

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462108

研究課題名(和文) 肝幹細胞を用いたインスリン産生細胞分化誘導による膵切除後内分泌機能不全治療戦略

研究課題名(英文) New modality for cell-replacement therapy using adult liver-derived progenitor cells for post-pancreatectomy diabetic patients.

研究代表者

小林 聡 (KOBAYASHI, Akira)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：90334903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子異所性発現による分化転換は細胞の性質を変化させる有効な手段である。本研究は肝組織特異的肝細胞における分化転換効率が培養条件によって左右されるかを検討したものである。結果、特有の化合物を付与した無血清培地と三次元培養の併用下において、両者は共依存的な作用により転写因子作動性分化転換を促進し、細胞の機能的成熟が促すことが示された。本研究は成熟体細胞を用いた分化転換誘導において重要な知見であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor (TFs)-mediated transdifferentiation is novel process to convert one adult cell type into an alternate cell type with a different function. This study focuses on the inducibility of TFs-mediated transdifferentiation using portal branch ligation-stimulated hepatic cells, which is bipotent hepatic progenitor cell clones, by culturing the cells in a serum-free differentiation medium containing specific compounds (SFDM) and/or using a three-dimensional (3D) cellular aggregation technique. We revealed that both treatment with SFDM and the use of a 3D culture acted interdependently to promote TFs-mediated transdifferentiation. This study provides an important strategy for the cellular transdifferentiation of adult somatic cells using defined factors.

研究分野：膵臓外科学

キーワード：分化転換 インスリン産生細胞 転写因子

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。事実、膵癌治療症例の約8割はStageIV以上の進行症例であり、手術時既に周囲臓器・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ことがしばしばである。このような局所進行膵癌に対して、resectabilityの向上を目的に膵全摘出術が適応されることがあるが、術後の膵内分泌機能の欠損による血糖コントロールが困難となる症例が大半である。このため術後QOLの視点から術式の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¹⁾。このように膵切除後内分泌機能の保全是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²⁾、膵島移植の免疫抑制プロトコールは未確立であり、また免疫抑制下の発癌リスク検証も必須であるため、臨床応用までの道のりは未だ途上である。

このような膵切除後内分泌機能不全のみならず、自己免疫性疾患であるI型糖尿病に対する治療手段として、胎生期膵臓発生特異的転写因子を用い、非膵島細胞を膵島内分泌細胞へ分化転換させる試みが多数報告されている。このような分化転換のホストとしてES細胞、iPS細胞、間葉系幹細胞などの実績が報告されているが、その発生学的相同性から肝臓細胞も有効な細胞ソースとして期待されている。

肝臓細胞に対して膵臓発生関連転写因子を異所性発現させることにより分化転換を惹起せしめるという方法論(liver-to-pancreas transdifferentiation)は、2000年のFerberらによるアデノウイルスベクターを用いた報告³⁾以降、*in vitro* / *in vivo*の両系で複数の検討がなされている。現在までにliver-to-pancreas transdifferentiationのinducerと考えられている転写因子はPancas-duodenal homeobox 1 (Pdx1)、Neurogenin 3 (Ngn3)、Neurogenic differentiation 1 (NeuroD1)、およびv-maf musculo aponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MafA)等があり、我々もマウス初代培養肝細胞に対してPdx1とNgn3を共発現させる事により膵β細胞様細胞への分化転換を惹起しうることを報告した⁴⁾。しかし、この分化転換による獲得形質は一過性であり、臨床応用に耐えうる内分泌細胞としての性質を獲得・維持するための必要条件として我々は下記作業仮説を提唱した。

“異所性転写因子による肝臓から膵臓への分化転換課程において、その効率性を向上せしめる因子もしくは培養環境が存在する”。

我々はマウス門脈結紮モデルを用い、増殖性を有し、かつ肝実質/胆管細胞の二系統への分化能を有する肝組織特異的幹細胞(portal branch ligation-stimulated hepatic cells (PBLHCs)の樹立に成功した⁵⁾。同細胞は幹細胞の発現形質であるHmga2(high mobility group AT-hook 2)を発現し、門脈結紮肝のみならず正常肝からの分離も可能であることが判明した。またこの細胞は凍結保存に対する忍容性も兼ね備えている。

