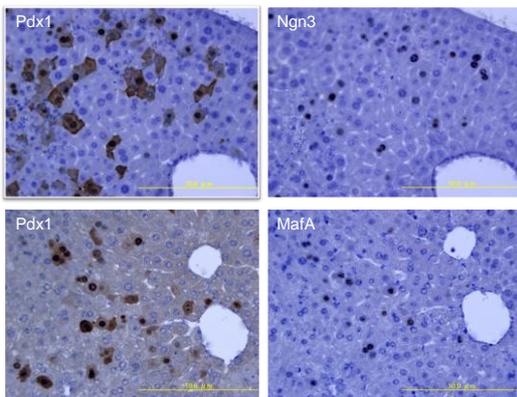


Fig. 3 マウス肝における異所性遺伝子発現

(2) マウス肝組織における異所性遺伝子発現

現よる、インスリン産生細胞分化誘導

C57BL/6J マウス (6 週齢, 雄) に対して choline-deficient, ethionine-supplemented (CDE) diet を投与し、肝障害-再生モデルを作成した。同モデルにおいては肝組織特異的幹細胞である oval cell が誘導されるが、食餌を通常食にもどすことにより肝再生が惹起される。このモデルに対し streptozotocin (STZ) を投与し高血糖状態を惹起した上で、プラスミドを尾静注し、インスリン産生細胞の分化誘導を行った (Fig. 4)。

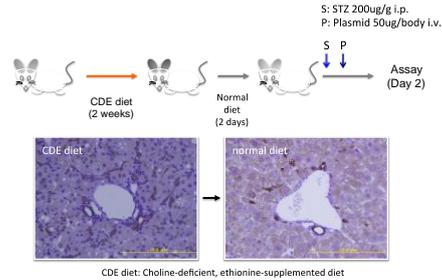


Fig. 4 Experimental design

結果、肝組織を用いた RT-PCR により膵臓内分泌ホルモン並びに膵臓特異的発現誘導が確認された。2 因子共発現系において insulin -2 の発現は確認されなかったが、3 因子共発現系においては通常膵組織と同じく insulin 1 及び insulin 2 の発現を確認し得た (Fig. 5)。

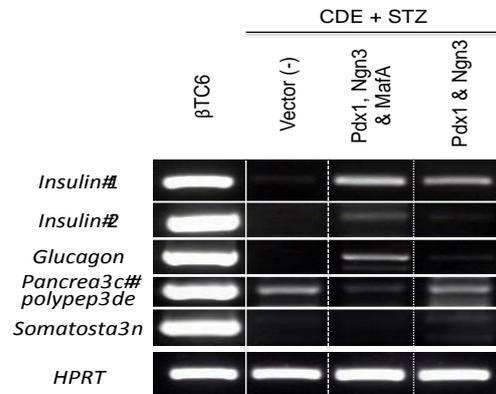


Fig. 5 マウス肝における膵臓ホルモン遺伝子発現

またマウス肝組織中のインスリンを ELISA 法にて定量すると、3 転写因子共発現系におけるインスリン含有量は非遺伝子導入マウスに比し、有意に高値であった。2 因子共発現系との比較では、統計学的有意差は認めないものの、約 2 倍のインスリン含有量を示した (Fig. 6)

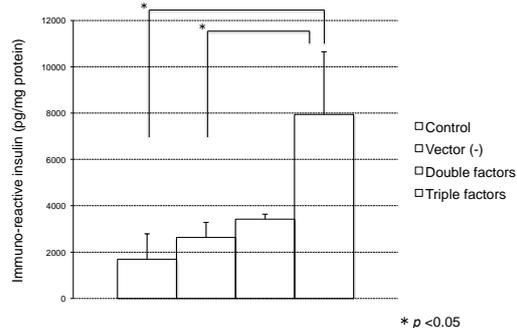


Fig. 6 マウス肝組織におけるインスリン定量

これらの知見は、生体内においても、非ウイルス性遺伝子導入手法により肝臓細胞からインスリン産生細胞を誘導しうることを証明する所見であり、更に 2 転写因子共発現に比し 3 因子共発現系が **reprogramming** 誘導性に優れている可能性を示唆する所見であった。

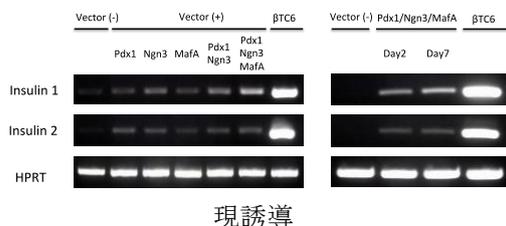
今後の予定

現在我々はマウス肝由来未分化細胞に対する、インスリン産生細胞分化誘導実験を遂行している。

我々はマウス門脈結紮モデルより独自に樹立した肝幹様細胞，portal branch ligation-stimulated hepatic cells (PBLHCs) に対して同様の非ウイルス性遺伝子導入実験を施行した。PBLHCs はマウス肝門脈結紮葉から樹立された肝組織特異的幹細胞であり、細胞外マトリックス及び液性因子の調整により、肝及び胆管細胞の二系統に分化する可塑性を有する細胞である。また門脈結紮葉のみならず正常肝組織からも分離が可能である。

