

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08677

研究課題名(和文) 内外分泌連関に着目した膵島細胞増殖因子の解明とその治療的応用

研究課題名(英文) Islet Cell Growth Factors Focusing on Endocrine-External Secretory Linkage and Their Therapeutic Application

研究代表者

増井 俊彦 (Masui, Toshihiko)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20452352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期臓器形成において、内分泌細胞と外分泌細胞はほぼ同時に発生することから、両者の間には何らかのクロストークがあると考えられてきた。本研究では、クロストークを担う新規因子を探索しケモカインCCL5を候補因子として見出し、さらに、外分泌細胞由来の因子CCL5は成体内分泌細胞(細胞)の増殖を制御できる因子であることを明らかとした。さらに、マウス胎生期の外分泌細胞におけるPdx1発現がCCL5分泌を促し、内分泌組織まで到達したCCL5は細胞のGPR75受容体を通して細胞増殖を促進していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎生期および成体膵において、膵内分泌細胞と外分泌細胞の相互関係に対する研究はこれまで殆ど行われていない。本研究の意義は大きく二つある。一つは、膵内分泌細胞の胎生期の増殖メカニズムの一端が明らかとなったことである。つまり、CCL5が胎生期に外分泌細胞から発現することで内分泌細胞の増殖に関与していることを明らかとすることができた。もう一つは、成体での膵内分泌細胞増殖因子の同定により、今後、膵内分泌細胞の増殖を促す治療法の開発につながる成果を得たことである。

研究成果の概要(英文)：Since endocrine and exocrine cells develop almost simultaneously during embryonic organogenesis, it has been believed that there is some cross-talk between the two. In this study, we searched for novel factors responsible for crosstalk and found the chemokine CCL5 as a candidate factor, and furthermore, the exocrine cell-derived factor CCL5 was found to be a factor that can regulate proliferation of adult endocrine cells (cells). Furthermore, we found that Pdx1 expression in exocrine cells of embryonic mice stimulates CCL5 secretion, and that CCL5 reaching endocrine tissues promotes -cell proliferation through GPR75 receptors on -cells.

研究分野：膵発生

キーワード：内外分泌連関 膵内分泌細胞増殖因子 ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

胎生期臓器形成において、内分泌細胞と外分泌細胞はほぼ同時に発生することから、両者の間には何らかのクロストークがあると考えられてきたが、長らくその証明には至っていない。成人の膵臓に関してのいくつかの臨床的事実はこの仮説をサポートしている。例えば、ヒト膵島移植の長期成績では、純度の低い(つまり、外分泌組織の混入が多い)移植の方が優れるという結果 (Street et al. Diabetes, 2004)や、慢性膵炎の終末期には膵外分泌細胞が減少するに伴って耐糖能が悪化する報告は、内分泌組織の機能的維持が外分泌組織からの制御を受けていることを想起させた。

我々は、膵発生に必須の遺伝子 PDX1 を胎生期外分泌細胞特異的にノックアウトするマウスを作成したところ、外分泌組織の著明な低形成だけでなく、糖尿病になることを見いだした(Kodama et al, SciRep. 2016 Feb 18;6)。つまり、胎生期内分泌組織の形成は、周囲に存在する外分泌組織由来の未知の因子による細胞非自律的な制御を受けていることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、膵外分泌-内分泌組織間のクロストークを担う責任分子を同定し、その生理学的・病理学的意義、さらには再生医療への応用可能性を検証する。

3. 研究の方法

研究 1 : マウス膵内分泌組織量制御における外分泌組織由来因子の解明

発生期および成体期における膵外分泌細胞で Pdx1 の GOF(gain of function)、LOF(loss of function)実験を行い、膵外分泌-内分泌クロストークを担う責任分子候補を RNA/protein 発現解析にて同定する。またそれらの因子を標的組織と培養・解析し、責任因子としての検証を行う。また野生型マウス組織を使って生理学的役割を明らかにする。

研究 2 : ヒト病態における外分泌組織由来因子の意義解明と臨床応用に向けた検討

ヒト組織標本を用いて同定した責任因子の発現を検討し、ヒトにおける生理学的・臨床病理学的意義を明らかにする。

4. 研究成果

研究 1 : マウス膵内分泌組織量制御における外分泌組織由来因子の意義解明

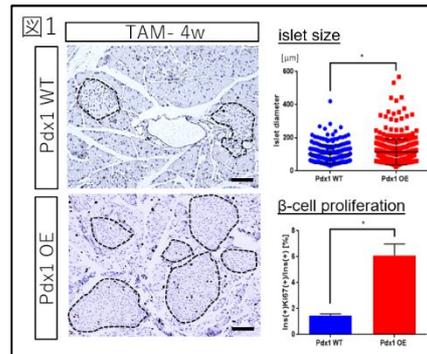
研究 1-1 : 胎生期外分泌組織特異的 Pdx1 ノックアウトを用いたクロストーク因子の同定

