

機関番号： 22701
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2008 ~ 2010
 課題番号： 20591532
 研究課題名 (和文) 膵幹細胞を起点とした腫瘍化プロセスにおけるポリコム群遺伝子の機能解析
 研究課題名 (英文) Analysis of Polycomb group gene role in pancreatic cancer development from pancreatic stem cell
 研究代表者
 大島 祐二 (OSHIMA YUJI)
 横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
 研究者番号： 10468209

研究成果の概要 (和文)： 本研究では膵幹/前駆細胞の自己複製制御の破綻によって生じる膵発癌モデルの理解に向け、転写因子 Pdx1 の発現を指標とした膵幹/前駆細胞の選択的単離法の確立、および、幹細胞の自己複製制御に関わるとされるポリコム群遺伝子 Bmi1 の機能解析を行った。その結果、膵幹/前駆細胞の増殖・分化は Bmi1 の過剰発現時に変化を認めなかった。膵発癌プロセスを生体内で解析することが重要と考えられたため、Pdx1 陽性細胞において恒常活性化型 Kras 変異を誘導することが出来る膵発癌モデルマウス (Pdx1-Cre;LSL-KrasG12D mouse) を用いて発癌プロセスを再構成し、発癌過程を解析した。その結果、幹細胞の局在部位と考えられる小葉内/間導管近傍で高頻度に前癌病変像 (PanIN) が観察された。本研究より、膵幹/前駆細胞の分離技術が確立され、さらに膵発癌過程において膵幹細胞の活性化が生じている可能性が見い出された。今後、より詳細な膵発癌メカニズム解明への展開が期待される。

研究成果の概要 (英文)： Dysregulation in the pathway that control normal stem-cell self-renewal is considered a key early event in carcinogenesis. To reveal the involvement of Polycomb-group (PcG) genes in early event in pancreatic cancer development, we analyzed the function of the PcG gene Bmi1 in murine pancreatic stem/progenitor cells. As a result, overexpressed Bmi1 did not enhance the proliferation capability and differentiation capability of pancreatic stem/progenitor cells. We also examined activation of pancreatic stem/progenitor cells in pancreatic tumor formation in a pdx1-cre mediated Kras G12D expression model mouse. Histological analysis revealed that Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) was observed in intra/ interlobular pancreatic ducts of pancreas with high frequency. These results will enable us to better understand the process of pancreatic cancer development from pancreatic stem/progenitor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：膵臓、幹細胞、フローサイトメーター、ヒストン修飾、ポリコーム群タンパク質

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は組織の発生や恒常性維持で重要な機能を担う。膵幹細胞が娘細胞を供給し続けるためには、幹細胞の最も重要な特性である自己複製能が適切に制御される必要がある。一方で幹細胞の自己複製に異常が生じた場合、腫瘍形成を含む様々な疾患に至ることが明らかにされつつあり、その理解は重要である。幹細胞の自己複製では細胞増殖や細胞分化に関わる複数の遺伝子群の統合的な発現調節が重要と考えられ、エピジェネティック制御系が重要な役割を担っていると考えられる。我々はこれまでに、ヒストン修飾制御を介して様々な発生関連遺伝子の発現制御を担うポリコーム群タンパク質 Bmi1 が肝幹/前駆細胞の自己複製を正に制御していることを明らかにし、さらに、肝幹/前駆細胞で Bmi1 を過剰に発現させると肝発癌に至ることを見いだしている。一方、膵幹/前駆細胞におけるポリコーム群タンパク質の機能については未解明な点が多い。膵幹細胞における自己複製制御機構の理解は、正常な膵幹細胞の維持機構の理解に繋がるだけでなく、膵幹細胞の活性化と関連するとされる膵発癌プロセスの理解に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

膵幹/前駆細胞の自己複製制御機構の理解に向けて、様々な幹細胞の自己複製への関与が示されているポリコーム群タンパク質の役割を膵幹/前駆細胞において検討する。また、膵幹/前駆細胞を起点とした膵発癌プロセスを再構成し、発癌機構の理解を図る。

