

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K10182

研究課題名(和文) 部分肝への遺伝子治療による膵臓再生の試み

研究課題名(英文) Approaches to regenerate the pancreas by gene therapy using a partial liver

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：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型糖尿病患者においては、自己による膵機能の再生が望まれている。申請者は、膵臓と発生学的に近く、機能的に余裕がある肝臓に、膵臓再生のマスター遺伝子として知られる分化誘導遺伝子であるPdx-1を組み込んだベクターを投与し、全膵機能の再生が可能か否かを試みた。肝臓に系胆道的にpdx-1を組み込んだ遺伝子輸送ベクターを投与したところ、インスリン、トリプシンを発現する細胞を誘導することが出来た。しかし、発現細胞は少数にとどまっていたため、膵機能を代替できる能力まで発展させることが今後の課題であると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による成果としては一つ目に、門脈遮断により肝臓内に未成熟な膵内外分泌細胞が出現したことがある。門脈血液中には肝臓を膵臓に分化させない因子が存在することが示唆され、今後肝臓にて膵島移植をする際に、膵島の生着期間を延長させ得る新たな手法の開発につながる可能性があると考えている。もう一つの成果としては、今後さらに詳細な検討を行わなければならないが、pd-1遺伝子の導入を系胆道的に行えたことにある。この投与方法により、膵外分泌酵素は胆道を経由して消化管に、膵内分泌ホルモンは肝静脈を介し全身に流れることが可能となり得る。本研究の成果にて、全膵機能を備えた臓器再生の可能性が見い出せたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Regeneration of autologous pancreatic function is desired in patients with pancreatic internal and external secretion deficiencies associated with extensive surgical resection of the pancreas and in patients with type 1 diabetes who require daily insulin self-injections. Liver was selected to try to regenerate pancreas function because liver is embryologically close to the pancreas and has a good functional reserve. Pdx-1, master gene of the differentiation inducer for pancreatic regeneration, was administered incorporated with a vector via biliary duct. After the administration of the vector, insulin-positive cells and trypsin positive cells were observed in the liver portal area. However, the number of cells expressing insulin and trypsin is still small amount, it is future issues to develop the ability to replace the pancreatic function.

研究分野：再生医療、臓器不全

キーワード：膵再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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型糖尿病患者においては、現在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。しかし、膵移植においては圧倒的にドナー不足の状態が続いており、膵島移植に関しても膵移植と同様に終生免疫抑制剤が必要となり、未だ完全な治療法には至っていない。また、近年目覚ましい発展を遂げている幹細胞を用いた再生医療領域に於いても、ES 細胞、iPS 細胞より、インスリン分泌能をもつ細胞の作成に成功はしているが、奇形種や癌化のリスクもあり、臨床応用に十分な成果は出ていない。この領域における新たな breakthrough が強く望まれている。

申請者は細胞単位での再生による移植は不完全な治療であると考え、細胞単位では無く、臓器単位の再生が可能か否かを考えてきた。そこで、膵臓を再生させるための臓器として、膵臓と発生学的に近い存在であり、機能的に余裕がある肝臓に着目した。

Kojima らは、分化誘導因子である Neuro D ならびに膵島増殖ホルモンである betacellulin の遺伝子を組み込んだ、ヘルパー依存型アデノウイルス (helper-dependent adenovirus: HDAd) をベクターとして作成し、糖尿病マウスの尾静脈より全身投与を行ったところ、肝臓内に膵島が再生され、糖尿病マウスの血糖値を正常まで低下させることに成功した。ところが、膵臓再生のマスター遺伝子として知られる分化誘導遺伝子 Pdx-1 を組み込んだ HDAd を投与した場合には、膵内分泌細胞と同時に膵外分泌酵素の Trypsin を産生する細胞が出現し、膵外分泌酵素の消化管への経路が無いため、急性肝炎を来たし、動物が死亡したと報告している(1)。この一連の研究において、肝臓は転写因子の遺伝子導入により膵内外分泌細胞へと分化誘導しうることが証明された。しかし、肝炎の発症を防ぐためには膵外酵素が消化管に流れるような再生方法が必要であることも示唆された。

以上の結果により、遺伝子導入を行う細胞を肝全体ではなく、幹細胞に近い肝細胞や胆管細胞に選択的に行うことが出来れば、外分泌酵素は胆道を介して十二指腸に、内分泌は肝静脈を介して全身に分泌できる再生が可能となり、全膵機能の再生である臓器の再生が可能になるのではないかと考えたことが、本申請の着想に至った理由であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝臓の一部を膵臓に転換することを最終目的としている。そのため以下の方針にて研究を進めた。

