

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591771

研究課題名（和文）急性膵炎後の膵再生機構の解明-膵転写因子 p t f 1 a に着目して-

研究課題名（英文）Mechanism of tissue regeneration after acute pancreatitis, focusing on pancreatic transcription factor ptf1a

研究代表者

増井 俊彦（MASUI TOSHIHIKO）

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：20452352

研究成果の概要（和文）：「膵外分泌組織の障害後には胎生期臓器形成機構が再び活性化して組織修復を行う」という仮説をたて、Cerulein 誘発急性膵炎モデルを用いて組織再生過程の ptf1a 機能解明を目指した。Ptf1a 低発現マウス ptf1a-cbll/cbll は膵臓が低形成となるが、Cerulein 刺激によってほぼ全てが死亡した為、再生過程における ptf1a の機能解明を Ptf1a 低発現マウスで解析する事は不可能であった。そこで、Sox9-CreER マウスを用いて成体膵管細胞で ptf1a を不活化した場合、Cerulein 刺激を加えずとも腺房細胞への分化が消失した。再生過程以前に膵外分泌組織維持そのものに ptf1a が必須であるという可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Based on a hypothesis that embryonic organogenic pathway is reactivated in the regenerative process after injury in the exocrine pancreatic tissue, we aimed to reveal an involvement of ptf1a transcription factor in the tissue regeneration after Cerulein induced acute pancreatitis model in mice. First, we tested the dosage of ptf1a by injecting Cerulein to the hypomorphic ptf1a mice (ptf1a-cbll/cbll). However, we could not determine the role of ptf1a in the regenerative process since most of the mice died after Cerulein treatment. Then we inactivated ptf1a in adult pancreatic duct cells in Sox9 CreER; ptf1a floxed; ROSA26r mice. Surprisingly, we observed lack of labeled acinar cell even in the non-Cerulein treated mice indicating that ptf1a is indispensable in the physiological organ maintenance of the exocrine pancreas tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	2,300,000	690,000	2,990,000
22年度	600,000	180,000	780,000
23年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
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・消化器外科学

キーワード：ptf1a、急性膵炎、膵発生、Notch、膵外分泌組織維持

## 1. 研究開始当初の背景

急性膵炎後の再生過程における分子メカニズムは長らく不明であった。そんな中、Jensenらにより、膵再生と来には膵発生時に見られる転写因子群が sequential に発現する事が報告されて以降、再生における発生機構の再現の可能性が指摘された。Ptf1a は胎生期に前腸由来内杯葉上皮（原始腸管）から膵臓、胆管、十二指腸が分化する際に、膵への運命決定遺伝子として機能する。更に、ptf1a 低発現マウスでは著明な膵低形成となる事から、単なる ptf1a 遺伝子発現の ON/OFF ではなく、発現量そのものによる量的制御によって細胞の運命が規定される事も分かって来た。

申請者は、ptf1a が ubiquitous 因子 E 蛋白および Rbp-J と 3 量体を形成する事で転写因子として働く事、同時に ptf1a のパートナーである Rbp-J が、成体膵では Notch independent な Rbp-L へとスイッチしてゆく事を世界に先駆けて報告した。また、ptf1a promoter 領域の解析から、ptf1a 自身による autoregulation の可能性も考えられた。

## 2. 研究の目的

胎生期に膵決定遺伝子として働く ptf1a が、成体膵においては外分泌組織特異的な発現をしている事、cerulein 誘発急性膵炎後の再生過程で ptf1a が強く発現する事から、膵再生の際の ptf1a の必要性とその制御の解析を行う事によって、発生と再生における共通点、相違点を明らかにする事、その上で発生学研究から集積されている知見を基礎として膵炎治療に役立つ視点を得る事を研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

