

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2005～2008

課題番号：17390296

研究課題名 (和文) 肝胆膵の発生・分化の分子機構の解明と
その障害による小児疾患の病態解析

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of biliary and pancreatic development.

研究代表者

須磨崎 亮 (SUMAZAKI RYO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：40163050

研究成果の概要：

膵臓と胆管の器官分化を決定する分子機構は、まったく不明である。また、糖尿病の再生治療法を開発するためには、膵幹細胞からβ細胞を分化させる必要があるが、分化の制御機構にも不明な点が多い。本研究により、Notch シグナルの標的となる転写因子 Hes1 が膵臓と胆管の器官分化、および内分泌・外分泌組織を含めた膵幹細胞の分化方向を制御する分子として作用していること、さらに発生期の膵幹細胞に Hes1 が過剰発現すると糖尿病を発症することが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	5,100,000	0	5,100,000
2006 年度	3,600,000	0	3,600,000
2007 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
総計	14,400,000	1,710,000	16,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：糖尿病、再生医学、転写因子、発生・分化、ランゲルハンス島、アラジール症候群

1. 研究開始当初の背景

Notch 受容体のリガンド JAG1 の異常によって Alagille 症候群が起こり、この疾患では胆管の低形成が見られるが、胆管系の発生における Notch シグナル伝達系の役割は不明であった。また、Notch の標的分子である転写因子 Hes1 が膵臓内分泌細胞の発生を抑制することが知られていたが、膵幹細胞や外分泌細胞に対する作用は不明であった。

2. 研究の目的

糖尿病治療の将来像からみると、膵臓の分子発生に関する研究はインスリン分泌細胞

の再生治療に関連する重要な課題である。我々は Notch シグナルの下流に位置する転写因子 Hes1 に注目して、Hes1 による膵臓幹細胞の分化制御機構能の解明に取り組んできた。本研究ではとくに、膵臓の組織幹細胞から多種類の細胞が分化する分子機構とその生体内における意義に焦点を絞った

3. 研究の方法

膵臓と胆管系の発生における Hes1 の役割を明らかにするために、正常マウスにおける当該臓器の発生過程における Hes1 の発現を

モニターし、Hes1 欠損マウスにおける膵・胆管の胎児発生を検討した。

また、膵幹細胞の分化における Hes1 の役割を明らかにするために、膵幹細胞分化のマスター転写因子である Pdx1 の制御下に Hes1 を発現するトランスジェニックマウスを作成し、その形質を検討した。

4. 研究成果

(1) Hes1 欠損マウスにおける膵臓形成

先天的に胆管系の異常が見られる Alagille 症候群の原因遺伝子が Notch のリガンド JAG1 であるとの報告を受けて、著者らは Notch シグナルの胆管発生に果たす役割について研究を開始した。まず、正常マウスで Notch シグナルの発現状況を調べると、Jagged1、Jagged2、Notch1、Notch2 と Notch シグナルの標的遺伝子 Hes1 が胆管系と膵臓の原基で検出された。

次に、Notch シグナルを構成する各遺伝子を欠損するマウスで胆管系の異常を検索した。これらのマウスは胎生致死のものが多いが、胎生後期から周産期まで生存する Hes1 ノックアウトマウスで観察すると、総胆管や胆嚢がまったく形成されなかった。また組織学的検索では、胆管上皮の細胞配列は膵臓組織様で管腔が形成されず、同部位に膵内分泌マーカであるグルカゴン、インスリンなどのホルモン産生細胞ならびに膵外分泌マーカ陽性の細胞が見出された (図 1)。さらに、膵外分泌腺に特徴的な腺房構造や膵内分泌細胞がクラスターを形成して分布するなどランゲルハンス島類似の構造も観察された。以上から Hes1 が欠損すると、胆管組織が発生の途中で膵臓に分化転換 (transdifferentiation) することが判明した。

哺乳動物では、このようにたった 1 遺伝子の欠失によって臓器全体の発生の方向性が変化してしまう例は今まで知られていない。そこで、この異常をきたすメカニズムを検討した。正常マウスの胆管系で Hes1 の発現を調べると、胆管芽発生期から胆管・胆嚢形成期まで、肝外胆管の上皮細胞に胎生期を通して検出された。また内分泌細胞への分化を決定する Ngn3 は、膵臓原基にのみ発現し、胆管系では全く検出されなかった。一方、Hes1 ノックアウトマウスでは Ngn3 は膵臓と同じく、肝外胆管上皮細胞でも異所性に強く発現していた。以上から、Hes1 ノックアウトマウスの胆管細胞では、正常マウスの膵臓原基と同様に、膵臓細胞に分化させる発生プログラムが働いていること