肝血流改変(門脈血遮断肝) - 膵内外分泌不全(広範囲膵切除)モデル動物マウスにおける肝臓に生じる変化について観察すること。

肝臓あるいは胆管の細胞に対する特異的な結合性を持つ、標的化 HDAd ベクターを作成すること
肝血流改変 - 膵内外分泌不全モデル動物マウスの分離肝へ標的化 HDAd ベクターを投与し、肝臓に生じる変化を観察すること

3. 研究の方法

肝血流改変(門脈血遮断肝) - 膵内外分泌不全(広範囲膵切除)モデル動物マウスにおける肝臓に生じる変化の観察

C57BL/6 マウスを全身麻酔下に開腹し、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の作成を試みた。

肝臓あるいは胆管の細胞に対する特異的な結合性を持つ、標的化 HDAd ベクターの作成
組織標的ペプチドを検索するために、ファージライブラリーキットを用いた in vitro ファージディスプレイを用いた。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同定を行った ZIP コードをアデノウイルスに挿入し、分化誘導遺伝子 Pdx-1 を組み込んだ標的化 HDAd ベクターの作成を試みた。

で作成した肝血流改変 - 膵内外分泌不全モデル動物マウスの分離肝へ で作成した標的化 HDAd ベクターを投与し、肝臓に生じる変化の観察を試みる。

4. 研究成果

肝血流改変(門脈血遮断肝) - 膵内外分泌不全(広範囲膵切除)モデル動物マウスにおける肝臓に生じる変化の観察。

まず肝血流改変 膵内外分泌不全マウスを作成後6か月経過したマウス肝臓における変化につき観察を行った。肝臓の構造は大きく変化を認めなかったが(図1b; HE 写真)、一部に抗インスリン抗体で染色陽性となる細胞塊が観察された(図1a; 矢印)。また、共焦点レーザー顕微鏡で確認したところ、この細胞塊は抗トリプシン抗体による染色にても共陽性であった(図1c-e)。電子顕微鏡にてこの陽性細胞を確認したところ、細胞内のインスリン染色陽性部位は分泌顆粒を持たないものであり、不完全な膵内外分泌細胞であることが示唆された。

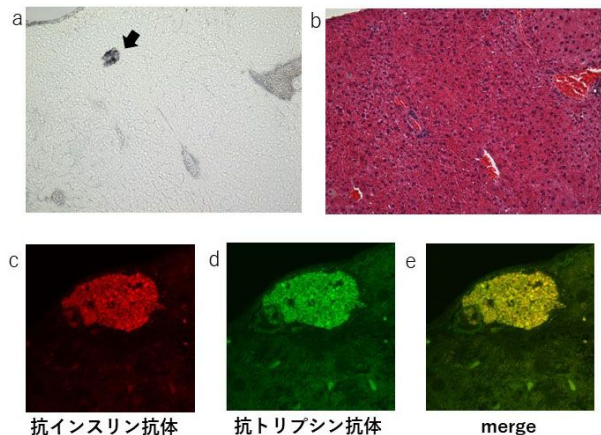


図1: 肝血流改変—膵内外分泌不全マウスにおける肝臓の変化
肝血流改変(門脈血遮断)+膵内外分泌不全(95%膵切除)モデルマウス作成後6か月後に現れた膵内外分泌細胞塊。a: 抗インスリン抗体による免疫染色 b: HE染色 c-e 共焦点レーザー顕微鏡写真

肝臓あるいは胆管の細胞に対する特異的な結合性を持つ、標的化 HDAd ベクターを作成研究期間内に、肝臓あるいは胆管の細胞に対する結合性を持つ、標的化 HADdベクターの作成を試みたが、成功しなかった。

肝血流改変 - 膵内外分泌不全モデル動物マウスの分離肝へ標的化 HDAd ベクターを投与し、肝臓に生じる変化の観察

肝臓あるいは胆管の細胞に対する結合性を持つ、標的化 HADdベクターを作成できなかったため、研究最終年度に他の遺伝子ベクターを用いた実験を開始した。ナノダイヤモンド(Nanodiamond; ND)を用いた遺伝子輸送ベクターを選択し(2)、