現在までの検証においては、この *in vitro* の系においても、3 転写因子を共発現させることによりインスリン遺伝子の発現は誘導され、また導入後 7 日目まで維持することが可能であった (Fig. 7)。

Fig. 7 PBLHCs におけるインスリン遺伝子の発



現誘導

実地臨床における門脈結紮（塞栓）術は門脈血流の不均衡による代償性肝再生を惹起するための治療手段であり、通常門脈結紮葉

は担癌領域として切除される運命にある。

現在はまだ予備実験の段階であるが、現在の PBLHCs に対する遺伝子導入実験の発展により、切除肝として破棄されるべき肝葉における組織特異的幹細胞を再生医療の cell source として有効に活用しうる可能性が生じうる。

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 8 件）

1. Gui A, Kobayashi A, Motoyama H, Kitazawa M, Takeoka M, Miyagawa S. Impaired degradation followed by enhanced recycling of epidermal growth factor receptor caused by hypo-phosphorylation of tyrosine 1045 in RBE cells. BMC Cancer. 2012 May 16;12:179. 査読有り. DOI: 10.1186/1471-2407-12-179.
2. Akita S, Kubota K, Kobayashi A, Misawa R, Shimizu A, Nakata T, Yokoyama T, Takahashi M, Miyagawa S. Role of bone marrow cells in the development of pancreatic fibrosis in a rat model of pancreatitis induced by a choline-deficient/ethionine-supplemented diet. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Apr 20;420(4):743-9. 査読有り. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.060.
3. Karasawa F, Shiota A, Goso Y, Kobayashi M, Sato Y, Masumoto J, Fujiwara M, Yokosawa S, Muraki T, Miyagawa S, Ueda M, Fukuda MN, Fukuda M, Ishihara K, Nakayama J. Essential role of gastric gland mucin in preventing gastric cancer in mice. J Clin Invest. 2012 Mar 1;122(3):923-34. 査読有り. DOI: 10.1172/JCI59087.
4. Arai T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Iinuma N, Iesato Y, Koyama T, Yoshizawa T, Uetake R, Yamauchi A, Yang L, Kawate H, Ogawa S, Kobayashi A, Miyagawa S, Shindo T. Induction of LYVE-1/stabilin-2-positive liver sinusoidal endothelial-like cells from embryoid bodies by modulation of adrenomedullin-RAMP2 signaling. Peptides. 2011 Sep;32(9):1855-65. 査読有り. DOI:10.1016/j.peptides.2011.07.005.
5. Kitahara H, Masumoto J, Parker AL, Maruta F, Kubo N, Shimizu A, Akita N,

- Miwa S, Kobayashi N, Nakayama J, Miyagawa S. COP35, a cholangiocarcinoma-binding oligopeptide, interacts with the clathrin heavy chain accompanied by GRP78. *Mol Cancer Res*. 2011 Jun;9(6):688-701. 査読有り.
DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0470.
6. Masuda Y, Nakazawa Y, Matsuda K, Sano K, Mita A, Ohno Y, Urata K, Ikegami T, Miwa S, Miyagawa S. Clinicopathological features of hepatitis C virus disease after living donor liver transplantation: relationship with in situ hybridisation data. *Pathology*. 2011 Feb;43(2):156-60. 査読有り.
DOI: 10.1097/PAT.0b013e32834317ed.
7. Sakai H, Tagawa Y, Tamai M, Motoyama H, Ogawa S, Soeda J, Nakata T, Miyagawa S. Isolation and characterization of portal branch ligation-stimulated Hmga2-positive bipotent hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Dec 17;403(3-4):298-304. 査読有り.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.021.
8. Iinuma N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Arai T, Yoshizawa T, Koyama T, Uetake R, Kawate H, Muto S, Tagawa Y, Miyagawa S, Shindo T. Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver. *Peptides*. 2010 May;31(5):865-71. 査読有り.
DOI:10.1016/j.peptides.2010.01.011.

[学会発表] (計 5 件)

1. 本山博章, Liver-to-pancreas reprogramming - 膵切除後内分泌機能不全への応用 -. 第 113 回日本外科学会総会, 2013 年 4 月 12 日, 福岡
2. 本山博章, Induction of pancreatic β -like cells from hepatic cells. 第 35 回日本分子生物学会総会, 2012 年 12 月 14 日, 福岡
3. 本山博章, A Useful Non-viral Procedure to Induce Liver-to-pancreas Reprogramming to Complement Post-operative Pancreatic Endocrine Dysfunction, 第 17 回日本遺伝子治療学会, 2011 年 7 月 17 日, 福岡
4. 本山博章, Liver-to-pancreas reprogramming 膵切除後内分泌機能不全への応用, 第 66 回日本消化器外科学会, 2011 年 7 月 15 日, 名古屋

5. 本山博章, An excellent non-viral procedure to induce liver-to-pancreas reprogramming to complement post-operative pancreatic endocrine dysfunction. 8th Catholic International Stem Cell Symposium, 2010 年 10 月 2 日, Seoul, Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 聡 (KOBAYASHI AKIRA)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号: 90334903

(2) 研究分担者

本山 博章 (MOTOYAMA HIROAKI)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20569587

宮川 眞一 (MIYAGAWA SHINICHI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号: 80229806

(3) 連携研究者

()

研究者番号: