

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23790797
 研究課題名（和文）膵β細胞の再生におけるEpiplakin1陽性細胞の役割
 研究課題名（英文）The elucidation of the progeny of the Eppk1-expressing cells: insights into the pancreatic exocrine regeneration mechanisms
 研究代表者
 三木 梨可 (MIKI RIKA)
 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：30516133

研究成果の概要（和文）：

膵幹細胞マーカー候補遺伝子 Epiplakin1 (Eppk1) は胎児期に膵幹細胞に発現し、成体膵では膵管細胞、α細胞、腺房中心細胞に局在する。さらに膵障害時からの再生過程で Eppk1 陽性細胞が一過的に増加する。Eppk1 発現細胞を GFP ラベルしたマウスに膵炎を誘発した結果、Eppk1 陰性 GFP 陽性の外分泌性細胞が観察されたことから Eppk1 発現細胞が幹細胞であり Eppk1 発現細胞から膵外分泌細胞への分化転換により再生している可能性が推測された。

研究成果の概要（英文）：

Epiplakin (Eppk1) was one of the pancreatic stem cell markers during the development. We hypothesized that Eppk1-expressing cells are one source of regenerating cells. Eppk1-CreER; Z/EG mice were administrated with tamoxifen and then injected caerulein that causes acinar cell degeneration. GFP labeled cells were detected in the Eppk1 negative acinar cells. These result indicated that Eppk1 expressing cells were one source of the regenerated acinar cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000 円	900,000 円	3,900,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：幹細胞、外分泌細胞、β細胞、糖尿病、再生医学

1. 研究開始当初の背景

膵臓は成体において膵部分切除あるいは Streptozotocin (STZ) 投与やセルレイン投与などによる膵島障害や膵炎の誘発モデルにおいて、膵再生が観察されている。この成体膵における膵再生が、①膵幹細胞に由来する。②膵の体性幹細胞は存在せず、β細胞や外分泌細胞自身の増殖により再生している。という二つの可能性が示唆されている。このように、膵幹細胞の存在についての見解が分かっているのは、膵幹細胞マーカーが同定されていないという問題点があることに起因していると考えられる。

これまでに申請者の所属する研究室にお

いて、膵前駆細胞特異的に発現することが知られている Pdx1 陽性の細胞をマウス ES 細胞から効率よく分化誘導することに成功している。この ES 細胞由来の Pdx1 陽性細胞において、発現が亢進している遺伝子を同定するためマイクロアレイをおこなっている。その亢進している遺伝子の一つとして Epiplakin1 (Eppk1) を同定した。

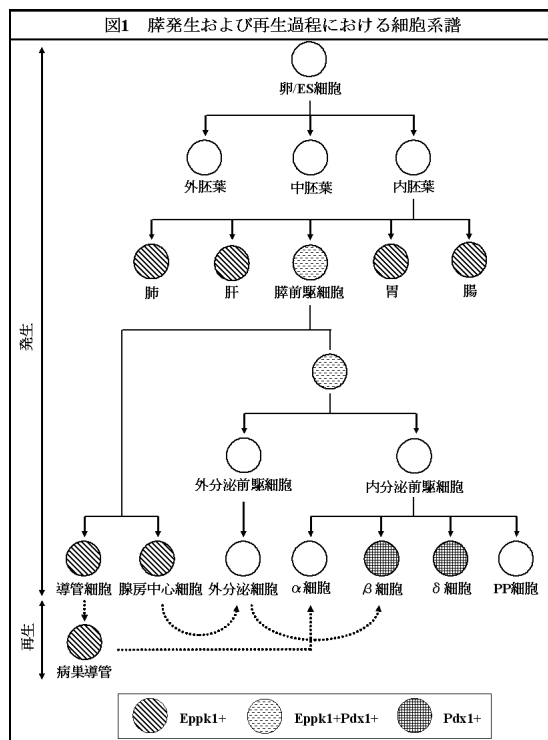
この EPPK1 は、Plakin ファミリーに属しており細胞内において中間径フィラメントと結合することが報告されている。さらに近年、EGF レセプターと結合することも明らかにされ、EGF シグナリングへの関与も示唆されている。しかし、EGF シグナルにおける Eppk1 の役割については不明である。

さらに申請者の所属研究室では、マウス胎仔において Eppk1 が、膵発生初期から Pdx1 陽性の膵前駆細胞で発現しており、成体膵臓では、腺房中心細胞で Eppk1 が発現していることを明らかにした。この腺房中心細胞は、膵炎において組織幹細胞として働くことが報告されており、セルレイン投与による膵炎モデルで Eppk1 陽性細胞の増殖が観察された。

