

平成 22年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20890172

研究課題名(和文)膵幹細胞の同定および膵再生過程の解明

研究課題名(英文)Lineage tracing of EPPK1-expressing cells: toward the elucidation of the mechanisms of pancreas regeneration

研究代表者

三木 梨可 (MIKI RIKA)

熊本大学・発生医学研究所・COEリサーチアソシエイト

研究者番号：30516133

研究成果の概要(和文)：Eepiplakin1(Eppk1)が、成体の膵幹細胞の指標となる可能性およびEppk1が発現した細胞から外分泌細胞や内分泌細胞などへ分化する可能性について検証をおこなうためにEppk1-CreERマウスを作出した。Eppk1-CreER;Z/EGマウスにタモキシフェンを投与し、通常状態でのGFPの発現パターン解析などをおこなった。

研究成果の概要(英文)：The expression of Eppk1 was found in the islet cells during the regeneration process. To genetically trace the EPPK1 expressing cells in the regeneration, we have attempted to establish transgenic mouse lines and I have obtained several EPPK1-CreER transgenic mouse lines. EPPK1-CreER; Z/EG mice were injected with tamoxifen (Tm). After Tm injection, I checked GFP expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000円	402,000円	1,742,000円
2009年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000円	762,000円	3,302,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病、膵再生、膵細胞

1. 研究開始当初の背景

膵臓は成体において膵部分切除あるいはStreptozotocin(STZ)投与やセルレイン投与などによる膵島障害や膵炎の誘発モデルにおいて、膵再生が観察されている。この成体膵における膵再生が、1. 膵幹細胞に由来す

る。2. 膵の体性幹細胞は存在せず、細胞や外分泌細胞自身の増殖により再生している。という二つの可能性が示唆されている。このように、膵幹細胞の存在についての見解が分かれているのは、膵幹細胞マーカーが同定されていないという問題点があることに

起因していると考えられる。

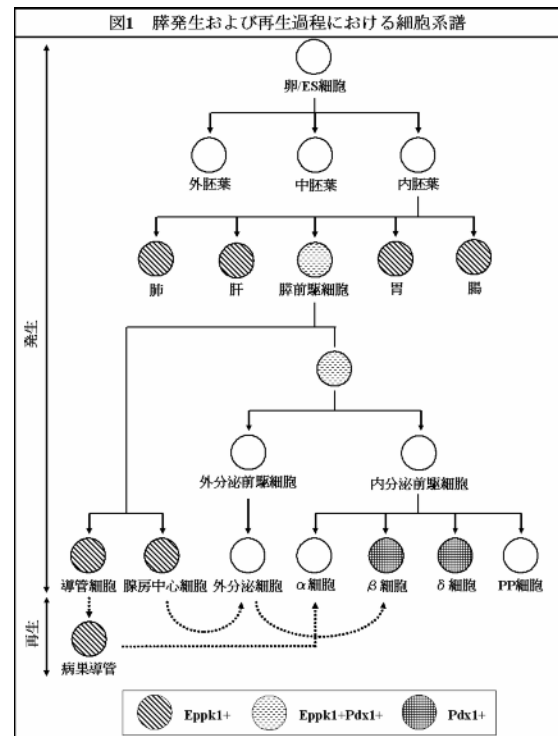
これまでに申請者の所属する研究室において、膵前駆細胞特異的に発現することが知られている Pdx1 陽性の細胞をマウス ES 細胞から効率よく分化誘導することに成功している。この ES 細胞由来の Pdx1 陽性細胞において、発現が亢進している遺伝子を同定するためマイクロアレイをおこなっている。その亢進している遺伝子の一つとして Epiplakin1 (Eppk1) を同定した。

この EPPK1 は、Plakin ファミリーに属しており細胞内において中間径フィラメントと結合することが報告されている。さらに近年、EGF レセプターと結合することも明らかにされ、EGF シグナリングへの関与も示唆されている。しかし、EGF シグナルにおける Eppk1 の役割については不明である。