3. 研究の方法

(1) 膵幹細胞の選択的単離法の確立

作出した $pdx1::DsRed2$ トランスジェニックマウスより膵臓を摘出し、コラゲナーゼおよびディスパーゼを含む緩衝液を用いて細胞浮遊液を調製した。その後、

フローサイトメトリーを用いて DsRed2 の発現強度および側方散乱光強度に基づき画分化を行った。各画分細胞を低密度条件で培養し、クローン性コロニー形成時の細胞増殖・分化マーカーの発現を評価した。

(2) Bmi1 を過剰発現させた膵幹/前駆細胞の特性解析

マウス Bmi1 遺伝子の完全長が組み込まれたレトロウイルスベクタープラスミド (pGCDNsam-Bmi1-IRES-EGFP) を構築し、HEK293 細胞に導入した後、培養上清を回収した。レトロウイルスベクターを低密度培養 1 日目の膵幹/前駆細胞に感染させ、その後のクローン性コロニー形成を観察した。培養 7 日目に形成されたコロニーの構成細胞数および各種分化マーカー (Insulin, Glucagon, Somatostatin 等) の発現を検討した。

(3) 膵幹/前駆細胞を起点とした膵発癌モデルの検討

作出された $Pdx1-Cre;LSL-KrasG12D$ マウスより様々な時期の膵臓を回収し組織学的解析を行った。このマウスモデルでは、生後数週で PanIN が出現し、週齢とともに、PanIN のステージが進行するとされる。なお、組織解析にあたっては、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色、Pdx1 等の特異抗体を用いた組織化学を行った。

4. 研究成果

(1) 膵幹細胞の選択的単離法の確立

転写因子 Pdx1 は膵幹細胞の特異マーカーとして有用視されている。本研究では、はじめに Pdx1 陽性細胞が膵幹/前駆細胞として機能を有するか否かを検討し、膵幹細胞の選択的単離法の確立を試みた。フローサイトメトリーを用いて膵幹/前駆細胞を選択的に単離するため、Pdx1 プロモーターの制御下で DsRed2 が発現する $pdx1::DsRed2$ トランスジェニックマウスを作出した。その後、

Pdx1 の発現に基づき、フローサイトメトリーを用いて Pdx1-DsRed2 Tg 新生仔マウスの膵臓細胞を画分化し、各画分細胞について特性解析を行った。その結果、DsRed2^{dim}SSC^{mid}画分中の膵管上皮細胞に多分化能と高い増殖能を有する細胞が存在することが明らかとなった。また、この画分中には非対称分裂を恒常的に繰り返すクローンが存在することが明らかとなった。これらのことから DsRed2^{dim}SSC^{mid}画分中に膵幹/前駆細胞が限定的に存在することが明らかとなった。

(2) Bmi1 を過剰発現させた膵幹/前駆細胞の特性解析

我々が肝幹/前駆細胞を対象として行った先行研究では、ポリコム群遺伝子 Bmi1 の発現増加時に肝幹/前駆細胞の未分化性を維持した細胞増殖が亢進することが明らかとなっている。そこで、膵幹/前駆細胞における Bmi1 の役割を明らかにするため、*in vitro* コロニーアッセイ系を用いて膵幹/前駆細胞のクローン性コロニー形成過程における Bmi1 の機能解析を行った。選択的に単離した膵幹/前駆細胞を低密度に播種し、レトロウイルスベクターを用いて Bmi1 の過剰発現をさせ、その後のクローン性コロニー形成過程を観察した。検討の結果、膵幹/前駆細胞においては Bmi1 を過剰発現させてもコロニー形成に変化を生じないことが明らかとなった。このことから、Bmi1 を過剰発現させた膵幹/前駆細胞の自己複製は亢進していない可能性が高いものと考えられた。