また膵部分切除により導管細胞が脱分化し病巣導管と呼ばれる多分化能を有する細胞が観察されることが報告されており、この病巣導管において Eppk1 の発現が観察された。

さらに、STZ 投与による糖尿病モデルにおいて、Eppk1 の発現細胞が一過的に増えることが観察され、膵再生過程において Eppk1 発現細胞から内分泌細胞への分化が生じている可能性が示唆された(申請者の所属研究室における未発表データ)。

以上の結果から、全ての膵障害モデルにおいて Eppk1 が成体の膵幹細胞の指標となることが強く示唆された。また、Eppk1 を発現する細胞から内分泌細胞や外分泌細胞へ分化する可能性が推測された。



2. 研究の目的

(1) セルレイン投与において、Eppk1 発現細胞から外分泌細胞が生じるのか解析し、Eppk1 が膵再生過程における膵幹細胞マーカーであるか明らかにする。

(2) 通常状態で Eppk1 を発現する腺房中心細胞から、外分泌細胞や内分泌細胞が生じるのか解析し、Eppk1 が通常状態における膵幹細胞マーカーであるか明らかにする。

(3) 糖尿病モデルマウスにおける Eppk1 発現細胞の経時的変化を明らかにし、Eppk1 発現細胞が β 細胞の再生源であるか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Eppk1-CreER マウスの作製

BAC クローンを用いて、Eppk1 発現下で CreER 遺伝子が発現するようなコンストラクトを作製した。この Eppk1-CreER コンストラクトを用いて熊本大学 動物資源開発研究部門 (CARD) に Eppk1-CreER マウスの作製を依頼した。

22 匹のマウスが生まれ、ジェノタイプングをおこなった結果、Founder マウスは 3 匹であった。得られた Founder マウスをもちいて F1 および F2 マウスを作出し、Eppk1-CreER マウスの系統確立をおこなった。

(2) Eppk1-CreER マウスにおける Cre recombinase 活性の局在解析

系統確立をおこなった Eppk1-CreER マウスと CAG-loxP-LacZ-loxP-EGFP (Z/EG) マウスを交配し、Eppk1-CreER ; Z/EG マウスを作出した。Eppk1-CreER ; Z/EG マウスにタモキシフェンを投与し、GFP の発現が Eppk1 陽性細胞で観察されるかを確認した。

(3) Eppk1-CreER マウスをもちいた膵再生過程の解析

STZ 投与やセルレイン投与、膵部分切除により GFP の発現が、Eppk1 の免疫染色の結果と一致するか確認した。さらに、経時的に GFP 陽性細胞が、外分泌細胞や内分泌細胞に分化しているか免疫組織化学などをおこない Eppk1 を指標とし膵再生過程を詳細に解析した。

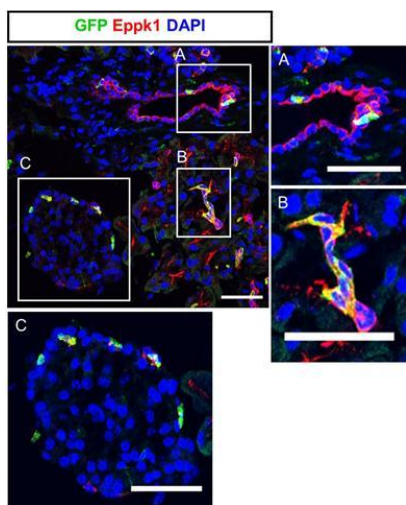
4. 研究成果

(1) Eppk1-CreER マウスの作出

Eppk1 が成体の膵幹細胞の指標となる可能性および Eppk1 が発現した細胞から外分泌細胞や内分泌細胞などへ分化する可能性について検証をおこなうために、時期特異的、組織特異的に Eppk1 発現細胞をラベルできる Eppk1-CreER マウスを作出した。

BAC クローンを用いて、Eppk1 発現下で CreER 遺伝子が発現するようなコンストラクトを作製した。この Eppk1-CreER コンストラクトを用いて熊本大学 動物資源開発研究部門 (CARD) に Eppk1-CreER マウスの作製を依頼した。

Z/EG マウスと交配し、Eppk1-CreER ; Z/EG マウスを作出した。Eppk1-CreER;Z/EG マウスにタモキシフェン投与をおこない GFP 発現パターンを解析した。その結果、通常状態では GFP 陽性細胞が Eppk1 発現細胞の膵管細胞 (図 A)、 α 細胞 (図 C)、腺房中心細胞 (図 B) のみで観察された。