さらに申請者の所属研究室では、マウス胎仔において Eppk1 が、膵発生初期から Pdx1 陽性の膵前駆細胞で発現しており、成体膵臓では、腺房中心細胞で Eppk1 が発現していることを明らかにした。この腺房中心細胞は、膵炎において組織幹細胞として働くことが報告されており、セルレイン投与による膵炎モデルで Eppk1 陽性細胞の増殖が観察された。また膵部分切除により導管細胞が脱分化し病巣導管と呼ばれる多分化能を有する細胞が観察されることが報告されており、この病巣導管において Eppk1 の発現が観察された。

さらに、STZ 投与による糖尿病モデルにおいて、Eppk1 の発現細胞が一過的に増えることが観察され、膵再生過程において Eppk1 発現細胞から内分泌細胞への分化が生じている可能性が示唆された(申請者の所属研究室における未発表データ)。

以上の結果から、全ての膵障害モデルにおいて **Eppk1 が成体の膵幹細胞の指標となること**が強く示唆された。また、**Eppk1 を発現する細胞から内分泌細胞や外分泌細胞へ分化する可能性**が推測された。



2. 研究の目的

Eppk1 が成体の膵幹細胞の指標となること、図1に示すように Eppk1 を発現する細胞から内分泌細胞などへ分化する可能性について明らかにすることを目的とした。

具体的には

(1) STZ 投与およびセルレイン投与、部分膵切除の三種類の膵障害において、それぞれ Eppk1 発現細胞から内分泌細胞や外分泌細胞が生じるのか解析し、Eppk1 が膵再生過程における膵幹細胞マーカーであるか明らかにする。

(2) 通常状態で Eppk1 を発現する腺房中心細胞から、外分泌細胞や内分泌細胞が生じるのか解析し、Eppk1 が通常状態における膵幹細胞マーカーであるか明らかにする。

(3) Eppk1 が膵幹細胞マーカーであることが明らかになった場合、通常状態や膵障害時における Eppk1 陽性細胞を分離し、*in vitro* において内分泌細胞への分化を誘導する因子の同定をめざす。

さらに、Eppk1 の機能を明らかにするために、(4) Eppk1 と結合するタンパク質を同定する。

3. 研究の方法

(1) Eppk1-CreER マウスの作製

BAC クローンを用いて、Eppk1 発現下で CreER 遺伝子が発現するようなコンストラクトを作製した。この Eppk1-CreER コンストラクトを用いて熊本大学 動物資源開発研究部門 (CARD) に Eppk1-CreER マウスの作製を依頼した。

22 匹のマウスが生まれ、ジェノタイピングをおこなった結果、Founder マウスは 6 匹であった。得られた Founder マウスをもちいて F1 および F2 マウスを作出し、Eppk1-CreER マウスの系統確立をおこなった。

(2) Eppk1-CreER マウスをもちいた膵再生過程の解析

系統確立をおこなった Eppk1-CreER マウスと CAG-loxP-LacZ-loxP-EGFP (Z/EG) マウスを交配し、Eppk1-CreER; Z/EG マウスを作出した。Eppk1-CreER; Z/EG マウスにタモキシフェンを投与し、

GFP の発現が腺房中心細胞で観察されるかを確認する。その後、STZ 投与やセルレイン投与、膵部分切除により GFP の発現が、Eppk1 の免疫染色の結果と一致するか確認する。さらに、経時的に GFP 陽性細胞が、外分泌細胞や内分泌細胞に分化しているか免疫組織化学などをおこない Eppk1 を指標とし膵再生過程を詳細に解析する。

