

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861207

研究課題名(和文) 膵星細胞特異的な遺伝子制御による膵再生の促進

研究課題名(英文) Pancreatic stellate cells specific HSP47 genetic control promote pancreatic regeneration

研究代表者

太田 盛道(Ota, Shigenori)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90457705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵腺房細胞及び膵ラ氏島細胞は、膵90%部分切除後に著明な細胞増殖を示した。また、膵腺房細胞と膵星細胞を共培養することで、膵腺房細胞の細胞増殖は促進された。活性型膵星細胞で強く発現されるHeat Shock Protein47(HSP47)が、膵腺房細胞増殖に重要な役割を果たしており、同事象はvivoならびにvitroにおいて膵星細胞のHSP47をsiRNAにてノックダウンすることにて確認された。活性型膵星細胞におけるHSP47発現及びコラーゲン産生が膵腺房細胞、膵ラ氏島細胞の分化増殖を制御している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic acinar cells(Pacs) and Islet cells(Ics) vigorously proliferated after 90% pancreatectomy. In addition, Pacs proliferation was facilitated by co-culture with pancreatic stellate cells(Pscs). HSP 47 activation in Pscs plays an important role in the proliferation of Pacs, which was totally blocked by HSP47-specific siRNA delivery in vivo and in vitro. Therefore, HSP47 expression in Pscs would be necessary to promote pancreatic regeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵再生 膵星細胞 再生医療 HSP47 薬物輸送システム

1. 研究開始当初の背景

膵臓はこれまで組織再生の起こりにくい臓器として考えられていたが、膵臓部分切除を施すと膵臓組織の再生が起こることが確認されている。組織の再生にはわずかに存在する組織幹細胞の分化・増殖が関与しており、組織幹細胞の分化・増殖にはニッシュといわれる周囲の細胞の存在が必要であると考えられている。しかしながら、膵臓組織再生におけるメカニズムは十分に明らかとされていない。そこで本研究では、膵幹細胞のニッシュを形成すると考えている膵星細胞が、膵臓部分切除後の膵臓再生においてどのように関与しているかを調べることを目的とする。本研究で得られた成果は、組織再生のメカニズムの解明、およびそのメカニズムを利用した臨床応用における新規治療法の開発において十分に意義のあるものであるといえる。

2. 研究の目的

膵星細胞は正常膵において、主に膵腺房細胞周囲、血管周囲や導管周囲に分布している。通常、膵星細胞は静止状態であり、細胞質にビタミン A を含む多数の脂肪滴を有する。しかし、膵に傷害や炎症が起こると、炎症細胞などからの刺激を受けて膵星細胞は脂肪滴を失い、SMA 陽性の活性型星細胞となり、コラーゲンを活発に産生しながら増殖し、細胞外マトリックス形成に深く関与する事が知られている。これまで膵星細胞と膵腺房細胞の関係については、障害を受けた膵腺房細胞が膵星細胞を刺激する、膵星細胞が膵腺房細胞の外分泌機能に関与している等の報告があるが、これまで膵再生に膵星細胞の関与が示唆されてはいるものの、詳細な膵腺房細胞の分化増殖に関する膵星細胞の役割は明らかになっていない。

膵臓再生の研究においては、膵内分泌細胞の再生に首座が置かれることが多いが、消化吸収における膵外分泌能の役割は決して小さいものではない。特に膵外分泌機能が著しく低下する膵亜全摘や、非代償期の慢性膵炎などの病態においては、消化吸収不良により生じる下痢や慢性低栄養状態は糖尿病と共に患者の QOL を著しく損なうものである。我々は、膵星細胞が vitamin A (VA) を取り込むという事実に着目し、VA を表出しているリポソームを作成した上で、コラーゲンの特異的シャペロン蛋白に対する siRNA をその中に含有させた薬剤 (VA-liposome siRNA gp46) が星細胞に対するコラーゲン産生の抑制効果を示し、ラットの慢性膵炎モデルにおいて極めて高い有効性を示したことをこれまでに報告してきた。さらに、肝再生においては Collagen を中心とした ECM が重要であることがこれまでに報告されていることから、今回我々はラット膵部分切除モデルを用いて、膵星細胞が多数存在する Regeneration Foci 領域とその他の領域に区分し、VA-liposome siRNA gp46 投与により膵星細胞からの ECM 産