膵炎後の再生過程に ptf1a が必要であるかどうかを検証する為に、さまざまな ptf1a 低発現アリルを用いた交配によって、ptf1a 発現量の異なるマウスを得る。例えば、cbl/cre マウスは ptf1a 発現量が正常の 1/6 以下であり、膵の成長は遅延するものの生存できる。ワイルドタイプマウスとの比較によって、caerulein 膵炎後の再生に ptf1a の発現が必須であるかどうか容易に明らかとなる。同時に ptf1a の発現量が 1/3 (cbl/cbl), 2/3 (cbl/wt) のマウスと比較することで ptf1a の発現量と再生の関係を検討する。また、ptf1a locus にノックインされた cre を使用し、ROSA マウスを掛け合わせることで lineage tracing を行い、膵炎後の再生の源となる細胞種が線房細胞であるかどうかを明らかにする。

さらに、ワイルドタイプマウスから得られた外分泌組織を材料として、再生過程に働く ptf1a の転写制御メカニズムを解析する。前

述の ptf1a binding motif が PTF3 量体のターゲットとなっているかどうか、その際に PTF-J と PTF-L のどのタイプが実際の転写にかかわっているのかを解析する事によって、発生時の ptf1a 転写調節と同じであるか、違うのかを明らかにする。

## 4. 研究成果

まず、ptf1a promoter に存在する ptf1a binding motif に関して、本当に同部位による制御がなされているかどうかの解析から始めた。ptf1a 上流約 13Kbp より 2.3kbp に認められる種保存性の高い部位を BAC クローンより切り出し、in vitro, in vivo にて Ptf1a による制御を解析したところ、何れにおいても PTF1 三量体により正の制御を受けていることが明らかとなった。また、同部位の制御は胎生 E10.5 より認められ、ptf1a の発現開始時期、および部位が一致していることから、膵発生の当初より ptf1a は自身の autoregulation を行っている可能性が示唆された。また ChIP においても膵組織では ptf1a 自身が三量体を形成して同部位に結合していることが明らかとなった。

Ptf1a 低発現マウス ptf1a-cbl1/cbl1 は膵臓が低形成となるが、Cerulein 刺激によってほぼ全てが死亡した為、実験のものが成立しなくなった。つまり、研究開始当初に計画した、「再生過程における ptf1a の機能解明を Ptf1a 低発現マウスで解析する事」は不可能であり、実験方法の大幅な変更を余儀なくされた。そこで、成体において ptf1a をノックアウトする事によって本研究の目的を達成すべく、タモキシフェン誘導性 Cre/loxP を用いた解析を行う方針とした。

タモキシフェン誘導性 Cre/loxP を用いた genetic lineage tracing は特定の細胞を標識し、その運命追跡を行う手法に応用され、成体臓器維持機構の解明や、臓器特異的黄身期細胞の同定に役立つ事が示されている。これまで、Elastase CreER;ROSA26r マウスを用いた解析から、成体膵外分泌組織は既存細胞の自己複製で維持されているとの報告があったが、我々は別研究として、成体膵腺房細胞が Sox9 陽性膵管細胞から生理的条件下でも Cerulein 誘発急性膵炎後の膵再生過程においても持続的な供給を受けていることを明らかにした (Furuyama et al. Nat. Genet. 2011)。そこで Sox9-CreERT2 マウスと floxed ptf1a マウス、更に ROSA26r レポーターマウスを交配し、Cerulein 誘発急性膵炎モデルを組み合わせる事によって組織障害後の再生過程における ptf1a の機能と ptf1a 不活化細胞の運命追跡を同時に解析する方針とした。さらに、膵外分泌発生過程で見られた転写活性発揮のための ptf1a