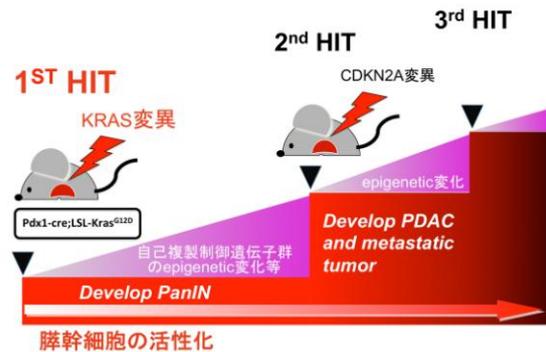
(3) 膵幹/前駆を起点とした膵発癌モデルの検討

膵幹/前駆細胞の自己複製は Bmi1 の過剰発現時に亢進しないものと考えられた。膵幹細胞の活性化を介した腫瘍形成過程を理解するためには、ヒト膵癌の性質や組織像を良く再現する動物モデルを用いて生体内で自己複製制御因子の機能解析を行う事が重要と考えられたため、恒常活性型 Kras 変異マウス (Pdx1-Cre;LSL-KrasG12D マウス) を用いて膵幹/前駆細胞を起点とした発癌プロセスを再構成して評価した。その結果、Pdx1-Cre; LSL-KrasG12D マウスでは生後9週頃までに膵管中に粘液性の扁平上皮細胞から構成される前癌病変像 (PanIN) が生じていることが観察された。次に、PanIN の発生部位について

検討を行ったところ、主膵管や小葉内導管に比べて小葉間導管において PanIN が高頻度に生じていることが明らかとなった。これまでに、我々は小葉間導管において膵幹細胞が存在するのを見いだしていることから、膵発癌過程において膵幹細胞の活性化が生じている可能性が示唆された。

今後、より詳細な膵発癌メカニズム解明の展開が期待出来る。

膵幹細胞を起点とした多段階膵発癌モデル



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6件)

1. Ishikawa M, Sekine K, Okamura A, Zheng YW, Ueno Y, Koike N, Tanaka J, Taniguchi H, Reconstitution of hepatic tissue architectures from fetal liver cells obtained from a three-dimensional culture with a rotating wall vessel bioreactor, J Biosci Bioeng. 2011, 111(6):711-8. 査読有り.
2. Koike N, Cho A, Nasu K, Seto K, Nagaya S, Ohshima Y, Ohkohchi N, Role of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the differential diagnosis of focal hepatic lesions. World J Gastroenterol., 2009, 15: 5805-5812, 査読有り.
3. Wang J, Koyota S, Zhou X, Ueno Y, Ma L, Kawagoe M, Koizumi Y, Okamoto H, Sugiyama T., Expression and localization of Regenerating gene I in a rat liver regeneration model,

Biochem Biophys Res Commun. 2009, 13:380(3):472-7. 査読有り.

4. 上野康晴, 内藤貴子, 谷口英樹, ポリコーン群タンパク質を介した肝幹細胞の自己複製制御, 生物物理化学, 2009, 53(4): 115-119. 査読有り.
5. 谷口英樹, 内藤貴子, 上野康晴, 肝幹細胞の自己複製機構, 肝胆膵別冊, 2008, 57(3)355-361. 査読無し.
6. 谷口英樹, 上野康晴, 肝臓における組織幹細胞, 日本臨床, 2008, 66(5)932-938, 査読無し.

[学会発表] (計 34 件)

1. 石川桃太郎, 関根圭輔, 松井智栄美, 須崎敦大, 川下金明, 大島祐二, 鄭允文, 谷口英樹, Pdx1 の発現を指標とした膵管上皮中に存在する膵幹/前駆細胞の特性解析, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月, 東京
2. 上野康晴, 小池博之, 椎名智也, 内藤貴子, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, ポリコーン群タンパク質 Ring1B を介したマウス肝幹細胞の自己複製制御, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月, 東京.
3. 小池博之, 上野康晴, 小花祐太, 椎名智也, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, マウス肝幹/前駆細胞におけるポリコーン群タンパク質 Ezh2 の機能解析, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月, 東京.
4. Zheng YW, Li B, Kimura M, Ueno Y, Taniguchi H, Self-renewal versus differentiation in vitro of human hepatic stem cells, BIT's 3rd Annual world Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells 2010, Dec. 5-7, 2010, Shanghai, China.
5. 石川桃太郎, 関根圭輔, 須崎敦大, 川下金明, 大島祐二, 松井智栄美, 鄭允文, 谷口英樹, 膵管上皮細胞中に存在する膵幹/前駆細胞の選択的分離と特性解析, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月, 神戸.
6. 小池博之, 上野康晴, 内藤貴子, 椎名智也, 小花祐太, 磯野協一, 古関明彦,

谷口英樹, マウス肝幹細胞の自己複製におけるポリコーン群タンパク質 Ring1B の機能解析, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月, 神戸.