参考文献

1. Yonemura Y. et al. The pathogenesis and management of insulin dependent diabetes developed after partial pancreatectomy, with special reference to the beta-cytotrophic factors. The Japanese Society of Gastroenterological Surgery. 1986 Apr 19(4):836-839
2. Jung, H. S. et al. Enhancement of beta-cell regeneration by islet transplantation after partial pancreatectomy in mice. Transplantation. 2009 Aug 15;88(3):354-9.
3. Ferber, S. et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. Nat Med. 2000 May;6(5):568-72.
4. Motoyama H, Miyagawa S. et al. In vitro reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Jul 17;385(1):123-8.
5. Sakai H, Motoyama H, Miyagawa S, et al: Isolation and characterization of portal branch ligation-stimulated Hmga2-positive bipotent hepatic progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun 403:298-304, 2010

2. 研究の目的

肝由来細胞を用いた異所性転写因子による膵内分泌細胞分化転換誘導系(*in vitro*)において、培養条件(培養方法及び添加因子)により分化転換誘導性が変化するか否かを検証する。

3. 研究の方法

マウス肝組織特異的幹細胞であるPBLHCsを用いて以下を検証する。

1. Liver-to-pancreas transdifferentiationを誘導するに最適な転写因子群の同定
2. 1.で求めた転写因子群を用いた分化転換誘導系において、①培養方法(接着培養もしくは三次元培養)および②培養液組成(血清含有培地もしくは添加因子付与無血清培地)の差異により分化転換誘導性が変化するか否かを、A. 膵臓関連遺伝子の発現性、B. インスリン蛋白の発現性、及びC. 機能解析の3点から検証する。

4. 研究成果

結果 1 : 3 転写因子の共発現が分化転換誘導に有効であった。

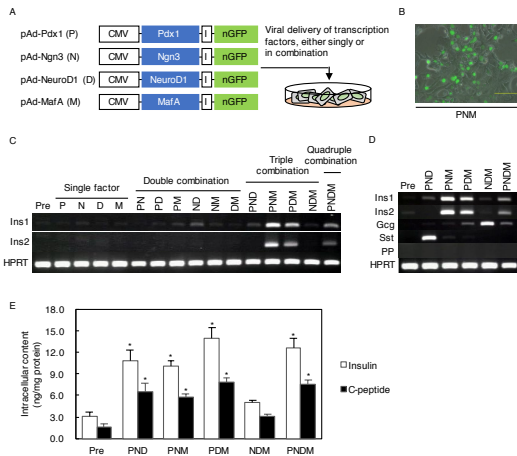


図1

まず, Pdx1, Ngn3, NeuroD1, および MafA を蛍光蛋白 (nGFP) とともに単独発現するアデノウイルスベクター4種類を準備した(図 1A). 同ベクターが導入された細胞は核に一致した緑色蛍光を発現する(図 1B). 同ベクターを, 単独および 2, 3, 4 各種類で共発現させインスリン遺伝子の発現性を検討すると, Pdx1/Ngn3/MafA および Pdx1/NeuroD1/MafA の各組み合わせにおいてインスリン遺伝子の発現性が行進することが示唆された(図 1C, D). またこれらの細胞では細胞内インスリンおよび内因性インスリン産生の指標である c-ペプチドの発現性が非遺伝子導入細胞に比し有意に亢進していた(図 1E). これらの所見より, dx1/Ngn3/MafA もしくは Pdx1/NeuroD1/MafA の組み合わせが PBLHCs を用いた *in vitro* 分化転換誘導系において最適であると考えられた。

結果 2 : 3 転写因子共発現ベクターの構築とその実験系

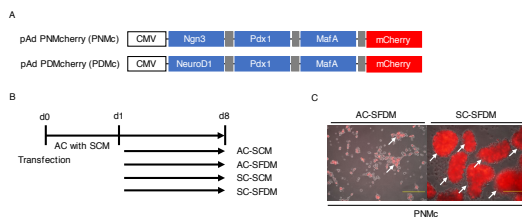


図2

次に我々は結果 1 で示した転写因子群を共発現する新たなアデノウイルスベクターを構築した. 各転写因子の発現量を均一化するため, 手足口病ウイルス 2A ペプチドを用いた(図 2A).

Liver-to-pancreas transdifferentiation を効率化しうる培養環境として, 我々は以下の 2 点に着目した.