counterpart の変化 が、成体膵障害後の再生過程においても再現されるか否かについても上記マウスを使って解析する方針とした。

まず、コントロールとして cerulein 投与前の Sox9-CreERT2;floxed ptfla;ROSA26r マウスに Tamoxifen を投与したところ、驚いた事に lineage ラベル腺房細胞がほぼ消滅することが明らかとなった。この事は Sox9 陽性膵管～腺房中心細胞から腺房細胞への分化そのものが停止したか、腺房細胞への分化後に生存が不可能となったかのいずれかを意味している。これまで、ptfla は成体腺房細胞において Amylase や Elastase などの外分泌酵素遺伝子の転写調節を行うことが知られていたが、成体外分泌細胞の維持そのものに関与する可能性は全く指摘されてこなかった。この事は、発生段階における ptfla の機能をそのまま反映している可能性がある。Ptf1a は膵臓と十二指腸/胆管の間の運命決定遺伝子であるが、膵内に限って考えた場合、外分泌細胞の分化に必須である (Ptf1a ノックアウトマウスでは外分泌組織は全く分化せず、少数の内分泌細胞と膵管細胞のみが形成される)。今回見られた現象は、膵炎後の再生機構以前の問題として、成体膵外分泌組織の維持機構そのものにおける ptfla の重要性を指摘している。胎生期 PTF1 三量体における ptfla counterpart が Notch dependent な RBP-J から Notch independent な RBP-L へと次第に移行してゆく事を考えあわせると、胎生中期から始まる腺房細胞分化機構が、そのまま RBP-L を counterpart とした成体での腺房細胞維持機構へと引き継がれている事が予想される。

今後の方針として Elastase-CreER を用いた同様の解析と比較する事によって、ptfla による成体外分泌組織維持機構が、膵管～腺房中心細胞からの腺房細胞への分化のステップか、腺房細胞の生存のステップか、そのどちらであるかを明らかにしたいと考えている。更には Sox9CreER, ElastaseCreER をもちいた Notch signaling 修飾 (例えば Hes1 不活化や Notch-IC 強制発現による Notch シグナル活性化) を行う事によって、ptfla を中心とする成体外分泌組織維持機構において Notch シグナリングがどういった位置づけで理解されるのか? その全容を明らかにする事が期待できる。その上で急性膵炎における再生現象における胎生遺伝子群の役割が解明されると期待される。

##### 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)

[雑誌論文] (計 15 件 : 全て査読あり)

① Masui T, Doi R, Kawaguchi Y, Uemoto S.

Delayed gastric emptying improved by straight stomach reconstruction with twisted anastomosis to the jejunum after pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (PPPD) in 118 consecutive patients at a single institution. Surg Today. 42(5),2012, pp.441-446, 10.1007/s00595-011-0097-1

- ② Masui T, Kubota T, Nakanishi Y, Aoki K, Sugimoto S, Takamura M, Takeda H, Hashimoto K, Tokuka A. The flow angle beneath the gastrojejunostomy in Roux-en-Y reconstruction after distal gastrectomy predicts delayed gastric emptying. Gastric Cancer. 2011. Epub, 10.1007/s10120-011-0107-4
- ③ Kanai M, Yoshimura K, Asada M, Imaizumi A, Suzuki C, Matsumoto S, Nishimura T, Mori Y, Masui T, Kawaguchi Y, Yanagihara K, Yazumi S, Chiba T, Guha S, Aggarwal BB. A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 68(1),2011, pp.157-64, 10.1007/s00280-010-1470-2
- ④ Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, Hosokawa S, Elbahrawy A, Soeda T, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi M, Takaori K, Doi R, Nishi E, Kakinoki R, Deng JM, Behringer RR, Nakamura T, Uemoto S. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. Nat Genet. 43(1),2011,pp.34-41, 10.1038/ng.722
- ⑤ Ito T, Doi R, Yoshizawa A, Sakikubo M, Nagai K, Kida A, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi Y, Manabe T, Uemoto S. The distribution of atypical epithelium in main-duct type intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 18(2), 2011, pp.241-246, 10.1007/s00534-010-0337-6
- ⑥ Nagai K, Doi R, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi Y, Yoshizawa A, Uemoto S. Noninvasive intraductal papillary mucinous neoplasm with para-aortic lymph node metastasis: report of a case. Surg Today. 41(1),2011,pp.147-52, 10.1007/s00595-009-4210-7
- ⑦ Zaima C, Kanai M, Ishikawa S, Kawaguchi Y, Masui T, Mori Y, Nishimura T, Matsumoto S, Yanagihara K, Chiba T, Mimori T. A case of progressive digital ischemia after early withdrawal of gemcitabine and S-1 in a patient with systemic sclerosis. Jpn J Clin Oncol. 41