背景でも述べた通り、我々の胎生期外分泌組織特異的 Pdx1 ノックアウトマウスモデル (Elastase-Cre; Pdx1-floxed)では膵外分泌低形成に伴って糖尿病を発症する。我々はそのマウス組織を用いてマイクロアレイ解析、胎生膵組織への候補因子添加実験によって、外分泌組織由来の責任因子の同定に成功した。つまり i) ケモカイン TFF2 が胎生期外分泌組織特異的に発現し、その受容体 CXCR4 はインスリン細胞に発現していること、ii) 胎生膵組織培養に TFF2 を添加すると抗アポトーシス作用によってインスリン細胞数が増加し、その効果は CXCR4 阻害剤の共添加でキャンセルされることを証明した。つまり膵発生における内分泌-外分泌連関の分子機構として、外分泌組織由来

の TFF2 が内分泌細胞のアポトーシスを抑制することで膵島発生をサポートしていることを明らかにした (Hirata et al, SciRep. 2019, 9:1636)。しかしながら、外分泌組織から内分泌細胞へ増殖を促すような他のシグナルが存在するのか？あるいは、成体膵においても胎生期のような外分泌-内分泌クロストークが存在するのか不明であった。

研究 1-2 : 膵外分泌組織特異的 Pdx1 強制発現を用いたクロストーク因子の同定

クロストークを担う新規因子を更に探索した。先に行った Pdx1 の LOF(loss of function)実験に続いて、GOF(gain of function)実験を成体膵で行った。マウス成体膵外分泌細胞で Pdx1 を強制発現 (Pdx1-OE) させると(Ptf1a-CreER; Pdx1-OE)、驚くべきことにインスリン産生細胞の増殖能が上昇し、強制発現後 1 ヶ月で巨大膵島を形成した (図 1)。その外分泌由来の責任因子を同定すべく、



マウス組織のマイクロアレイ解析、及び Pdx1 を強制発現させた膵外分泌細胞株 266-6 細胞の RNA / protein 発現解析によって、遂にケモカイン CCL5 を候補因子として見出した (図 2)。次に膵外分泌由来の CCL5 が膵島内分泌細胞に対して増殖を促す機能があるかどうか検証するために、成体マウス分離膵島に CCL5 を添加し培養実験を行った。

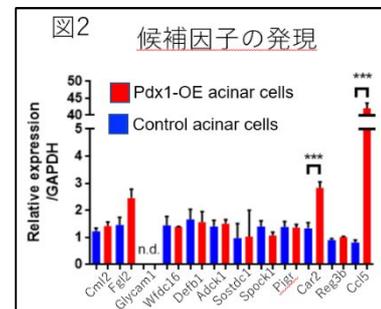
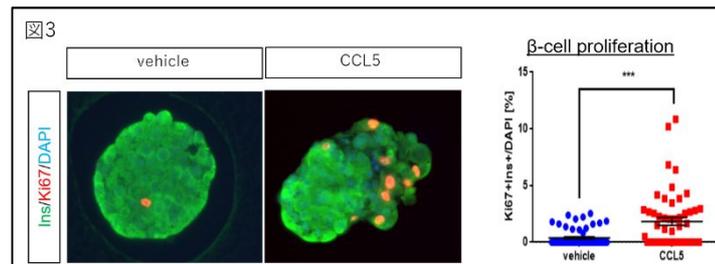


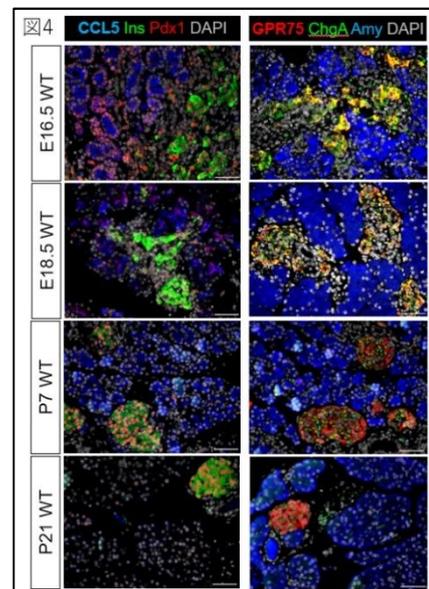
図 3 のように CCL5 添加によって分裂する膵島細胞が有意に増加しており、外分泌由来の因子 CCL5 は成体内分泌細胞 (細胞) の増殖を制御で