生を抑制することで、場所毎における膵腺房細胞の増殖の変化を検証し、膵星細胞が膵腺房細胞の増殖・分化にどのように影響を及ぼしているかを、液性因子を含めて解析した。膵腺房細胞からランゲルハンス島への分化を示したという報告もあることから、最終的にはランゲルハンス島を含む膵臓全体の再生を誘導する事で臨床応用を目指している。

3. 研究の方法

膵部分切除後における膵再生事象の検証

これまで、膵切除後の膵再生においては、膵切除量が多いほど再生後の膵重量もまた増加するということが知られている。切除後早期 (Day3) における膵組織再生の誘導事象を確認すべく、細胞増殖の指標である BrdU を用いて、膵実質の大部分を占める膵腺房細胞ならびにランゲルハンス島に関して検証した。群分けは 70%膵切除群 (70%Px)、90%膵切除群 (90%Px) と非切除群を比較した (各群 n=5)。さらに最終的な再生後の膵重量評価は Day56 における Parabiliary segment における膵重量測定にて行った。

膵星細胞に対する VA-Lip siRNA gp46 投与効果の検証

肝星細胞同様に、膵星細胞における collagen 産生は Heat shock protein47 (gp46) により補助を受けて行われると考えられており、同薬の膵星細胞に対する collagen 産生抑制効果は Ishiwatari らにより報告されている。VA-liposome siRNA gp46 の膵星細胞に対する gp46KD 効果並びに静止期における膵星細胞増殖に対する効果を検証すべく、以下の方法にて分離した膵星細胞を 1 日培養し、翌日に VA-liposome siRNA gp46 (gp46 群)、VA-liposome siRNA scramble (Sc 群) を transfection し、投薬しない群と比較した。ラット 90%PPx モデルにおける膵組織への VA-Lip siRNA gp46-Cy5 の導入検討

in vivo において実際に薬剤が膵星細胞に導入されていることを確認すべく、90%Px ラットの尾静脈へ Cy5 標識した VA-liposome siRNA gp46 Cy5 を投与し (Cy5 群)、ex-vivo imaging を用いて Cy5 filter における ROI を測定した。

また、膵内において膵星細胞に VA-liposome siRNA gp46 が導入されている事を検討するため、Cy5 標識された薬剤投与を行った 90%Px ラットより膵星細胞を分離し、活性型星細胞のマーカーである SMA による蛍光免疫染色 (二次抗体に Alexa 488 を使用) を施行した後に FACS Canto サイトフローメーター (Becton Dickinson, CA, USA) にて解析した。90%Px Day3,5 における VA-Lip siRNA gp46 投与による膵再生の変化検証

肝切除後の肝再生には ECM および ECM を産生する肝星細胞が関与している事が報告されている。肝同様に再生が誘導されるラット膵切除モデルにおいても、膵切除後に膵星細胞が再生に関与している可能性が高く、再生

がより誘導されるラット 90%膵切除モデルを用いて VA-liposome siRNA gp46 投与群(gp46群)と、非投薬群(NT群)を比較検証した。90%Px Day3,5におけるVA-Lip siRNA gp46投与による十二指腸領域の線維量、gp46陽性細胞の変化検証

ラット 90%Px モデルにて Day3 では VA-liposome siRNA gp46 投与にて十二指腸領域における膵腺房細胞の増殖率低下が示された。これまで in vitro においては VA-liposome siRNA gp46 投与において、膵星細胞の Collagen 産生抑制効果ならびに膵星細胞増殖抑制効果が示されている。そこで、90%膵切除のみを行う群(NT群)および90%膵切除し、VA-liposome siRNA gp46 投与を行う群(gp46群)が十二指腸側領域における gp46 陽性細胞すなわち膵星細胞数や、ECM 量と相関するかについて免疫組織染色を用いて検討した。

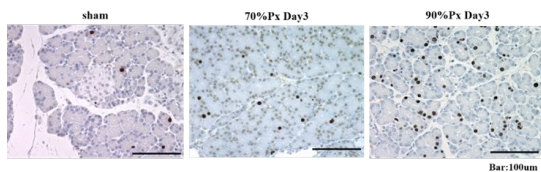
フローサイトメトリーによる膵腺房細胞の増殖率解析

膵腺房細胞の単独培養および膵星細胞と膵腺房細胞の共培養における細胞増殖率をフローサイトメトリーにおいて解析した。正常膵組織および90%膵切除を施した膵臓から膵腺房細胞を採取し、GFP ラットから採取したPSCとのco-cultureする群と、腺房細胞単独培養する群に分け、BrdU添加培地にて6時間培養後にBrdU抗体による蛍光免疫細胞染色を施したのち、フローサイトメトリーにてBrdU陽性率を検証した。