- ① 培養方法(接着培養もしくは三次元培養)
- ② 培養液組成(血清含有培地 (serum-contained medium : SCM) もしくは添加因子付与無血清培地 (serum-free

differentiation medium : SFDM))

SFDM に付与した添加因子は, ヒト iPS/ES 細胞を用いた膵β細胞誘導条件, 特に内分泌細胞への分化誘導過程に用いられる物質から選定した. 図 2B に実験シエマを示す. 遺伝子導入細胞を 24 時間接着培養した後に, 接着培養 (adherent culture : AC) もしくは三次元培養 (suspension culture : SC) の各条件で再度培養する. 培養液は SCM もしくは SFDM とし, 7 日間の培養過程を経て評価する. 図 2C は 7 日間培養後の細胞の状態を示した像である. SC においては多数のスフェロイドが確認されるのに対し, AC でもコロニー形成が見られるがごく少数であった.

結果 3 : SFDM を用いた 3 次元培養がインスリン産生細胞に特化した分化誘導に適していた

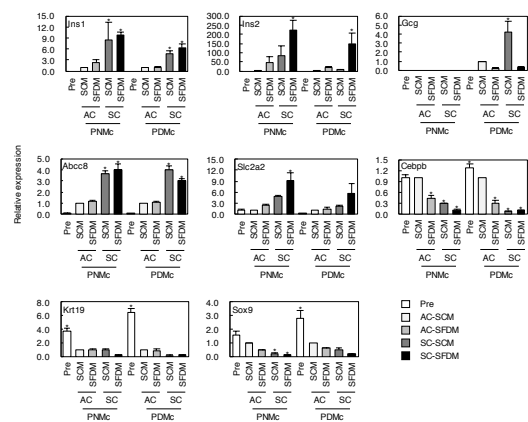


図3

結果 2 で示したアデノウイルスベクター及び実験シエマに基づき, 我々はまず分化転換誘導細胞の遺伝子発現性を real-time PCR にて評価した(図 3). 結果, インスリン遺伝子の発現性は投与したアデノウイルスベクターの種類に関わらず SC-SFDM 培養環境において有意に上昇した. 対照的にグルカゴン遺伝子の発現は見られない, もしくは他培養条件よりも低値であり, SC-SFDM の適応によりインスリン産生細胞に特化した遺伝子発現形質を獲得しうることを示された. 更に SC-SFDM 適応細胞は膵β細胞の特異的発現形質である sulfonylureas receptor 1 (Abcc8), および glucose transporter 2 (Slc2a2) 各遺伝子発現の亢進も伴っており, 膵β細胞の遺伝子発現形質に類似した細胞に分化し得ている可能性を示唆する結果であった.

他方 PBLHCs が元々有している肝及び胆管細胞形質は, SC-SFDM の適応により有意に減弱した(肝細胞形質 : CCAAT-enhancer-binding proteins β (Cebpb), 胆管細胞形質 : Keratin 19 (Krt19) および Sox9).

これらの結果は, 遺伝子導入細胞に対する SC-SFDM の適応により, 元々の肝/胆管細胞の形質が減弱し, かつ膵β細胞特異的発現形質の獲得が促進する可能性を推測させるものであった.

結果 4 : SFDM の適応と 3 次元培養は相互依存的に作用し遺伝子導入細胞の機能的成熟を促進する

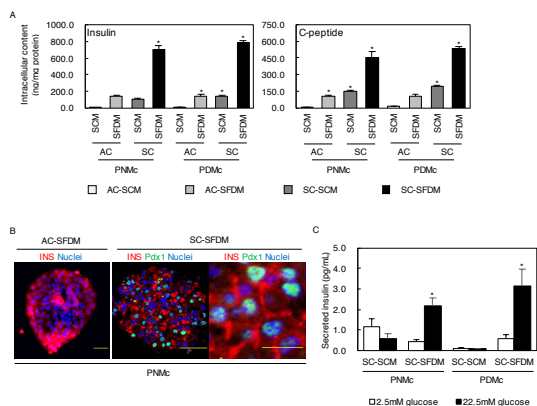


図4

我々は分化転換誘導細胞のインスリン蛋白発現性に関しても同様に比較解析した. 細胞内インスリン及び内因性インスリン分泌の指標である C ペプチドの発現量は SC-SFDM 細胞において有意に亢進し (図 4A), 免疫染色ではインスリン陽性のスフェロイド形成を確認し得た (図 4B). これらの所見は SC-SFDM の適応による分化転換誘導性の亢進を示唆するものであった. 我々は更に分化転換誘導細胞の機能解析を, 三次元培養適応細胞に関して比較解析した (図 4C). 同じ培養方法を適応した細胞はあるものの, SCM にて分化誘導した細胞は細胞外グルコース濃度に応じた血糖応答性を示さなかったのに対し, SFDM を用いた細胞では成熟 β 細胞と同様の応答性を示した. これらの結果は SFDM の適応と 3 次元培養は相互依存的に作用し遺伝子導入細胞の機能的成熟を促進することを示すものであると考えられた.