- (6),2011, pp.803-806, 10.1093/jjco/hyr045
- ⑧ Masui T, Doi R, Ogawa K, Kami K, Machimoto T, Seo S, Kawaguchi Y, Egawa H, Matsugu Y, Uemoto S. Successful neoadjuvant Treatment with Radiochemotherapy and Systemic Chemotherapy for the Locally Advanced Pancreatic Head Cancer: Report of a Case. *Hepato-Gastroenterology*. 58 (110),2011, pp.1809-1813, 10.5754/hge08054
- ⑨ Masui T, Doi R, Kawaguchi Y, Iwanaga Y, Ito T, Koizumi M, Uemoto S. Adenoendocrine cell carcinoma of the extrahepatic bile duct: a case report and review of the literature. *Clinical Journal of Gastroenterology*. 4(3),2011, pp.174-178, 10.1007/s12328-011-0220-2
- ⑩ Masui T, Watanabe E, Onuma H, Tokuka A. A rare case of carcinosarcoma of the liver. *Rinsho Gekagakkai Zasshi*. 72 (7),2011, pp.195-199
- ⑪ Imai H, Doi R, Kanazawa H, Kamo N, Koizumi M, Masui T, Iwanaga Y, Kawaguchi Y, Takada Y, Isoda H, Uemoto S. Preoperative assessment of para-aortic lymph node metastasis in patients with pancreatic cancer. *Int J Clin Oncol*. 15 (3), 2010,pp.294-300,10.1007/s10147-010-0066-5
- ⑫ Masui T, Doi R, Ito T, Kami K, Ogawa K, Harada D, Uemoto S. Diagnostic value of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for pancreatic neuroendocrine tumors with reference to the World Health Organization classification. *Oncology Letters*.1(1),2010,pp.155-159,10.3892/ol\_0000029
- ⑬ Machimoto T, Doi R, Ogawa K, Masui T, Seo S, Uemoto S. Abdominal wall recurrence of Hilar bile duct cancer 12 years after a curative resection: report of a case. *SurgToday*.39(1),2009,pp.72-76,10.1007/s00595-008-3791-x
- ⑭ Nagai K, Doi R, Katagiri F, Ito T, Kida A, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi Y, Tomita K, Oishi S, Fujii N, Uemoto S. Prognostic value of metastin expression in human pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 28, 2009,pp.9, 10.1186/1756-9966-28-9
- ⑮ Nagai K, Doi R, Ito T, Kida A, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi Y, Ogawa K, Uemoto S. Single-institution validation of the international consensus guidelines for treatment of branch duct intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 16(3),2009, pp.353-358, 10.1007/s00534-009-0068-8

[学会発表] (計 11 件)