きる因子であることが検証できた。この結果は、(研究 2 のテーマである) 再生医療応用の観点からも、非常にインパクトが高いと言える。

研究 1-3 : 新たに同定した外分泌-内分泌クロストーク因子 CCL5 の生理学的意義

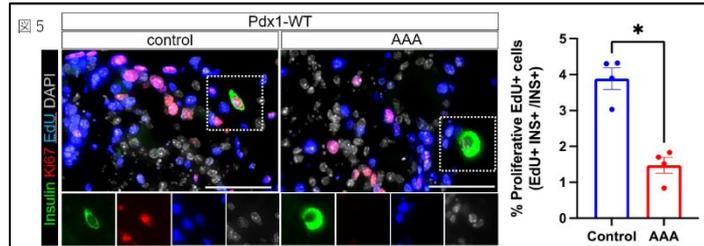
発現パターン解析: 新規因子 CCL5 の生理学的な役割を明らかにするため、まず野生型マウスを用いて発現パターンを解析した。これまでの解析で、Pdx1 強制発現した膵外分泌細胞では成体期でも CCL5 発現を認めたが、野生型マウスでは約 3 週齢以降になると CCL5 発現がほぼ消失していた。また遡って胎生期に着目すると、胎生 15 日前後から CCL5 は外分泌組織に局限して強く発現し始めており、Pdx1 がこの時期に外分泌組織に発現していることと一致した。以上、CCL5 の生理学的な役割を検討するには、



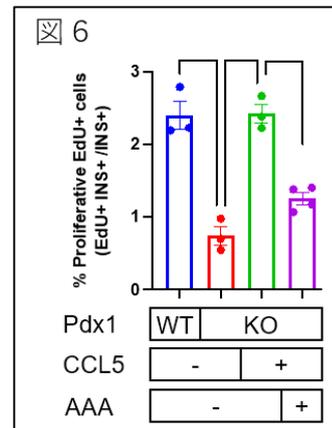
胎生期に焦点を絞ることが妥当であると考えた。

また同時に行った CCL5 受容体の発現解析では、胎生期早期から成体期を通して内分泌細胞に限局して CCL5 受容体 GPR75 が発現しており、クロストークの受け手側として矛盾しない結果であった(図4)。

胎生期膵内分泌細胞増殖における CCL5 の役割：膵外分泌由来の CCL5 が胎生期内分泌細胞の増殖を制御しているか検証するために、胎生 16 日の野生型マウスから膵臓を摘出し、CCL5 受容体(GPR75)阻害剤 AAA を添加し ex vivo 培養した。図5のように、CCL5 signal を阻害すると、細胞の増殖が低下した。つまり外分泌由来の CCL5 が細胞に到達し GPR75 受容体を通して増殖を刺激していると考えられた。



Pdx1-CCL5-GPR75 axis の検討：先の CCL5 発現パターン解析から、CCL5 は外分泌細胞の Pdx1 と発現パターンが似通っていたため、CCL5 の発現は Pdx1 の制御を受けると予想した。それに一致して、胎生期外分泌細胞特異的 Pdx1 ノックアウトでは CCL5 発現が著名に低下していた。先の研究 1-1 の Pdx1 の LOF 実験で、Pdx1 ノックアウトにより外分泌由来因子 TFF2 が発現減弱し、細胞がアポトーシスを起こすことを示したが、一方で細胞の増殖が低下した理由は未解明であった。胎生 16 日の外分泌細胞特異的 Pdx1 ノックアウト膵臓に CCL5 を添加して培養すると細胞の増殖が野生型と同等まで回復し、さらに CCL5 受容体阻害剤 AAA も追加で添加するとその rescue 効果は減弱した(図6)。つまりマウス胎生期の外分泌細胞における Pdx1 発現が CCL5 分泌を促し、内分泌組織まで到達した CCL5 は細胞の GPR75 受容体を通して細胞増殖を促進していると考えられた。