結果 5 : 分化転換細胞は糖尿病モデルマウスに対する腎被膜下移植において血糖値抑制作用を発揮した

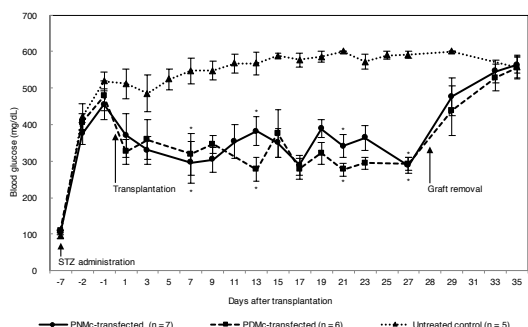


図5

最後に我々は SC-SFDM で分化誘導した細胞の移植実験を施行した. 図 5 で示す通り, 導入したアデノウイルスベクターの種類に関わらず移植後 7 日間で非移植コントロールマウスに比し有意な血糖低下を示し, これは移植後 27 日目まで継続した. 腎摘出により移植グラフトを摘出すると, 血糖値は速やかに上昇

し非移植コントロールマウスと同等の値に服した. この結果は分化転換誘導細胞の機能は *in vivo* でも有効であることを示唆する結果であった.

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 23 件)

1. Nakamura M, Yokoyama T, Miyagawa S (17 番目), Takada T. 他 17 名 Multicenter comparative study of laparoscopic and open distal pancreatectomy using propensity score-matching. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2015 Oct;22(10):731-6. (査読有)
2. Yokoyama T, Kobayashi A, Shimizu A, Motoyama H, Miyagawa S. Laparoscopic repair for a previously unreported form of ventral hernia on the right iliac fossa in an elderly emaciated woman. Hernia. 2015 Oct;19(5):841-3. (査読有)
3. Takeuchi D, Miyagawa S (8 番目). 他 6 名 Postoperative complications in elderly patients with gastric cancer. J Surg Res. 2015 Oct;198(2):317-26. (査読有)
4. Shimizu A, Kobayashi A (2 番目), Motoyama H (3 番目), Miyagawa S (9 番目). 他 5 名 Features of acute liver congestion on gadoxetate disodium-enhanced MRI in a rat model: Role of organic anion-transporting polypeptide 1A1. J Magn Reson Imaging. 2015 Sep;42(3):828-36. (査読有)
5. Urata K, Kobayashi A (5 番目), Miyagawa S (9 番目). 他 6 名 Living-Donor Liver Transplantation for Hepatic Metastasis From Meningeal Hemangiopericytoma: A Case Report. Transplant Proc. 2015 Sep;47(7):2274-7. (査読有)
6. Nakamura H, Shiota T, Miyagawa S (16 番目), Shibata T. 他 13 名 Genomic spectra of biliary tract cancer. Nat Genet. 2015 Sep;47(9):1003-10. (査読有)
7. Shiota T, Miyagawa S (8 番目), Shibata T. 他 6 名 Heat Shock Protein 90 Is a Potential Therapeutic Target in Cholangiocarcinoma. Mol Cancer Ther. 2015 Sep;14(9):1985-93. (査読有)
8. Furusawa N, Kobayashi A (2 番目), Shimizu A, Motoyama H (5 番目), Miyagawa S (10 番目). 他 5 名 Biliary tract variations of the left liver with special reference to the left

