

令和元年6月19日現在

機関番号：32206

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15432

研究課題名(和文) ゲノム編集技術による膵管上皮細胞から膵細胞新生の確立と新たな糖尿病治療戦略

研究課題名(英文) Establishment of Pancreatic Beta-Cell Neogenesis from Pancreatic Duct Epithelial Cells by Genome Editing and Novel Diabetes Therapeutic Strategy

研究代表者

伊藤 鉄英 (Ito, Tetsuhide)

国際医療福祉大学・福岡看護学部・教授

研究者番号：50253448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術Crispr/Cas9システムを用いて野生型マウスでの膵管上皮細胞からの膵B細胞分化誘導を確立しB細胞新生による糖尿病治療を目指すことを目的とした。まず、膵腺房細胞株をCrispr/Cas9にて膵アミラーゼをノックアウトした。膵アミラーゼ消失がオートファジーを介して膵癌発症や糖尿病進展の関与の可能性を証明した(Biomed Res Int, 2018)。さらに、膵内分泌腫瘍細胞をRNA-Seqを用いた遺伝子発現解析を施行し、シナプス伝達関連遺伝子上昇と消化酵素関連酵素の低下を証明した(Cancer Med 2019)。今後、膵B細胞の分化誘導を形態および分子生物学的に確認する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は多くの患者が罹患しているが、根治的かつ永続的な治療法は開発されていない。糖尿病では、血糖のコントロールを担っている膵B細胞におけるインスリン分泌低下が主要な要因である。膵B細胞のインスリン分泌を回復させる治療法の確立が必要である。本研究ではゲノム編集技術Crispr/Cas9システムという新しい技術を用いて、インスリンを産生する膵B細胞を他の細胞から分化誘導して糖尿病の治療に用いることが出来る可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish the induction of pancreatic B cell differentiation from pancreatic ductal epithelial cells in wild type mice using genome editing technology Crispr / Cas9 system and aim at treatment of diabetes by pancreatic B cell neoplasia. First, we used a pancreatic acinar cell line to knock out pancreatic amylase in Crispr / Cas9 to analyze autophagy, and demonstrated that pancreatic amylase loss may be involved in the onset of pancreatic cancer and diabetes progression through autophagy (BioMed Res Int, 2018). Furthermore, we performed gene expression analysis using RNA-Seq of pancreatic endocrine tumor cells and normal tissues, and proved that in tumors, synaptic transmission-related gene elevation and digestive enzyme-related enzymes decrease (Cancer Med, 2019). From now on, we will confirm the induction of differentiation of pancreatic B cells in terms of morphology and molecular biology.

研究分野：消化器内科

キーワード：ゲノム編集 膵管上皮細胞 膵細胞新生 糖尿病治療 膵神経内分泌腫瘍

1．研究開始当初の背景

糖尿病は多くの患者が罹患しているが、根治的かつ永続的な治療法は開発されていない。糖尿病では、膵β細胞によるインスリン分泌低下が主要な要因であり、膵β細胞のインスリン分泌を回復させる治療法の確立が必要である。

最近、Conditional マウスにて、膵管上皮細胞のFbw7ノックアウトにより膵β細胞の分化誘導が行える事が報告された。さらに、Crispr/Cas9システムを用いたゲノム編集技術が発達してきた。

2．研究の目的

本研究では、臨床応用する為に、ゲノム編集技術Crispr/Cas9システムを用いて野生型マウスでの膵管上皮細胞からの膵細胞分化誘導を確立し糖尿病の改善を行い、最終的にヒトに対する、膵細胞新生による糖尿病治療を目指すことが目的である。

3．研究の方法

Crispr/Cas9システムゲノム編集はCrispr/Cas9システムを用いる。

ジェノタイピングCrisprを投与したマウスの膵DNAを抽出し、ディープシーケンスにてゲノム編集部位の塩基の変化と割合を確認する。また、Fbw7以外のゲノムDNAが改変されていないか(OFF-TARGET 効果)を定量する。膵管上皮分画、膵腺房細胞分画、膵島分画にて同様の実験を行い、膵管上皮のゲノム編集効率を、膵皮膜下注射及び膵管内投与それぞれにおいて検討する。さらに、病理組織より、レーザーマイクロダイセクションを用いて、分化誘導した膵β細胞のDNAを抽出し、Fbw7遺伝子が改変されている事を確認する。