が確認された。

膵臓は内胚葉由来の上皮細胞と周囲の間葉細胞の相互作用により形成される。とくに上皮細胞の Pdx1 は間葉から分泌される膵臓形成シグナルへの応答性を準備する、膵臓細胞分化の鍵になる転写因子である。Pdx1 蛋白の発現状態を正常マウスの胎児で検討すると、胆管上皮は膵管上皮と同様に Pdx1 陽性であり、胆管系の細胞が膵臓分化の能力を有していることが裏づけられた。これらの結果を総合すると、正常マウスの胆管では、Hes1 が膵臓内分泌細胞への分化を決定する Ngn3 の発現など、膵臓分化のプログラムを抑えることによって管腔が形成されることが明らかになった。

(2) Hes1 過剰発現マウスにおける膵臓形成と糖尿病発症

正常マウス胎生期の膵臓幹細胞では、Pdx1 と Hes1 の両者が発現している。膵臓幹細胞における Hes1 発現の意義を明らかにするために、Pdx1 のプロモーター制御下に Hes1 を発現するトランスジェニックマウスを作成し、種々の Hes1 発現量を示すラインを解析した。

Hes1 の発現量により膵臓幹細胞の分化の方向性や程度が大きく変化した。

① Hes1 の高発現ラインマウス (ライン A) の膵臓では未分化な膵管のみが形成され、膵実質細胞は全く発生しなかった。膵管の上皮細胞では未熟性を示すマーカ (Pdx1, Glut2, β カテニン) が検出されるので、Hes1 の過剰発現により膵臓幹細胞の分化・成熟が完全に停止し、未分化能を維持したままの細胞が膵管にとどまった状態で出生したものと解釈した。このマウスは出生時から高度の高血糖を示し、出生後 1 週間以内にすべて死亡した。

② Hes1 の過剰発現が低レベルの場合は、成マウスに成長するが、膵臓 Langerhans 島 (ラ島) や β 細胞の形成が不十分で、加齢に伴ってインスリン分泌低下型の糖尿病を発症した。すなわち、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、PP 細胞の分布を含めて正常のラ島構造は保たれていたが、ラ島数が少なく、大きさが小さかった。本研究では Hes1 の過剰発現が低レベルのマウス 4 ライン (ライン B~E) を詳細に解析した。この 4 ラインの中では Hes1 の過剰発現の程度はライン B~E の順に減少していた。一方、ラ島の形成不全の程度も B~E の順に高度となり、ライン B ではすでに生後 3 週ですべてのマウスが糖尿病を発症していた。糖尿病の発症率も B~E の

順に低下した。これらのマウスは経時的に高血糖を示すようになり、ライン C と D は年齢依存性の糖尿病を発症した。図 2 にライン B~E の血糖値の週齢別推移を示す。これらのマウスの膵臓の重量は野生型と差がなく、膵外分泌細胞には全く異常が認められなかった。

最も高度の糖尿病をきたしたライン B で糖尿病の機序を解析した。糖負荷テストではインスリン分泌が低下しており、インスリン欠乏性の糖尿病であった。一方、このマウスの膵臓からラ島を分離し、グルコース刺激によるインスリン分泌を *in vitro* で検索したところ、野生型と差がなく、個々の β 細胞の機能に異常は認められなかった。このマウスのインスリン欠乏はラ島の形成不全によることが示された。

③高度の糖尿病を来たすライン B 同士を交配すると、ホモマウスはライン A と同様に膵内分泌・外分泌細胞が全く形成されず、膵管のみが発生していた。したがって、①と②の相違は、Hes1 過剰発現の程度によることが明らかとなった。

(3) 考察

①Hes1 による発生期の胆管と膵臓の器官分化

肝胆膵は上皮と周囲の間葉の相互作用により形成され、腸管や膵管の上皮に存在する幹細胞が間葉系からのシグナルに反応して各臓器を形成する。Pdx1 は間葉からの膵臓化シグナルへの応答性を準備し、Ngn3 は Hes1 によって発現が抑制され、内分泌細胞への分化を決めている。本研究により、系統発生的に近縁な胆管と膵管の原基には共に膵臓実質細胞への分化能を有する幹細胞が分布しているが、Hes1 の時間・空間的な発現レベルの制御によって膵臓と胆管系の器官分化が可能になることが判明した。この Hes1 の作用は、「胆管近くに形成される膵臓のために分泌される間葉細胞からのシグナルに応答して、胆管が膵臓様に分化する」のを妨げる作用であり、共に発生学的に類似した原基から胆管系と膵臓の器管分化を可能にする、いわば分子スイッチであると解釈される。

