

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12506

研究課題名(和文) ヒト成体膵前駆細胞の単離と増殖・分化

研究課題名(英文) Isolation, proliferation and differentiation of human adult pancreatic stem cells

研究代表者

長谷川 光一 (Hasegawa, Kouichi)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定拠点講師

研究者番号：50378890

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)：ヒトの膵臓は再生しないとされてきた。最近になって、膵臓に休止した幹細胞(前駆細胞)が存在する可能性が示されたが、この細胞を単離する方法は確立されておらず、研究は殆ど進んでいない。

我々は先行研究で、膵臓を含む内胚葉組織の前駆細胞の表面を認識する抗体を作製した。本研究では、組織化学的解析や生化学的解析から、この抗体は膵前駆細胞の表面を特異的に認識することを解明し、抗原陽性細胞を効率よく単離する方法も開発した。また、この細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、増殖や分化に関与すると考えられるシグナル経路の同定に成功した。現在は、これらの経路を制御可能な化合物等を用いて、その効果を確認中である。

研究成果の概要(英文)：Human adult pancreas has been thought not to have regeneration ability. Recently, putative quiescent pancreatic stem/progenitor cells were discovered. However, study of the cells is still limited because the method for isolating living progenitors is not developed. We have previously developed an antibody which can mark surface of the progenitors in endodermal organs including pancreas. In this study, we discovered that the antibody marks progenitors in pancreas, and developed efficient methods to isolate the progenitors. Utilizing comprehensive gene expression analysis, we also identified several signaling pathways may involve in growth and differentiation of the progenitors. We are examining effect of chemical compounds which can modify the signaling pathways.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：膵臓 組織幹細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

これまで、ヒト成体の膵臓は再生しないとされてきた。慢性膵炎や1型糖尿病、膵癌組織の切除等で膵組織に障害が起こると非可逆性であり、膵移植もしくは膵島移植しか治療法が無く、殆どの場合は対処療法のみが行われてきた。しかし最近になり、膵臓に休止した幹細胞(前駆細胞)が存在する可能性が示され、世界中で自己再生医療の可能性が期待されるようになった(文献1)。このため、ヒト成体の膵前駆細胞を単離し、これを使用した研究が強く求められている。しかし、ヒト膵臓では、この前駆細胞を単離するマーカーや方法が未だ無く、マウス等の動物モデルとヒトとヒトでは膵臓の再生能が著しく異なるため、この分野の研究は殆ど進んでいない。

私どもはこれまでに、ヒト多能性幹細胞から誘導した組織前駆細胞を利用し、内胚葉由来組織の前駆細胞の表面の糖鎖を認識する抗体 GCTM-5 を作製している(文献2)。また、この GCTM-5 が、成人膵組織において、膵前駆細胞に特異的な転写因子 SOX9 陽性の非常に少ない数の細胞種の表面を認識することも見出している。そこで本研究では、この抗体を利用して正常組織から膵前駆細胞を生きたまま単離し、その増殖・分化法の開発に挑戦することとした。これが成功すれば、自家の膵前駆細胞から分化させた内分泌細胞を利用した移植医療や、内在性の膵前駆細胞の自己再生等の研究が加速されるものと予想される。また、本抗体は膵癌細胞にも特異的なため、得られる知見は膵癌の研究にも寄与すると予測される。

2. 研究の目的

私どもはこれまでに、ヒト多能性幹細胞由来の胚性膵前駆細胞を用いて、SOX9 陽性の成人膵前駆細胞の表面糖鎖を特異的に認識する新規のモノクローナル抗体 GCTM-5 の作製に成功している。本研究では、この GCTM-5 抗体を利用して、ヒト成体膵臓の幹細胞(前駆細胞)の単離と、その前駆細胞の生体外での増殖・分化方法の確立を目標とした。

3. 研究の方法

本研究では当初、以下の方法でヒト成体膵臓の幹細胞(前駆細胞)の単離と、その前駆細胞の生体外での増殖・分化方法の確立に挑戦することとした。

①正常ヒト膵組織からの膵前駆細胞の単離

研究協力者の所属機関と MTA を締結し、ハイブリドーマと抗体を送付し、生体組織検査サンプルからの GCTM-5 陽性細胞の単離を行う。

②網羅的遺伝子発現の比較解析による増殖・分化に関するシグナル経路の予測

単離した GCTM-5 陽性膵前駆細胞と、内分

泌細胞に分化可能なヒト ES/iPS 細胞から誘導した膵前駆細胞から RNA を抽出し、RNAseq による網羅的遺伝子発現の比較検討を行う。また、転写因子やパスウェイ解析を行い、成体膵前駆細胞の増殖や分化に関わる経路を予測する。