(3) Eppk1-mRFP マウスを作製するためのコンストラクトの作成

Eppk1-mRFP マウスを作製するためのコンストラクトを(1)と同様に、BAC クローンをもちいて作成した。

(4) Eppk1 と結合するタンパク質の同定

CMV プロモーターを付加した Eppk1 遺伝子の部分配列に FLAG タグを付加したプラスミドベクターを作製した。このプラスミドベクターをもちいて、Eppk1 部分タンパク質を培養細胞の HEC293 をもちいて産生させた。Eppk1-FLAG タンパク質と結合するタンパク質を免疫沈降により分離精製し、マスペクトルをもちいて、Eppk1 と結合するタンパク質を同定をおこなった(産業総合研究所の夏目先生との共同研究)。

4. 研究成果

(1) Eppk1-CreER マウスをもちいた膵再生過程の解析

Eppk1 が成体の膵幹細胞の指標となる可能性および Eppk1 が発現した細胞から外分泌細胞や内分泌細胞などへ分化する可能性について検証をおこなうために Eppk1-CreER マウスを作出した。Eppk1-CreER マウスと Z/EG レポーターマウスを交配し、Eppk1-CreER; Z/EG マウスを作出した。

まずはじめに Eppk1 発現細胞で GFP の発現が観察されるかどうか明らかにすることを目的とし、Eppk1-CreER; Z/EG マウスにタモキシフェン投与をおこなった。Eppk1 はマウス尾の角化層、顆粒層でも発現していることが報告されている(図 2A-B)。

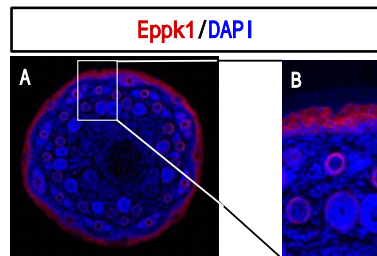


図 2

このことからタモキシフェン投与後、48 時間後にマウス尾を切断し GFP 発現がマウス尾の顆粒層で観察をおこなった。その結果、タモキシフェン投与から 48 時間後には GFP の蛍光が顆粒層で観察された(図 3A-E)。

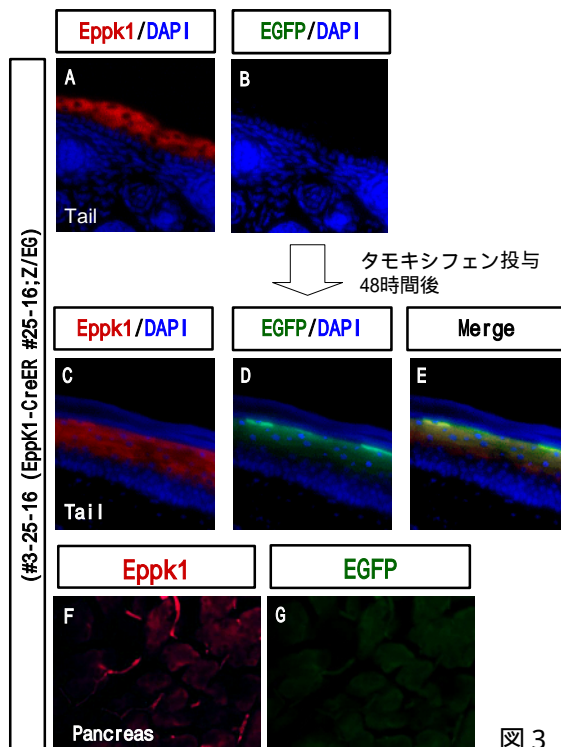


図 3

次に GFP 蛍光が尾で観察されたマウスを解剖し臍臓で、GFP の観察をおこなった。その結果、GFP 発現細胞は観察されなかった。

GFP が観察できない理由として、GFP 発現量が少なく蛍光として観察できていない可能性および CreER が Eppk1 発現細胞で発現していない可能性を考え、GFP および Cre の免疫染色をおこなった。その結果、GFP 陽性細胞は臍臓では観察されなかった(図 3F-G)。一方、Cre 陽性細胞を臍臓において観察することができた。このことから臍臓では 48 時間では Cre リコンビナーゼの活性化が不十分であることを推測した。タモキシフェンの投与条件などの最適化をおこなう必要があると思われる。