Eppk1-CreER;Z/EG マウスにタモキシフェンを投与した膵臓の免疫染色像。

(A) 膵管 (B) 膵島 (C) 腺房中心細胞の拡大写真
GFP (緑)、Eppk1 (赤)、DAPI (青)、スケールバー50 μ m

このことから作出した Eppk1-CreER;Z/EG マウスをもちいた Eppk1 発現細胞の運命追跡が可能となった。

(2) 膵炎において Eppk1 発現細胞が再生した外分泌細胞の源である

膵再生過程において Eppk1 発現細胞から外分泌細胞への分化転換が生じているか明らかにするためにタモキシフェン投与し膵管細胞、 α 細胞、腺房中心細胞を GFP ラベルした Eppk1-CreER;Z/EG マウスにセルレイン投与をおこない膵炎を誘発した。セルレイン投与7日目において Eppk1 陰性 GFP 陽性 Amylase 陽性細胞が観察された。このことからセルレイン誘導膵炎モデルにおいて Eppk1 発現細胞が幹細胞であり Eppk1 発現細胞から膵外分泌細胞への分化転換により再生している可能性が推測された。

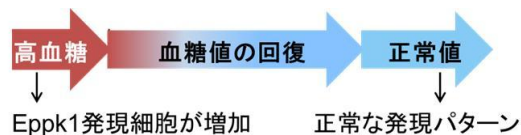
今後の展開

膵炎誘導後に多数の Eppk1 発現細胞が観察されることから、Eppk1 発現細胞の増殖や外分泌細胞への分化誘導メカニズムを明らかにすることで、膵炎における治療に向けて有用な情報となることが期待できる。

(3) 糖尿病からの再生過程で Eppk1 発現細胞が一過的に増加する

STZ 投与による膵 β 細胞の障害誘導は、I 型糖尿病モデルとして知られている。STZ を新生仔マウスに投与すると β 細胞が破壊され血糖値が上昇し糖尿病を発症する。これまでに STZ を低容量で投与した場合、血糖値は上昇するが、数か月にわたる β 細胞の再生過程を経て血糖値が低下するマウスモデルを確立した (Kataoka M. et. al., 2013)。

この膵 β 細胞の障害・再生モデルにおいて、高血糖時の膵島内では、 β 細胞は破壊され減少している一方、Eppk1 陽性細胞の一過的な増加が観察された。さらに血糖値が正常値まで減少し β 細胞が再生した時期には Eppk1 発現細胞は正常な発現パターンに類似していた。



このことから、 β 細胞破壊時に一過的に観察される Eppk1 陽性細胞が、膵炎からの水害分泌細胞の再生と同様に再生する細胞源となっている可能性や自己再生する β 細胞のサポートの役割を担っているのか明らかにするため Eppk1-CreER;Z/EG マウスをもちいた解析を行っている。

今後の展開

Eppk1 陽性細胞から内分泌細胞へ分化する機構が明らかになれば、糖尿病患者から Eppk1 を発現する細胞を採取し、*in vitro* で β 細胞へ分化誘導し移植することが可能になる。さらに *in vivo* において Eppk1 陽性細胞を β 細胞へ分化誘導するという方法も考えられ、細胞移植ではなく投薬による治療という新たな治療法にも発展することが期待される。

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 1件)

- ① Kataoka M., Kawamuro Y., Shiraki N., Miki R., Sakano D., Yoshida T., Yasukawa T., Kume K., Kume S.

“Recovery from diabetes in neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment.” 査読有 Biochem Biophys Res Commun., 2013, Jan 18;430(3):1103-8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.030>

〔学会発表〕(計 1件)

- ① 片岡 正光、河室 友希、三木 梨可、坂野 大介、白木 伸明、吉田 哲、糸和彦、糸 昭苑

Regeneration of beta cells in neonatal mouse after streptozotocin treatment. 第34回分子生物学会、パシフィコ横浜 横浜 2011. 12. 13

〔図書〕(計 1件)

- ① Katsumoto K., Miki R., Umeda, K., Shiraki, N., Kume, S. “Stem Cell Biology: Basic Concepts to Frontiers Students Edition, Chapter 9. ENDODERM” (p225-252), Edited by “Dinender K. Singla, PhD, FAHA. Publisher: CreateSpace Independent Publishing Platform; Student edition (July 26, 2012). ISBN-10: 1466291079. ISBN-13: 978-1466291072.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 梨可 (MIKI RIKA)

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：30516133