③予測された経路を制御可能な化合物と成長因子のスクリーニング

網羅的遺伝子発現解析で予測された増殖や分化に関わる経路について、それらを制御可能な化合物を中心に、市販および発表済の化合物を購入・収集し小規模の化合物ライブラリを作製する。必要に応じては成長因子ライブラリも作製する。これを成体膵前駆細胞とヒト ES/iPS 細胞から誘導した胚性の膵前駆細胞でスクリーニングし、膵前駆細胞の増殖分化の方法を確立する。

上記②③は、①の生体組織検査からの GCTM-5 陽性細胞の単離に依存している。しかし、成体膵組織における GCTM-5 陽性細胞はごく少なく、それを単離することは難しいとも予測された。このため、①が難しかった場合には、②③は、ヒト ES/iPS 細胞から誘導した胎仔膵前駆細胞と GCTM-5 陽性膵癌細胞を用いて行うこととした。

4. 研究成果

①正常ヒト膵組織からの膵前駆細胞の単離

インドの研究協力者に GCTM-5 ハイブリドーマと抗体を送付し、膵生体組織検査サンプルからのフローサイトメーターを用いた GCTM-5 陽性細胞の単離を試みたが、GCTM-5 陽性細胞の割合は 10^8 分の 1 以下と少なく、単離できなかった。

そこで、単離方法とサンプルの変更を検討した。単離方法については、より大量の細胞を短時間で処理可能な磁気ビーズによる単離方法 GCTM-5 陽性細胞を含む膵癌の細胞株を用いて検討し、効率良い方法を得ることが出来た。サンプルについては、細胞数増やすため、摘出膵癌の正常部分について検討した。しかし、提供された摘出組織には正常な組織部分は多くなく、また、用いた全ての膵癌組織で GCTM-5 を強発現する癌細胞が多く含まれており、これらの細胞が GCTM-5 をエクソソーム中に放出し、それを取り込んだ GCTM-5 偽陽性細胞が多く存在することが判明した。このため、膵癌組織から GCTM-5 陽性膵前駆細胞を単離することは非常に困難であることが分かった。

②網羅的遺伝子発現の比較解析による増殖・分化に関するシグナル経路の予測

比較的大きな正常な生体膵組織が入手できなければ GCTM-5 陽性膵前駆細胞の単離ができないことが判明したため、これらの組織の提供を待ちつつ、代替えとしてヒト ES/iPS 細胞由来の GCTM-5 陽性膵前駆細胞と成人 GCTM-5 陽性膵癌細胞を用いて研究を進めた。

まず最初に、胚発生のどの時期の膵前駆細胞を研究に用いるか決定するために、研究協力者とヒト膵発生における GCTM-5 の発現を詳細に調べた。その結果、13.5 週胚では、GCTM-5 は殆どの腹側膵芽と中心部分の背側膵芽で発現が認められ、その細胞は EpCAM 陽性で、殆どが SOX9 陽性、一部が N-CAM 陽性であった。16 週胚では、GCTM-5 は膵原基に発現し、内胚葉系組織の前駆細胞マーカーとされる CD133 や LGR5、DCLK1 よりもより分化過程の早い段階で発現していることが分かった。この結果から、ヒト ES/iPS 細胞から誘導した PDX1 陽性の初期と、PDX1/NKX6.1/NGN3 陽性の中、後期の膵前駆細胞 (文献 3) を使用することとした。

膵癌細胞については、膵癌細胞株を複数入手し、GCTM-5 の発現を調べた。その結果、複数細胞株で GCTM-5 陽性と陰性の細胞が混在していること、これらの細胞株の遺伝子発現解析から、GCTM-5 陽性細胞では、陽性細胞に比べ間葉系細胞の遺伝子発現が低かった。また、これらの細胞株から GCTM-5 陽性細胞を単離し培養すると、陽性細胞から陰性細胞が分化してくることも見出した。このことから GCTM-5 陽性細胞は、腺房-導管異形成前の初期の癌細胞と考えられた。そこで、最も膵前駆細胞に近いと考えられた 2 種類の膵癌細胞株から単離した GCTM-5 陽性細胞を使用することとした。