- ① 増井俊彦、久保田豊成、青木恵子、中西保貴、杉本真一、高村通生、武田啓志、橋本幸直、徳家敦夫、「# 16 転移のある膵癌術後 10 年後の SMA 周囲再発に対して再切除施行し得た 1 例」、第 42 回膵臓学会大会、2011 年 7 月 29 日、弘前市、青森県
- ② 増井俊彦、久保田豊成、青木恵子、中西保貴、杉本真一、高村通生、武田啓志、橋本幸直、徳家敦夫、「残胃の形態から見た幽門側胃切除後の Roux stasis syndrome の検討」、第 66 回消化器外科学会総会、2011 年 7 月 13 日、名古屋市、愛知県
- ③ 増井俊彦、渡邊栄一郎、中西保貴、久保田豊成、青木恵子、高村通生、杉本真一、武田啓志、徳家敦夫、「肝細胞癌派生の肝癌肉腫の 1 例」、第 23 回肝胆膵外科学会定期集会、2011 年 6 月 8 日、新宿、東京都
- ④ 増井俊彦、土井隆一郎、川口義弥、小泉将之、高折恭一、上本伸二、「郭清度から見た膵頭十二指腸切除後脂肪肝発生因子の検討」、第 111 回外科学会総会、2011 年 5 月 25 日 (紙上開催)
- ⑤ 増井俊彦、土井隆一郎、川口義弥、上和宏、小泉将之、長井和之、高折恭一、上本伸二、「膵癌術後補助化学療法としての S1 2 投 1 休投薬法の可能性」、第 65 回消化器外科学会総会、2010 年 7 月 13 日、下関市、山口県
- ⑥ 増井俊彦、土井隆一郎、川口義弥、小川晃平、上和宏、小泉将之、上本伸二、「術者の経験から見た不完全外瘻術による膵空腸吻合の成績」、第 22 回肝胆膵外科学会定期集会、2010 年 5 月 27 日、仙台市、宮城県
- ⑦ 増井俊彦、土井隆一郎、川口義弥、小川晃平、上和宏、小泉将之、上本伸二、「局所進行膵癌に対する術前 GEM/S1 併用療法の成績」、第 22 回肝胆膵外科学会定期集会、2010 年 5 月 27 日、仙台市、宮城県
- ⑧ 増井俊彦、土井隆一郎、川口義弥、小泉将之、長井和之、高折恭一、上本伸二、「幽門輪温存膵頭十二指腸切除術における胃排出遅延の試み」、第 110 回外科学会総会、2010 年 4 月 8 日、名古屋市、愛知県
- ⑨ Masui T, R.Do, K.Kami, K.Ogawa, Y.Kawaguchi, K.Fujimoto, M.Koizumi, K.Nagai and S.Uemoto. “IMPROVED DELAYED GASTRIC EMPTYING WITH STRAIGHT STOMACH RECONSTRUCTION AND TWISTED

ANSTOMOSIS TO JEJUNUM AFTER  
PYLORUS PRESERVING  
PANCREATICODUODENECTOMY  
(PPPD): 118 CONSECUTIVE CASES IN A  
SINGLE INSTITUTION”, APA and JPS  
40th Anniversary Meeting, Nov 2009,  
Hawaii, USA

- ⑩ Masui T, Ryuichiro Doi, Yasuhiro Takada, Yoshiya Kawaguchi, Masayuki Koizumi, Masayuki Nagai, Tatsuo Ito, Atsushi Kida, Shinji Uemoto. “Improvement of the dissection of the perineural tissue of superior mesenteric artery by detaching splenic vein from portal vein in the pancreatic head cancer.”, 19th World congress of the IASGO September 23-26, 2009 Beijing, China
- ⑪ T. Masui, R. Doi, Y. Kawaguchi, M. Koizumi, A. Kida, K. Nagai, T. Ito, S. Uemoto. “Gemcitabine and S-1 combined neoadjuvant chemotherapy for patients with locally advanced pancreatic cancer.”, ASCO-GI, Jan.2009, SanFrancisco, California, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増井 俊彦 (Masui Toshihiko)  
京都大学・医学研究科・非常勤講師  
研究者番号：20452352

### (2) 研究分担者

土井 隆一郎 (Doi Ryuichiro)  
京都大学・医学研究科・非常勤講師  
研究者番号：20301236

研究分担者(平成22年4月から)  
児玉 創太 (Kodama Sota)  
京都大学・医学研究科・非常勤講師  
研究者番号：10583875

研究分担者(平成23年5月まで)  
川口 義弥 (Kawaguchi Yoshiya)  
京都大学・iPS細胞研究所・教授  
研究者番号：60359792