7. 小花祐太, 上野康晴, 小池博之, 椎名智也, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, 肝幹細胞におけるポリコーン群タンパク質 Ezh2 の機能解析, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月, 神戸.
8. 関根圭輔, 藤原綾二, 小池直人, 千葉豊生, Dai Fukumura, Rakesh K. Jain, 上野康晴, 鄭允文, 谷口英樹, 血管ネットワークを有したヒト肝組織の生体内再構築系の確立, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月, 神戸.
9. 関根圭輔, 石川桃太郎, 松井智栄美, 須崎敦大, 川下金明, 大島祐二, 鄭允文, 谷口英樹, 転写因子 Pdx1 の可視化による膵幹/前駆細胞の選択的分離と特性解析, 第 19 回日本バイオイメーシング学会学術集会, 2010 年 9 月, 神奈川.
10. Zheng YW, Li B, Miyabe Y, Ueno Y, Taniguchi H, Clonal identification and differentiation of human hepatic stem cells, 8th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June, 2010, San Francisco, USA.
11. 小池直人, 大島祐二, 武内俊章, 有田誠司, 障害肝合併例における脾摘・部分的脾塞栓療法の意義, 第 65 回日本消化器外科学会総会, 2010 年 7 月, 山口.
12. 小池直人, 大島祐二, 武内俊章, 有田誠司, 大河内信弘, 当科における膵空腸密着吻合法と術後排液アミラーゼ値の推移, 第 22 回日本肝胆膵外科学会・学術集会, 2010 年 5 月, 仙台.
13. 椎名智也, 上野康晴, 内藤貴子, 小花祐太, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, 肝幹細胞の自己複製制御におけるポリコーン群タンパク質 Ring1B の機能解析, 第 9 回日本再生医療学会総会, 2010 年 3 月, 広島.
14. 嶋尾大樹, 鄭允文, 田中寛康, 滝口和也, 櫻井裕, 上野康晴, 石橋直人, 柳田慎吾, 谷口英樹, 非環式レチノイド