- medial sectional bile duct in 500 patients. *Am J Surg.* 2015 Aug;210(2):351-6. (査読有)
9. Arai T, Kobayashi A (2 番目), Shimizu A, Motoyama H (7 番目), Miyagawa S (12 番目). 他 7 名 Signal intensity of the pancreas on magnetic resonance imaging: Prediction of postoperative pancreatic fistula after a distal pancreatectomy using a triple-row stapler. *Pancreatology.* 2015 Jul-Aug;15(4):380-6. (査読有)
 10. Takeuchi D, Miyagawa S (5 番目). 他 3 名 Prevalence and management of colorectal neoplasia in surgically treated esophageal cancer patients. *Int J Surg.* 2015 May;17:60-6. (査読有)
 11. Shirota T, Shimizu A, Kobayashi A (10 番目), Miyagawa S (12 番目). 他 8 名 Successful living donor liver transplantation for acute liver failure after acetylsalicylic acid overdose. *Clin J Gastroenterol.* 2015 Apr;8(2):97-102. (査読有)
 12. Motoyama H (1 番目), Kobayashi A (2 番目), Shimizu A, Miyagawa S (12 番目). 他 8 名 Impact of advanced age on the short- and long-term outcomes in patients undergoing hepatectomy for hepatocellular carcinoma: a single-center analysis over a 20-year period. *Am J Surg.* 2015 Apr;209(4):733-41. (査読有)
 13. Motoyama H (1 番目), Kobayashi A (2 番目), Shimizu A, Miyagawa S (10 番目). 他 6 名 An initial case report of a laparoscopic spleen-preserving distal pancreatectomy for a patient with a pancreatic metastasis of malignant melanoma. *Shinshu Med J.* 2015;63(1):19-24. (査読有)
 14. Shimizu A, Kobayashi A (2 番目), Motoyama H (7 番目), Miyagawa S (10 番目). 他 6 名 Effect of application of subcutaneous suction drainage with subcuticular sutures for wound closure on the incidence of incisional surgical site infection following elective general abdominal surgery: A randomized controlled trial. *Shinshu Med J.* 2015;63(2):91-101. (査読有)
 15. Motoyama H (1 番目), Kobayashi A (2 番目), Shimizu A, Miyagawa S (10 番目). 他 6 名 Liver failure after hepatocellular carcinoma surgery. *Langenbecks Arch Surg.* 2014 Dec;399(8):1047-55. (査読有)
 16. Furusawa N, Kobayashi A, Yokoyama T, Shimizu A, Motoyama H, Miyagawa S. Surgical treatment of 144 cases of hilar cholangiocarcinoma without liver-related mortality. *World J Surg.* 2014 May;38(5):1164-76. (査読有)
 17. Ohno Y, Kobayashi A (7 番目), Miyagawa S (8 番目). 他 5 名 Successful active immunization using a hepatitis B virus vaccination protocol for a recipient with hepatitis B core antibody-positive liver graft. *Transplant Proc.* 2014 Apr;46(3):721-5. (査読有)
 18. Mita A, Kobayashi A (8 番目), Miyagawa S (9 番目). 他 6 名 Optimal initial dose of orally administered once-daily extended-release tacrolimus following intravenous tacrolimus therapy after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014 Apr;46(3):794-6. (査読有)
 19. Takeuchi D, Miyagawa S (6 番目). Relationships of obesity and diabetes mellitus to other primary cancers in surgically treated gastric cancer patients. *Int J Surg.* 2014;12(6):587-93. (査読有)
 20. Suzuki A, Miyagawa S (7 番目). 他 5 名 Prevalence of synchronous colorectal neoplasms in surgically treated gastric cancer patients and significance of screening colonoscopy. *Dig Endosc.* 2014 May;26(3):396-402. (査読有)
 21. Hiraga R, Kato M, Miyagawa S, Kamata T. Nox4-derived ROS signaling contributes to TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* 2013 Oct;33(10):4431-8. (査読有)
 22. Shindo T, Miyagawa S (8 番目). 他 6 名 Regulation of adrenomedullin and its family peptide by RAMP system-- lessons from genetically engineered mice. *Curr Protein Pept Sci.* 2013 Aug;14(5):347-57. (査読有)
 23. Kitagawa N, Miyagawa S (8 番目), Shibata T. 他 7 名 Downregulation of the microRNA biogenesis components and its association with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2013 May;104(5):543-51. (査読有)
- [学会発表] (計 1 件)
1. 「肝(由来)細胞を用いた膵内分泌細胞分化誘導」, 本山 博章, 第 114 回 日本外科学会定期学術集会, 2014 年 4 月 4 日, 京都
 6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 聡 (KOBAYASHI, Akira)
信州大学・学術研究院医学系・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・学術研究院医学系 (医学部附属
病院)・助教
研究者番号：20569587

宮川 眞一 (MIYAGAWA, Shin-ichi)
信州大学・学術研究院医学系, 教授
研究者番号：80229806