今後の展開

これまで成体臍における臍再生が、1. 臍幹細胞に由来する。2. 臍の体性幹細胞は存在せず、細胞や外分泌細胞自身の増殖により再生している。という二つの可能性が示唆されている。このように、臍幹細胞の存在についての見解が分かれているのは、臍幹細胞マーカーが同定されていないという問題点があることに起因していると考えられる。これまでの我々の研究から、Eppk1 は臍幹細胞マーカーである可能性が示唆されている。本研究課題により作出した Eppk1-CreER マウスをもちいることにより、臍障害時に再生過程で一過的に増加する Eppk1 陽性細胞が臍幹細胞であることを明らかにすることが可能である。

Eppk1 陽性細胞が成体における臍幹細胞であることが示され、さらに Eppk1 陽性細胞が脱分化し内分泌細胞へ分化する機構が明らかになれば、糖尿病患者から Eppk1 を発現する細胞を採取し、*in vitro*で細胞へ分化誘導し移植することが可能になる。さらに *in vivo*において Eppk1 陽性細胞を細胞へ分化誘導するという方法も考えられ、細胞移植ではなく投薬による治療という新たな治療法にも発展することが期待される。

(2) Eppk1 と結合するタンパク質の同定

Eppk1 は、Plakin ファミリーに属しており細胞内において中間径フィラメントと結合することが報告されている。さらに近年、EGF レセプターと結合することも明らかにされ、EGF シグナリングへの関与も示唆されている。しかし、細胞内における Eppk1 の役割

については不明である。このことから Eppk1 の機能を明らかにするため、Eppk1 と結合するタンパク質の同定をおこなった。

研究方法に示したように Eppk1 部分タンパク質を HEC293 に産生させ、Eppk1-FLAG タンパク質と結合するタンパク質を免疫沈降により分離精製、マスペクトルにより Eppk1 と結合するタンパク質を同定をおこなった。その結果、Eppk1 と結合する可能性が示唆されるタンパク質がいくつか新たに同定された。

今後の展開

これらのタンパク質が Eppk1 発現細胞で発現しているのかなど明らかにする予定である。またどのようなタンパク質と Eppk1 が結合しているのかが明らかになれば、臍再生過程や臍幹細胞の維持などに関与しているシグナルが明らかになる可能性がある。このことは将来的な細胞治療のみならず、投薬による再生の誘導などへの応用が期待される。

(3) Eppk1-mRFP マウスを作製するためのコンストラクトの作成

通常状態および臍再生時における Eppk1 発現細胞の遺伝子プロファイルを明らかにするため Eppk1-mRFP マウスを作出することを目的とし、Eppk1-mRFP コンストラクトを作製した。

今後の展開

Eppk1-mRFP マウスをもちいて、通常状態の Eppk1 陽性の腺房中心細胞および臍細胞障害時に一過的に増加する Eppk1 陽性細胞をセルソーターにより単離し mRFP 陽性細胞をもちいてマイクロアレイをおこない遺伝子発現プロファイルを明らかにする。

どのような遺伝子に発現量の差があるのかが明らかになれば、Eppk1 陽性細胞から臍細胞への分化を誘導に関与する因子を同定することが可能である。このことは *in vitro*における ES 細胞や iPS 細胞から臍細胞への分化誘導法の確立において非常に有用な情報になると思われる。

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)

[学会発表](計1件)

三木 梨可、吉田 哲、安川 貴規、糸 和彦、糸 昭苑

Lineage tracing of EPPK1-expressing cells:
toward the elucidation of the mechanisms of
pancreas regeneration

The 25th kumamoto medical bioscience symposium
& G-COE Program

平成21年11月12-13日

熊本全日空ホテルニューカイ(熊本県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三木 梨可 (MIKI RIKA)
熊本大学・発生医学研究所・COEリサーチア
ソシエイト
研究者番号：30516133

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：