4. 研究成果

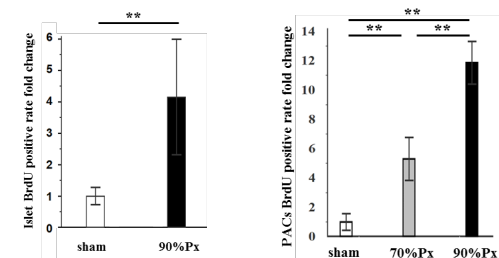
PPx Day3における膵細胞増殖

膵 90%部分切除モデルにおいては膵腺房細胞のみならずランゲルハンス島内細胞においても再生の誘導が認められた(図1-a)。



(図1-a)

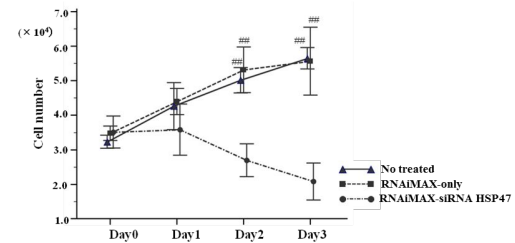
最終膵重量：全身麻酔下に6週齢ラットに膵部分切除術を施行し、Day56(14週齢)に残膵を摘出して膵重量を測定した。Parabiliary segmentの膵重量はShamに対し、70%,90%Px群では膵重量が有意に増加し(P<0.05, P<0.01)、膵切除量に応じて膵再生量が増加する結果となった(図1-b)。



(図1-b)

膵星細胞に対するVA-Lip siRNA gp46投与効果

gp46のmRNA量に関する検討では、Day3までほぼ完全にgp46のKnock Downが確認されていることが確認された。また、膵星細胞数に関しては、Day2,Day3においてshamに比較して、gp46群、Sc群でそれぞれ有意に膵星細胞の増殖抑制効果が確認された(図2:P<0.05,P<0.05)。

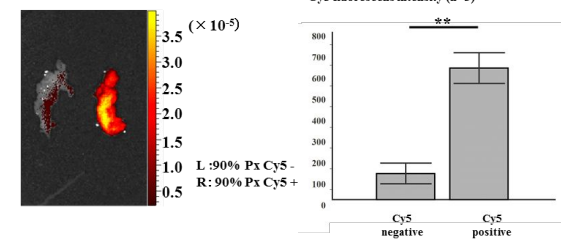


(図2)

90%PPx膵組織へのVA-Lip siRNA gp46-Cy5導入

目的とする膵星細胞を分離し、同細胞におけるCy5蛍光のMFIを測定したが、非投与でMFI=1.3×10²、薬剤投与群でMFI=6.3×10²であり、73.4%の細胞でCy5が陽性であることが確認された(図3)。

1. Cy5 filter Ex-vivo imaging



(図3)

90%PPx Day3,5における膵細胞増殖率変化

【Day3】腺房細胞：NT群と薬剤投与の影響を比較検討した結果、十二指腸領域において、gp46群のBrdU陽性率が有意に低下した(P<0.01)。また、Regeneration Fociにおいては両群間に有意差を認めなかった。

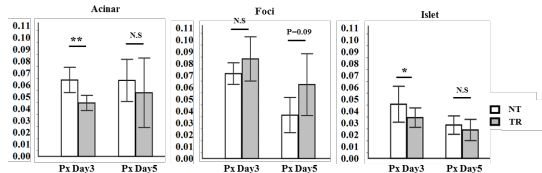
ランゲルハンス島：NT, gp46両群間で細胞総数には差を認めないものの、NT群と薬剤投与の影響を比較検討した結果、十二指腸領域において、gp46群のBrdU陽性率が有意に低下した(P<0.05)。

以上より、Day3においては、薬剤投与により十二指腸領域において腺房細胞ならびにランゲルハンス島内細胞増殖率が低下するという結果となった。

【Day5】腺房細胞：NT, gp46両群間の比較検討を行なったが、十二指腸領域におけるBrdU陽性率はgp46群で低下傾向に留まった。しかし一方で、組織像で示されるようにcollagen richなFociにおいてはNT群に比してgp46群でBrdU陽性率の上昇傾向を認めた(P=0.09)。