Hes1 は神経細胞や膵臓細胞の分化を誘導する bHLH 型転写因子を抑制するリプレッサーとして作用する。この機能が胆管系と膵臓の器管分化を可能にする分子基盤を担っていると考えられる。本研究により発見された「Hes1 の欠失による胆管系の原基の膵臓様組織へ分化転換」は、動物の系統発生

の点からも推測される。動物進化の観点からいえば、膵臓が最初に出現するのは、最も原始的な脊椎動物、円口類である。円口類のヤツメウナギでは、膵島細胞の集塊は成体になってから、総胆管から発生してくる。系統発生的にも、膵臓と胆管系の密接な関係が伺われる。

②Hes1 による膵臓幹細胞制御

Hes1 はNotchシグナルのエフェクターとして働き、Notchシグナルは様々な器官発生の過程で、均等な細胞集団から異なる細胞腫を産み出す機構として位置づけられている。膵臓発生においても、従来からNotch-Hes1 シグナルは膵臓の内分泌前駆細胞の分化を抑制していることが明らかにされてきた^{2),3)}。しかし本研究によりHes1 は膵臓内分泌前駆細胞の分化を制御するのみでなく、発現量が高い場合は、外分泌系分化を含む膵臓幹細胞自身の分化を抑制し、その未分化能維持に貢献していることが判明した。さらに、Hes1 の発現量によって、幹細胞の分化の方向付けに大きく影響することが示された。細胞内のHes1 遺伝子発現は自律的にオシレーションすることを考慮すると、「間葉系から分泌される種々の分化誘導シグナルに対する幹細胞の応答性はHes1 の発現量によって調節され、その発現量が細胞毎に、また経時的に変化することによって、同一の幹細胞から多種類の細胞が分化する機構」が想定される。将来、膵臓や胆管に分布する膵臓幹細胞のNotch-Hes1 シグナルを制御して、インスリンを分泌する膵 β 細胞が得られるようになれば、糖尿病の細胞治療が可能になるであろう。

③Hes1 の過剰発現による糖尿病発症

膵臓幹細胞では生理的にもPdx1 とHes1 が共発現しているが³⁾、Pdx1 プロモーター制御下でHes1 を発現する遺伝子組み換えマウスは、人工的に膵臓幹細胞におけるHes1 の発現量を増加させたモデルである。このモデルによってHes1 の発現量が膵臓ランゲルハンス島（ラ島）量の形成不良を介して、糖尿病の原因になる事が判明した。

先天性糖尿病は稀な病態であるが、糖尿病発症のモデルとして有用である⁵⁾。従来は、Notch-Hes1 経路は発生場で論じられてきたが、今後は膵臓原基におけるNotchシグナルの強弱は、糖尿病素因の一部になる可能性があるかなど、ヒト疾患の病因としても検索する必要があるであろう。

図 1

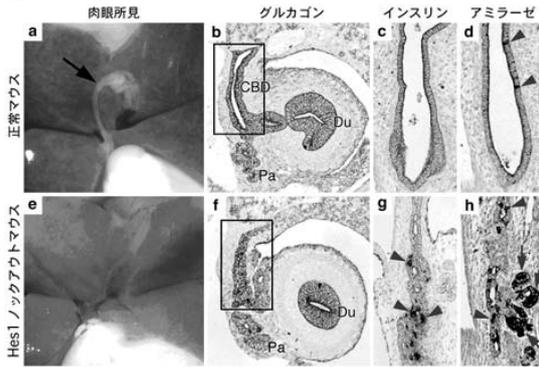


図 1 の説明

Hes1 ノックアウトマウスの胆管系：胆管が管腔構造を失い、膵臓様組織に分化転換を起こす。

上段 a-d は正常マウスの、下段 e-h は Hes1 ノックアウトマウスの胆管系の胎内発生過程を示す。a, e : a の矢印は胆嚢管と胆嚢を示す。e では、これらの構造物が欠如している。b, f : Du は十二指腸、Pa は腹側膵臓、矩形の枠は総胆管 (CBD) を示す。グルカゴンとサイトケラチンの 2 重染色。f の黒い細胞はグルカゴン陽性細胞である。f では総胆管が管腔を形成せず、膵臓様に分化している。c, g : インスリンとサイトケラチンの 2 重染色。矢頭は胆管上皮中のインスリン陽性細胞を示す。d, h : アミラーゼとサイトケラチンの 2 重染色。矢印は胆管から発生した外分泌腺の腺房様構造を、矢頭は胆管上皮中のアミラーゼ陽性細胞を示す。d の正常胆管にも少数のアミラーゼ陽性細胞がみられる。

