

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 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791282

研究課題名（和文）

肝血流改変と遺伝子導入による全膵機能再生の試み

研究課題名（英文）

Approaches to regenerate pancreatic function by converting liver blood flow and transferring specific gene

研究代表者

藤野 和典（FUJINO KAZUNORI）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：70402716

研究成果の概要（和文）：

我々は肝臓に門脈よりの血流を遮断すると、肝臓内に膵内外分泌細胞の細胞塊が生じることを発見したが、これらの細胞塊は分泌顆粒を持たない未成熟なものであった。本研究においては、これらの膵内外分泌細胞に分化促進因子を導入する遺伝子治療を組み合わせ、肝臓から膵臓の再生が可能か否かを試みたものであった。ファージベクターを作成し、マウス尾静脈より投与したが、残念ながらベクターの十分な肝臓、胆管への取り込み、遺伝子発現を認めることは出来なかった。今後も引き続き検討を行いたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：

Although we found the both anti-insulin and anti-trypsin positive cells in the liver that interrupted portal blood flow by the immunohistochemical study, that immature cell cluster didn't have any secretory granules. In this study, we attempted to introduce differentiation enhancing factor to the cluster by gene therapy, and generate pancreatic endocrine and exocrine cells. Although we try to make phage vector to deliver differentiation enhancing factor to the cluster for these research period, we couldn't find adequate amount vector-transfected cells in both the liver and bile duct. We will continue to make vector for it in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵再生 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

膵臓の広範な外科的切除にともなう膵内外分泌不全患者や毎日のインスリン自己注

射が必要な 1 型糖尿病患者では、膵移植ならびに膵島移植による治療の有用性が報告されているが、免疫抑制剤の使用や治療後

出現する移植臓器不全が生じることにより、QOLの低下や継続した治療が必要で、未だ完全な治療法には至っていないのが現状である。そこで我々は、膵臓と発生学的に似た性質を持つ肝臓を標的とし、肝臓を膵機能の再生する場として利用することを考えたことが研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

我々は肝血流を改変することにより、膵内外分泌細胞の細胞塊が肝臓内に生じることを発見したものの、これらの細胞塊は分泌顆粒を持たない未成熟なものであった。そこでその細胞塊に遺伝子治療によって新たな分化誘導遺伝子が導入し、肝臓内での膵臓機能再生を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ファージベクターの作成

任意の配列の合成 DNA が、M13 ファージ (M13KE) のコート蛋白 p III の N 末端に挿入され、ファージ粒子外側に任意のペプチド配列が提示される特徴を持つ Ph. D. C7CPhage Display Peptide Library およびそれを含む関連キットに由来する組み替え体 M13 ファージ試料を、大腸菌を宿主とさせ増殖し、ファージライブラリーを尾静脈より注入。肝臓、及び胆管を取り出す。その両者毎により高い結合能を示すペプチドを、その表面に発現したファージのプールから選択的に濃縮し、それを増殖させ、更なる濃縮操作に備える作業 (パニング操作) を繰り返す。肝臓、胆管にそれぞれ結合能を示すそれぞれ特定のファージクローンから調剤した DNA 配列解析を行い、結合配列を同定する。これにより得られた可変領域ならびに p III コード部分を含む DNA 断片を取り出し、TOYOBO 社製 M13mp18RFI の p III を含む相同領域と変換することにより

ファージベクターを作成する。

(2) 肝血流改変—外科的膵内外分泌不全モデル動物へのファージベクターの投与。

95%膵切除および右門脈を結紮し、肝血流改変—膵内外分泌不全モデル動物マウスを作成する。その後、胆嚢を摘出し、胆嚢管より外径約 0.3 mm のカテーテルを挿入し、総胆管内に留置。肝右葉以外へ流れないように胆管をクランプしファージベクターを投与し、膵内外分泌細胞を誘導する。

4. 研究成果

Ph. D. C7CPhage Display Peptide Library およびそれを含む関連キットに由来する組み替え体 M13 ファージ試料を、大腸菌を宿主とさせ増殖させ、ファージライブラリーを尾静脈より注入した。その後、肝臓、及び胆管を取り出し、その両者毎により高い結合能を示すペプチドを、その表面に発現したファージのプールを選択し、それを増殖させ、更なる濃縮操作に備える作業を繰り返したところ、平成 21 年度は数種類のファージを同定しえた。DNA 配列解析を行い、結合配列を同定。GFP 遺伝子とともに TOYOBO 社製 M13mp18RFI の p III を含む相同領域と変換し、ファージベクターとしてマウス尾静脈より投与したところが、残念ながら肝臓、胆管への十分な取り込みを認めるには至らなかった。今後は再度ファージのプールを選択し、あらたなベクターを作製していく予定である。

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 3 件)

- ① Li Y, Kojima H, Fujino K, Matsumura K, Katagi M, Urabe H, Chan L, Eguchi Y, Zhao L, Kimura H.
Homing of the bone marrow-derived interstitial cells of Cajal is decreased in diabetic mouse intestine.

J Gastroenterol Hepatol, Vol. 26, no. 6, pp. 1072-1078, 2011, 査読あり。

- ② Asakawa A, Ataka K, Fujino K, Chen CY, Kato I, Fujimiya M, Inui A. Ghrelin family of peptides and gut motility. J Gastroenterol Hepatol, suppl no. 3, pp. 73-74, 2011, 査読あり
- ③ Asakawa A, Fujimiya M, Niijima A, Fujino K, Kodama N, Sato Y, Kato I, Nanba H, Laviano A, Meguid MM, Inui A. Parathyroid hormone-related protein has an anorexigenic activity via activation of hypothalamic urocortins 2 and 3. Psychoneuroendocrinology, Vol. 35, No. 8, pp. 1178-1186, 2010, 査読あり。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 和典 (FUJINO KAZUNORI)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：70402716