ランゲルハンス島：NT群とgp46群間のBrdU

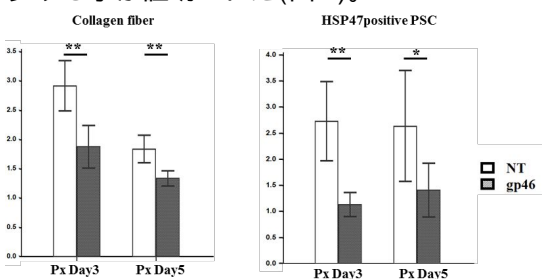
陽性率共に有意差を認めなかった。Day3 NT群と比較すると、Day5 NT群において細胞増殖率は有意に低い($P < 0.01$)ことが、治療による効果に影響したとも考えられた(図4)。



(図4)

90%PPx Day3,5における線維量、gp46陽性膵細胞数変化

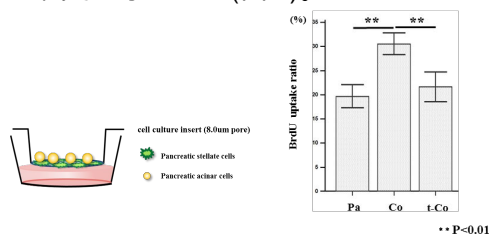
Day3, Day5においては、90%膵切除により増加した線維量および膵星細胞数がVA-liposome siRNA gp46投与により有意に減少する事が証明された(図5)。



(図5)

膵星細胞と膵腺房細胞共培養時の細胞増殖変化

膵星細胞と膵腺房細胞の共培養系を確立し、細胞増殖率をフローサイトメトリーにて検証した。膵腺房細胞の単独培養(Ac)群と比較して膵星細胞と膵腺房細胞の共培養(Co)群では細胞増殖率が有為に上昇し、ならびにsiRNA HSP47を事前に transfectionした膵星細胞との共培養(T-Co)群における膵腺房細胞の増殖率は単独培養と同程度にまで低下し、膵腺房細胞増殖に膵星細胞およびコラーゲンの関与が示された(図6)。



(図6)

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2件)

1. Birukawa NK, Murase K, Sato Y, Kosaka A, Yoneda A, Nishita H, Fujita R, Nishimura M, Ninomiya T, Kajiwara K, Miyazaki M, Nakashima Y, Ota S, Murakami Y, Tanaka Y, Minomi K, Tamura Y, Niitsu Y.

Activated hepatic stellate cells are dependent on self collagen, cleaved by membrane type 1-matrix metalloproteinase for their growth.

J Biol Chem, 査読有, 2014 289:20209-21.
2. Ishiwatari H, Sato Y, Murase K, Yoneda A, Fujita R, Nishita H, Birukawa NK, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Takimoto R, Kobune M, Ota S, Kimura Y, Hirata K, Kato J, Niitsu Y.

Treatment of pancreatic fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone in vitamin A-coupled liposomes. Gut, 査読有, 2013;62(9):1328-39.

[学会発表](計3件)

1. Ota S, Mizuguchi T, Nishimura M, Ishi M, Okita K, Nishidate T, Nobuoka T, Kimura Y, Niitsu Y, Hirata K.

Vitamin A-Binding Liposome Containing Heat Shock Protein 47 siRNA Regulates Pancreatic Regeneration (Young Investigator Award).

45th Anniversary Meeting of APA & JPS: November 5-8, 2014: the Big Island of Hawaii (USA).

2. 太田 盛道, 水口 徹, 目黒 誠, 信岡 隆幸, 木村 康利, 古畑 智久, 新津 洋司郎, 平田 公一

HSP47 遺伝子制御による膵星細胞特異的制御と膵再生の検証.

第69回日本消化器外科学会総会:2014年7月16日-18日:郡山総合体育館(福島).

3. 太田 盛道, 水口 徹, 木村 康利, 新津 洋司郎, 平田 公一. 膵星細胞特異的 DDS を用いた線維化溶解療法の臨床応用に向けた基礎研究 (若手優秀演題賞:肝胆膵).

第114回日本外科学会定期学術集会:2014年4月3日-5日:京都国際会議場(京都).

[図書](計1件)

1. 太田 盛道, 平田 公一. 臓器星細胞の機能 肝炎・肝硬変と星細胞. Surgery Frontier Vol.20 No.3, 76-78, 2013.

[産業財産権]

出願状況(計0件) 取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田 盛道(OTA SHIGENORI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号:90457705