図 2

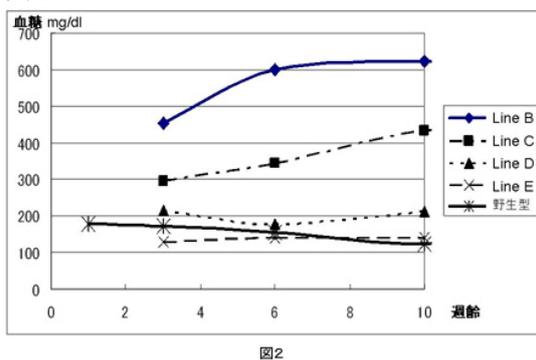


図 2 の説明

Hes1 過剰発現マウスにおける糖尿病発症：Hes1 の過剰発現の程度が強くなるにしたがって、血糖値の上昇が高度になる。

Pdx1 プロモーターの制御下に Hes1 を過剰発現した遺伝子組み換えマウス。ライン B ~D の順に Hes1 の発現量が高度になっている。

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 15 件)

- ① Aoki T, Matsumoto Y, Hirata K, Ochiai K, Okada M, Ichikawa K, Shibasaki M, Arinami T, Sumazaki R, Noguchi E: Expression profiling of genes related to asthma exacerbations. Clin Exp Allergy, 39(2), 213-221, 2009, 査読有
- ② Miyagawa-Hayashino A, Egawa H, Yorifuji T, Hasegawa M, Haga H, Tsuruyama T, Wen MC, Sumazaki R, Manabe T, Uemoto S: Allograft steatohepatitis in progressive familial intrahepatic cholestasis type 1 after living donor liver transplantation. Liver Transpl, 15(6), 610-618, 2009, 査読有
- ③ Nakao T, Fukushima T, Shimizu T, Nanmoku T, Fujiyama S, Nakajima R, Fukushima F, Noguchi M, Sumazaki R: Transient myelofibrosis with autoimmune pancytopenia: a case report. Eur J Pediatr, Epub ahead of print, 2008, 査読有
- ④ Tajiri H, Tomomasa T, Yoden A, Konno M, Sasaki M, Maisawa S, Sumazaki R, Shimizu T, Toyoda S, Etani Y, Nakacho M, Ushijima K, Kobayashi A: Japanese Society for Pediatric Inflammatory Bowel Disease: Efficacy and safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in Japanese pediatric patients with ulcerative colitis: a survey of the Japanese Society for Pediatric Inflammatory Bowel Disease. Digestion, 77(3-4), 150-4, 2008, 査読有
- ⑤ Nakao T, Shimizu T, Fukushima T, Saito M, Okamoto M, Sugiura M, Yamamoto K, Ueda I, Imashuku S, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Sumazaki R, Matsui A: Fatal sibling cases of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) with MUNC13-4 mutations: case reports. Pediatr Hematol Oncol, 25(3), 171-180, 2008, 査読有
- ⑥ Takahashi A, Hasegawa M, Sumazaki R, Suzuki M, Toki F, Suehiro T, Onigata K, Tomomasa T, Suzuki T, Matsui A, Morikawa A, Kuwano H:

Gradual improvement of liver function after administration of ursodeoxycholic acid in an infant with a novel ABCB11 gene mutation with phenotypic continuum between BRIC2 and PFIC2.