- による肝発癌抑制作用の検討, 第9回日本再生医療学会総会, 2010年3月, 広島.
15. 藤原綾二, 小池直人, 千葉豊生, Dai Fukumura, Rakesh K. Jain, 関根圭輔, 上野康晴, 鄭允文, 谷口英樹, in vivoにおける血管ネットワークを有したヒト肝組織再構築系の確立, 第9回日本再生医療学会総会, 2010年3月, 広島.
 16. 椎名智也, 上野康晴, 内藤貴子, 小花裕太, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, The polycomb group gene Ring1B is regulate the self-renewal of hepatic stem cells, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月, 横浜.
 17. 小花祐太, 上野康晴, 宮部陽介, 内藤貴子, 古関明彦, 谷口英樹, Role of a polycomb group gene Ezh2 in the self-renewal of murine hepatic stem cells, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月, 横浜.
 18. 谷口英樹, 上野康晴, 内藤貴子, 古関明彦, 肝臓の器官形成におけるポリコム群タンパク質 Ring1B の機能解析, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月, 神戸.
 19. 上野康晴, 内藤貴子, 谷口英樹, 肝幹細胞におけるポリコム群タンパク質 Ring1B の機能解析, 第51回日本消化器病学会大会, 2009年10月, 京都.
 20. 上野康晴, 内藤貴子, 鄭允文, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, 肝幹細胞におけるポリコム群遺伝子 Ring1B の機能解析, 第68回日本癌学会学術集会, 2009年10月, 横浜.
 21. Koike N, Cho A, Ohshima Y, Arita S, Takeuchi T, Tanaka H, Kawakami M, Ohkohchi N, Extended right hepatectomy with portal vein resection and reconstruction used by renal vein graft prior to hepatic dissection for hilar cholangiocarcinoma, International Surgical Week 2009, 2009, September, Australia.
 22. Ueno Y, Naito T, Zheng Y.W., Isono K, Koseki H, Taniguchi H, The Polycomb gene Ring1B is essential for the expansion of hepatic stem cells in the developing liver, 7th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June, 2009, Barcelona, Spain.
 23. 小池直人, 趙明浩, 有田誠司, 大島祐二, 武内俊章, 川島太一, 田中元, 河上牧夫, 大河内信弘, 腎静脈グラフトを用い門脈再建を先行させた肝門部胆管癌に対する拡大肝右葉切除術, 第21回日本肝胆膵外科学会・学術集会, 2009年6月, 名古屋.
 24. Naito T, Ueno Y, Zheng Y.W, Isono K, Koseki H, Taniguchi H, The role of polycomb group gene Ring1B in the proliferation of hepatic stem cells., 第7回幹細胞シンポジウム, 2009年5月, 東京.
 25. Li B, Zheng Y.W, Miyabe Y, Ueno Y, Taniguchi H, The prospective identification and differentiation of human hepatic stem cells, 第7回幹細胞シンポジウム, 2009年5月, 東京.
 26. Takebe T, Kobayashi S, Inui M, Emoto Y, Ueno Y, Zheng Y.W., Maegawa J, Taniguchi H, Identification of human cartilage progenitor cells in the perichondrium of auricular cartilage, 第7回幹細胞シンポジウム, 2009年5月, 東京.
 27. 石川桃太郎, 須崎敦大, 川下金明, 大島祐二, 上野康晴, 鄭允文, 谷口英樹, 可視化膵幹細胞を用いた新規非対称分裂解析系の構築, 第8回日本再生医療学会総会, 2009年3月, 東京.
 28. 内藤貴子, 上野康晴, 宮部陽介, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, 肝幹細胞の自己複製におけるポリコム群遺伝子 Ring1B の機能, 第8回日本再生医療学会総会, 2009年3月, 東京.
 29. 藤原綾二, 仲野晶, 岡村愛, 喜多清, 上野康晴, 鄭允文, 谷口英樹, 微小重力発生装置で創出した人工膵島による糖尿病の治療, 第8回日本再生医療学会総会, 2009年3月, 東京.
 30. 大島祐二, 小池直人, 井坂直秀, 有田誠司, 田中元, 川島太一, 武内俊章, 趙明浩, 清水進一, 大河内信弘, 術後化学療法が著効した大腸腺内分泌細胞癌肝転移の1例, 第46回日本癌治療学

会，2008年10月，名古屋.

31. 大島祐二，小池直人，武内俊章，川島太一，山本盛雄，小林寛，有田誠司，田中元，大河内信弘，膵癌との鑑別が困難であった自己免疫性膵炎の2切除例，日本消化器外科学会雑誌，2008年7月，札幌.
32. 小池直人，長屋重幸，有田誠司，田中元，大島祐二，川島太一，武内俊章，山本盛雄，大河内信弘，肝細胞癌におけるMR I 拡散強調画像の意義，日本消化器外科学会雑誌，2008年7月，札幌.
33. 内藤貴子，上野康晴，宮部陽介，磯野協一，古関明彦，谷口英樹，肝幹細胞の自己複製におけるポリコーム群遺伝子 Ring1B の機能解析，第6回幹細胞シンポジウム，2008年5月，東京.
34. 内藤貴子，上野康晴，宮部陽介，磯野協一，古関明彦，谷口英樹，肝幹細胞の自己複製機構にポリコーム群遺伝子 Ring1A/B が関与する，第2回エピジェネティクス研究会，2008年5月，三島.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 祐二 (OSHIMA YUJI)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：10468209

(2) 研究分担者

上野 康晴 (UENO YASUHARU)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：60375235

(3) 連携研究者

()

研究者番号：