4．研究成果

本研究では野生型成体マウスでの膵管上皮細胞から膵細胞への分化誘導を行い、糖尿病治療が行えるか、ヒトへの応用ができるかが目的である。分化誘導にはCrispr/Cas9システムを用いたゲノム編集の手法を試みており、標的ゲノムであるFbw7のノックアウトを進行中である。膵管上皮細胞もちいての実験がなかなか上手くいかず再実験を繰り返していた。そのため、この研究が成功するために、まず膵腺房細胞株であるAR42Jを用いてゲノム編集技術であるCrispr/Cas9にて膵アミラーゼのノックアウトを行い成功した。オートファジーのマーカーであるLC3- を解析し、膵アミラーゼノックアウトを行ったAR42JではLC3- タンパク発現はwild typeと比較し優位に低下しており、膵アミラーゼ欠損ではオートファジーが減少している興味ある結果を得られた(図1)。我々はこの結果から、膵アミラーゼが膵炎においてオートファジーの誘導と選択性を行っており、膵アミラーゼの消失がオートファジーを介して膵癌発症や進展に対しても関与しているということを証明した (BioMed Research International., 2018)。これを元に膵

管上皮細胞からFbw7をノックアウトして膵 細胞への分化誘導が可能となる方向性を見いだした。

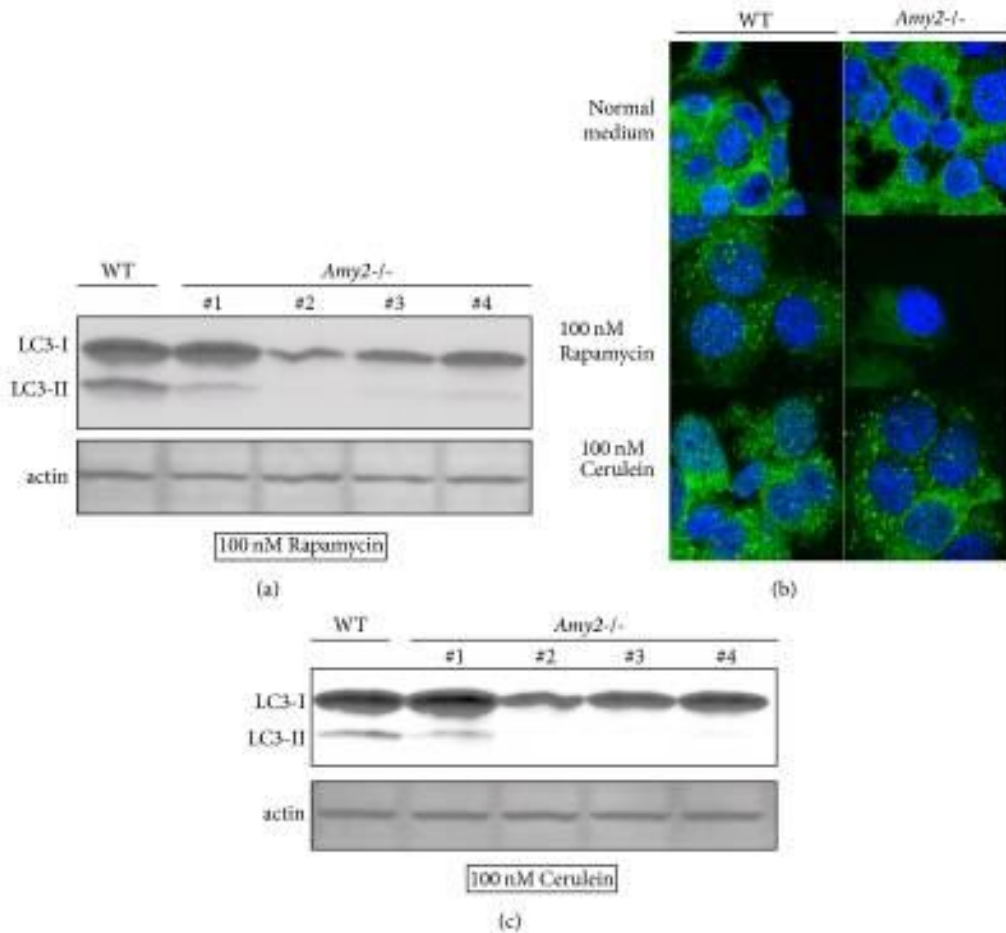


図1 . 膵アミラーゼの消失とオートファジー(文献1より引用)