研究 2：ヒト病態における外分泌組織由来因子の意義解明と臨床応用に向けた検討

上記研究 1 はマウスにおける検討であったが、ヒトにおける TFF2 及び CCL5 の役割の解明に向けて現在も取り組んでいる。健常者及び腫瘍組織標本を用いて発現を検討し、ヒトにおける生理学的・臨床病理学的意義を明らかにしたい。また多能性幹細胞からの細胞分化誘導法に、本知見を応用し検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Kenzo, Masui Toshihiko, Yogo Akitada, Uchida Yuichiro, Sato Asahi, Kasai Yosuke, Nagai Kazuyuki, Anazawa Takayuki, Kawaguchi Yoshiya, Uemoto Shinji	4. 巻 27
2. 論文標題 Chloroquine induces apoptosis in pancreatic neuroendocrine neoplasms via endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine-Related Cancer	6. 最初と最後の頁 431-439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/ERC-20-0028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamauchi Yuki, Kodama Yuzo, Uza Norimitsu, Masuda Atsuhiko, Tatsuoka Hisato, Masui Toshihiko, Inagaki Nobuya, Uemoto Shinji, Chiba Tsutomu, Seno Hiroshi	4. 巻 80
2. 論文標題 Rb and p53 Execute Distinct Roles in the Development of Pancreatic Neuroendocrine Tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3620-3630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-2232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamane Kei, Anazawa Takayuki, Tada Seiichiro, Fujimoto Nanae, Inoguchi Kenta, Emoto Norio, Nagai Kazuyuki, Masui Toshihiko, Okajima Hideaki, Takaori Kyoichi, Sumi Shoichiro, Uemoto Shinji	4. 巻 10
2. 論文標題 Mitomycin C treatment improves pancreatic islet graft longevity in intraportal islet transplantation by suppressing proinflammatory response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-69009-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masui T, Sato A, Nakano K, Uchida Y, Yogo A, Anazawa T, Nagai K, Kawaguchi Y, Takaori K, Uemoto S.	4. 巻 49
2. 論文標題 Predictive value of the Ki67 index for lymph node metastasis of small non-functioning pancreatic neuroendocrine neoplasms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 593-600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-019-01779-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Koji, Kodama Sota, Nakano Yasuhiro, Minaki-Nakagawa Yasuko, Aoyama Yoshiki, Sakikubo Morito, Goto Toshihiko, Yoshida Masahiro, Masui Toshihiko, Yamamoto Takuya, Uemoto Shinji, Kawaguchi Yoshiya	4. 巻 9
2. 論文標題 Exocrine tissue-driven TFF2 prevents apoptotic cell death of endocrine lineage during pancreas organogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38062-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi Masashi, Yoshida Masahiro, Hirata Koji, Furuyama Kenichiro, Masui Toshihiko, Uemoto Shinji, Kawaguchi Yoshiya	4. 巻 593
2. 論文標題 Senescence caused by inactivation of the homeodomain transcription factor Pdx1 in adult pancreatic acinar cells in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2226-2234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13504	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masui Toshihiko, Sato Asahi, Nakano Kenzo, Uchida Yuichiro, Yogo Akitada, Anazawa Takayuki, Nagai Kazuyuki, Kawaguchi Yoshiya, Takaori Kyoichi, Uemoto Shinji	4. 巻 49
2. 論文標題 Predictive value of the Ki67 index for lymph node metastasis of small non-functioning pancreatic neuroendocrine neoplasms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 593-600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-019-01779-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Koji, Kodama Sota, Nakano Yasuhiro, Minaki-Nakagawa Yasuko, Aoyama Yoshiki, Sakikubo Morito, Goto Toshihiko, Yoshida Masahiro, Masui Toshihiko, Yamamoto Takuya, Uemoto Shinji, Kawaguchi Yoshiya	4. 巻 9
2. 論文標題 Exocrine tissue-driven TFF2 prevents apoptotic cell death of endocrine lineage during pancreas organogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1636-1644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38062-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Anazawa Takayuki、Okajima Hideaki、Masui Toshihiko、Uemoto Shinji	4. 巻 3
2. 論文標題 Current state and future evolution of pancreatic islet transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 34-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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	長井 和之 (Nagai Kazuyuki) (30567871)	京都大学・医学研究科・特定病院助教 (14301)	
研究分担者	上本 伸二 (Uemoto Shinji) (40252449)	滋賀医科大学・医学部・学長 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------