(ここまでの結果の大部分については現在論文投稿中である。文献 4)

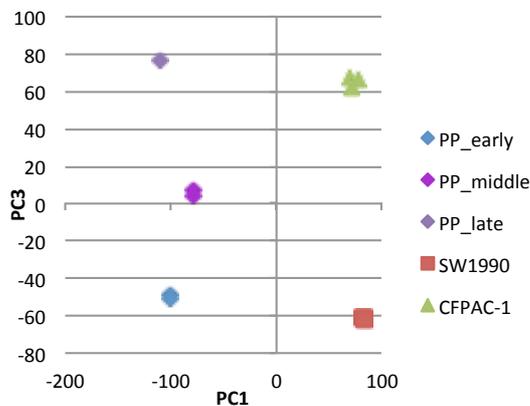


図1. 各サンプル間の相関
ヒトES細胞から誘導した胚性の初期(early)と中期(middle)後期(late)膵前駆細胞(PP)、ならびに膵癌細胞株から単離したGCTM-5陽性細胞(SW1990とCFPAC-1)におけるPCAプロット。

こうして得られた分化能を有する胚性 GCTM-5 陽性膵前駆細胞と増殖性を有する成人 GCTM-5 陽性初期膵癌細胞を用いて RNAseq による網羅的遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現全体としては、似通っていたものの (図 1)、違いが見られ、癌細胞群、胚性細胞群それぞれに特異的に発現している遺伝子が認められた (図 2)。それらの遺伝子発現についてパスウェイ解析を行ったところ (図

3)、MEK/ERK 経路や CDK1 の発現が増殖に関与し、Neuregulin-ErbB 経路や Canonical Wnt 経路、Nodal (TGF β) 経路、NGF 経路、Hedgehog 経路などが増殖および分化に関与する可能性を見出した。

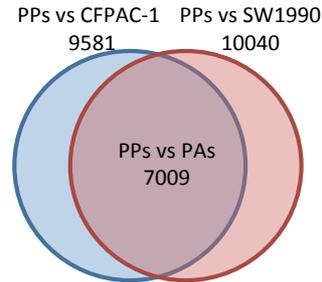


図2. 細胞群特異的な発現遺伝子の同定
ヒトES細胞誘導胚性の膵前駆細胞群(PPs)と2種の膵癌細胞株単離GCTM-5陽性細胞(SW1990とCFPAC-1)それぞれの間で統計的に優位に発現の変動が認められた遺伝子数。中央は重複して発現変動した遺伝子数(PPsと膵癌GCTM-5陽性細胞群(PAs)との差異)。

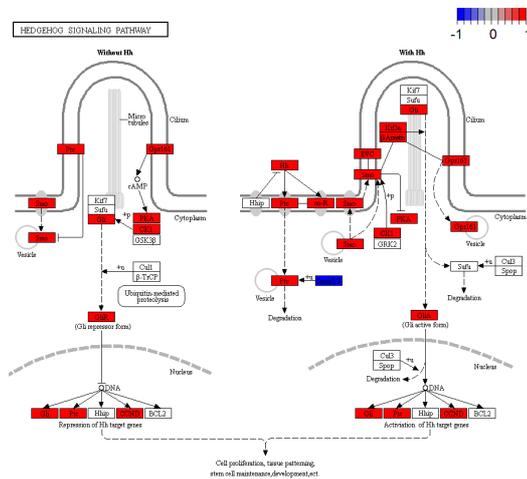


図2. パスウェイ解析
例としてKEGGパスウェイのHedgehog経路を示す。ヒートマップは、赤色がヒトES細胞誘導胚性の膵前駆細胞群(PPs)、青色が膵癌GCTM-5陽性細胞群(PAs)での発現増加を示す。

③予測された経路を制御可能な化合物と成長因子のスクリーニング

胚発生段階での GCTM-5 の発現解析から、ヒト ES/iPS 細胞からの内分泌細胞への分化過程のうち比較的前期の過程からの分化誘導方法を用いれば、GCTM-5 陽性成人膵前駆細胞からの内分泌細胞への分化を誘導できると予測された。また、GCTM-5 膵癌細胞の解析から、GCTM-5 陽性膵前駆細胞を分化させずに増殖させる経路も予測された。これらの知見を基に、成人膵前駆細胞の増殖・分化に関わると考えられる因子(化合物と増殖因子)を収集した。これらについて、ヒト ES/iPS 細胞から誘導した胚性膵前駆細胞と膵癌から単離した GCTM-5 陽性細胞を用いて、膵前駆細胞の増殖と分化を指標にスクリーニングを開始した。