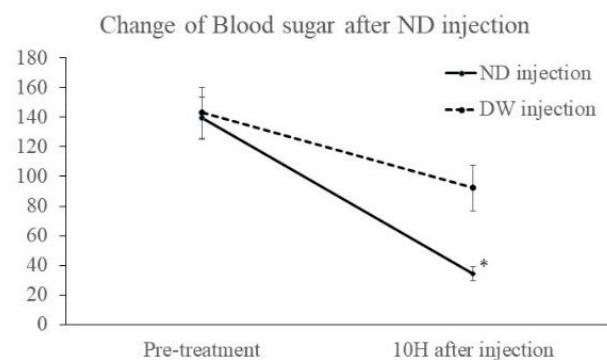


図2: Pdx-1遺伝子導入ND投与による血糖値の変化

図マウスに対し、全身麻酔下に経胆道的にpdx-1含有ND投与を行った。投与後10時間での血糖値は有意に低下した。
* p < 0.05

Pdx-1 遺伝子を導入した ND を系胆道的に投与したところ、マウスは低血糖により 1 日以内に死亡する事例が多く存在した。そのため、術後 12 時間で安楽死させたところ、ND 投与群においては、血糖値が有意に低下していた(図2)。そして肝臓より mRNA を抽出し、cDNA を作成。発現 mRNA につき定量的 PCR にて測定したところ、pdx-1 mRNA はもとより、insulin mRNA が統計学的に有意に上昇していた(図3)。また、優位ではないものの、Trypsin、Amylase の mRNA も上昇傾向にあった。組織上は、肝臓の門脈領域にて、インスリン陽性、トリプシン陽性細胞が観察でき、トリプシン産生細胞の周囲に炎症は認めなかった(図4)。

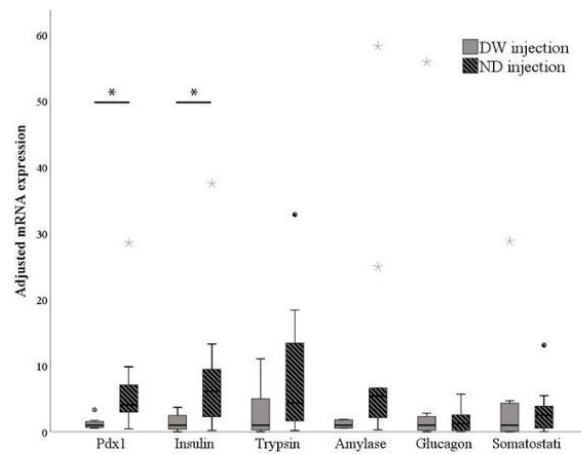


図3; Pdx-1 遺伝子導入 ND 投与による肝臓における mRNA 発現
ND 投与マウス (N=10) においては、DW 投与マウス (N=8) に比し、Pdx-1、Insulin mRNA 発現の有意な上昇を認め、Trypsin、Amylase mRNA 発現の上昇傾向を認めた * DW 投与マウスにおける mRNA 量の中央値を 1 とした発現量を表示

以上の結果より、門脈血流を遮断した肝臓においては、未成熟な膵内外分泌細胞の出現を確認した。門脈血には肝臓を膵臓に分化させない何らかの因子がある可能性が考えられた。また、肝臓に系胆道的に分化誘導遺伝子 pdx-1 を導入したところ、insulin、trypsin の発現を誘導することが出来た。しかし、発現細胞は少数にとどまっております、膵機能を代替できる能力まで発展させることが今後の課題と考えている。

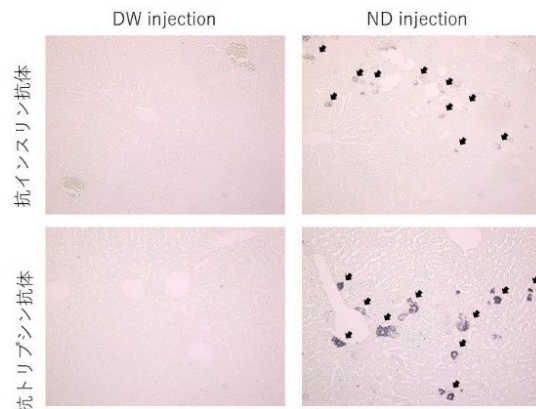


図4; Pdx-1 遺伝子導入 ND 投与による肝臓における変化
ND 投与マウスにおいては、抗インスリン抗体陽性(右上)、抗トリプシン抗体陽性(右下)となる細胞が散見された。

引用文献

- (1) Kojima, Matsumura, et al, Nat Med 2003;9:596
- (2) 小松直樹ら. 滋賀医科大学雑誌 26 巻 1 号 page a3 - a4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松村 一弘 (MATSUMURA Kazuhiro) (50378486)	滋賀医科大学・医学部・特任教授 (14202)	