一方、膵管上皮細胞からFbw7をノックアウトして膵 細胞への分化誘導、を試みたが十分な成果を得ることは出来なかった。そこで、PDX1-Creと同じく膵 細胞の分化誘導を形態および分子生物学的に確認ことに通じる実験を新たに計画し、膵内分泌腫瘍細胞と正常組織のRNA-Seqを用

いた遺伝子発現解析を施行した。その結果、膵内分泌腫瘍ではシナプス伝達関連遺伝子上昇と消化酵素関連酵素の低下を認めることを証明した(Cancer Medicine, 2019)。

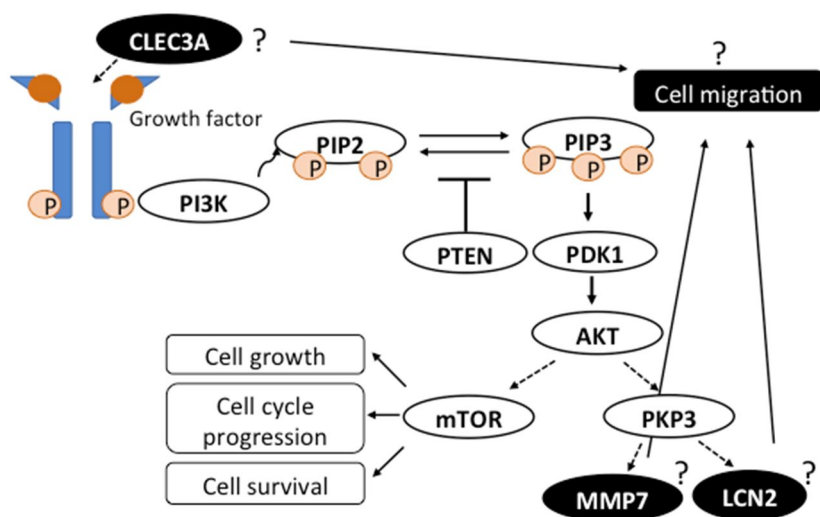


図 2. 膵内分泌腫瘍におけるシナプス伝達遺伝子と消化酵素遺伝子の関連(文献2より引用)

< 引用文献 >

Yasunaga K, Ito T, Miki M, Ueda K, Fujiyama T, Tachibana Y, Fujimori N, Kawabe K, Ogawa Y. Using CRISPR/Cas9 to knock out amylase in acinar cells decreases pancreatitis-induced autophagy. *Biomed Res Int*. 2018 May 17;2018:8719397. doi: 10.1155/2018/8719397. eCollection 2018.

Miki M, Oono T, Fujimori N, Takaoka T, Kawabe K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Saito D, Nakamura M, Ohkawa Y, Oda N, Suyama M, Ito T, Ogawa Y. CLEC3A, MMP7, and LCN2 as Novel Markers for Predicting Recurrence in Resected G1 and G2. *Pancreatic Neuroendocrine Tumors*. *Cancer Medicine* DOI:10.1002/cam4.2232, 2019.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計2件)

Yasunaga K, Ito T, Miki M, Ueda K, Fujiyama T, Tachibana Y, Fujimori N, Kawabe K, Ogawa Y. Using CRISPR/Cas9 to knock out amylase in acinar cells decreases pancreatitis-induced autophagy. *Biomed Res Int*. 2018 May 17;2018:8719397. doi: 10.1155/2018/8719397. eCollection 2018.

Miki M, Oono T, Fujimori N, Takaoka T, Kawabe K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Saito D, Nakamura M, Ohkawa Y, Oda N, Suyama M, Ito T, Ogawa Y. CLEC3A, MMP7, and LCN2 as Novel Markers for Predicting Recurrence in Resected G1 and G2. *Pancreatic Neuroendocrine Tumors*. *Cancer Medicine* DOI:10.1002/cam4.2232, 2019.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤森 尚

ローマ字氏名：(FUJIMORI, Nao)

所属研究機関名：九州大学

部局名：病態制御内科

職名：助教

研究者番号：60808137

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三木 正美、安永 浩平

ローマ字氏名：(MIKI, Masami) (YASUNAGA, Kohei)