一方で、成人の GCTM-5 陽性膵前駆細胞については、生体成人正常膵組織の入手の困難さのため、因子のスクリーニングを開始できずにいた。しかし最近になって、共同研究者である Pera 教授が、健康な成人生体組織の得やすいアメリカ合衆国に移転し、これらの組織の入手の手続きを開始することができた。健康な生体成人膵組織が入手しだい、スクリーニングを行う予定である。

参考文献

- (1) Lincon A. Stamp, David R. Braxton, Jun Wu, Veronika Akopian, Kouichi Hasegawa, Parakrama T. Chandrasoma, Susan M. Hawes, Catriona McLean, Lydia M. Petrovic, Kasper Wangand and Martin F. Pera “The GCTM-5 epitope associated with the Mucin-like glycoprotein FCGBP marks progenitor cells in tissues of endodermal origin” Stem Cells, 2012, 30(9) 1999-2009
- (2) Subhanwita Sarkar (Dey), Noriko Yoshida and Kouichi Hasegawa “Overview of pancreatic replacement of β -cells from various cell sources” Stem Cell Therapy for Organ Failures, Editor S. Indumathi, Springer press, 2014, 181-194
- (3) Felicia W. Pagliuca, Jeffrey R. Millman, Mads Gurtler, Michael Segel, Alana Van Dervort, Jennifer Hyoje Ryu, Quinn P. Peterson, Dale Greiner and Douglas A. Melton “Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro” Cell, 2014, 159(2) 428-439
- (4) Alison M. Farley, David R. Braxton, Jonathan Li, Karl Trounson, Subanita Sakar-Dey, Bhavana Nayer, Tatsuhiko Ikeda, Kevin X. Lau, Kouichi Hasegawa, and Martin F. Pera “A Sialyl Lewis A Related Antigen Complex Identifies a Subset of SOX9 Positive Cells In Developing Human Pancreas and Pancreatic Adenocarcinoma” 投稿中

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)
(投稿中 2 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Subhanwita Sarkar, Noriko Yoshida, Alison Farley, Martin F Pera and Kouichi Hasegawa “Identification of Novel Cell Surface Marker for Pancreatic and Cholangio carcinoma” International Conference on Contemporary Advances of Science and Technology, August 7-9, 2015, Varanasi, India
- ② Bhavana Nayer, Subhanwita Sarkar, Noriko Yoshida, Neha Vartak-Sharma,

Alison Farley, Martin F Pera and Kouichi Hasegawa “Characterization of a GCTM-5 Positive Population in Pancreatic Adenocarcinoma and Cholangiocarcinoma” International Conference on Science and Technology: Future Challenges and solutions, August 8-9, 2016, Mysore, India

③ Bhavana Nayer, Subhanwita Sarkar, Tatsuhiko Ikeda, Sushrut Dakhore, Sabarinath P Subramanian, Priyasha Mishra, Neha Vartak-Sharma, Noriko Yoshida, Alison Farley, Martin F Pera and Kouichi Hasegawa “Characterization of a GCTM-5 Positive Population in Pancreatic Adenocarcinoma and Cholangiocarcinoma” NCBS Annual Talks, January 11-14, 2017, Bangalore, India

④ Bhavana Nayer, Subhanwita Sarkar, Tatsuhiko Ikeda, Sushrut Dakhore, Sabarinath P Subramanian, Priyasha Mishra, Neha Vartak-Sharma, Noriko Yoshida, Alison Farley, Martin F Pera and Kouichi Hasegawa “Characterization of a GCTM-5 Positive Population in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Cholangiocarcinoma” Annual Review of Research inStem, March 6-8, 2017, Bangalore, India

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 光一 (HASEGAWA, Kouichi)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
特定拠点講師
研究者番号：50378890

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

Martin F Pera (PERA, Martin F)
メルボルン大学・教授

Alison M Farley (FARLEY, Alison M)
メルボルン大学・研究員

Neha Vartak-Sharm (VARTAK-SHARMA, Neha)
インド国立幹細胞生物学再生医学研究センター (inStem)・研究員

Bhavana Nayer (NAYER, Bhavana)
インド国立幹細胞生物学再生医学研究センター (inStem)・研究員