Eur J Gastroenterol Hepatol, 119(11), 942-946, 2007, 査読有

- ⑦ 須磨崎亮、乾あやの、位田忍、長田郁夫、松井陽、虫明聡太郎：小児の急性肝不全の特徴、肝胆膵、55(2)、197-205、2007、査読無
- ⑧ 須磨崎亮、長谷川誠：進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の病態、小児科診療、70(6)、924-929、2007、査読無
- ⑨ 須磨崎亮、乾あやの、位田忍、長田郁夫、松井陽、虫明聡太郎：小児の急性肝不全、治療学、41(4)、358-362、2007、査読無
- ⑩ 須磨崎亮、長谷川誠：進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の病態、小児科診療、70、924-929、2007、査読無
- ⑪ 須磨崎亮：転写因子Hes1による膵臓幹細胞の分化制御と糖尿病の発症、上原記念生命科学財団研究報告書、20、338-340、2006、査読無
- ⑫ 中沼安二、石井元康、吉川正英、須磨崎亮、藤久實：コランギオサイト研究の最近の展開、肝胆膵、41、1141-1154、2006、査読無
- ⑬ Kanegane H, Ito Y, Ohshima K, Shichijo T, Tomimasu K, Nomura K, Futatani T, Sumazaki R, Miyawaki T: X-linked lymphoproliferative syndrome presenting with systemic lymphocytic vasculitis. Am J Hematol, 78(2), 130-133, 2005, 査読有
- ⑭ Horigome H, Sumazaki R, Iwasaki N, Imoto N, Kinugasa H, Saito M, Matsui A: Fatal eosinophilic heart disease in a child with neurofibromatosis-1 complicated by acute lymphoblastic leukemia. Heart Vessels, 20(3), 120-122, 2005, 査読有
- ⑮ Kamoda T, Saito T, Kinugasa H, Iwasaki N, Sumazaki R, Mouri Y, Izumi I, Hirano T, Matsui A: A case of Shwachman-Diamond syndrome presenting with diabetes from early infancy. Diabetes Care, 28, 1508-1509, 2005, 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 須磨崎亮：胆管系と膵臓の発生過程を制御する分子機構、第 45 回日本小児外科学会学術集会、2008 年 5 月 28 日～30 日、つくば
- ② 須磨崎亮、乾あやの、虫明聡太郎、長田郁夫、別所一彦、位田忍、松井陽：小児劇症肝炎におけるウイルス性疾患と病因不明例の頻度と診療上の問題点、第 110 回日本小児科学会学術集会、2007 年 4 月 20 日～22 日、京都
- ③ 須磨崎亮、長谷川誠、工藤豊一郎、松井陽：筑波大学における小児劇症肝炎 11 例の後方視的検討、第 42 回日本肝臓学会総会 2006 年 5 月 25 日～26 日、京都
- ④ 須磨崎亮、松井陽：Alagille 症候群から学んだこと：先天異常は発生の秘密を学ぶ鍵である、第 109 回日本小児科学会学術集会 会頭要望演題 (小児科学・医療にブレークスルーをもたらした症例・研究)、2006 年 4 月 22 日、金沢
- ⑤ 須磨崎亮、胆管系と膵臓の形成を制御する分子機構、熊本大学 COE リエゾンラボ研究会、2005 年 9 月 14 日、熊本
- ⑥ 須磨崎亮：教育セミナー 肝内胆管減少症・進行性家族性肝内胆汁うっ滞症、第 22 回日本小児肝臓研究会、2005 年 7 月 16 日、宮城
- ⑦ Toyoichiro Kudo, Ryo Sumazaki, Akira Matsui: Comparison of viral load in body cavity fluid versus peripheral blood in Pediatric liver transplant recipients. 38th annual meeting of the ESPGHAN, June 1-4, 2005, Porto
- ⑧ Ryo Sumazaki: Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD): A novel mitochondrial hepatopathy, 9th Congress of the Asian Pan-Pacific Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition 17th, June 16-19, 2005, Kuala Lumpur, Malaysia

[図書] (計 8 件)

- ① 長谷川誠、須磨崎亮：消化器疾患 肝内胆汁うっ滞、小児内科 40 巻増刊、565-570、2008
- ② 須磨崎亮：膵β細胞の増殖・分化と再生、Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2006、中外医学社、31-37、2006
- ③ 須磨崎亮：糖尿病基礎分野での進歩膵β細胞の増殖・分化と再生、Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2006、中

- 外医学社、31-37、2006
- ④ 須磨崎亮：Notchシグナル異常と発生異常先天性疾患から学ぶ発生の秘密、医学のあゆみ 217(12)、医歯薬出版、1077-1081、2006
 - ⑤ 須磨崎亮：消化器肝内胆管減少症、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症、小児科診療 69 増刊、診断と治療社、624-627、2006
 - ⑥ 須磨崎亮：消化器疾患家族性肝内胆汁うっ滞症候群、小児内科 38 増刊、東京医学社、418-419、2006
 - ⑦ 須磨崎亮：肝機能検査色素排泄試験、小児内科 8、東京医学社、1339-1341、2006
 - ⑧ 須磨崎亮：今日の治療指針2005 新生児肝炎、医学書院、948-949、2005

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須磨崎 亮 (SUMAZAKI RYO)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：40163050

(2) 研究分担者

松井 陽 (MATSUI AKIRA)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：00159146

有波 忠雄 (ARINAMI TADAO)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：10212648

島野 仁 (SHIMANO HITOSHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：20251241

(3) 連携研究者

なし