

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 5 月 23 日現在

機関番号：14501  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591773  
 研究課題名（和文）糖尿病の再生医療を目指した成体膵組織幹細胞の分離・増殖に関する研究  
 研究課題名（英文）Isolation of adult pancreatic stem cells for regenerative medicine of diabetes mellitus  
 研究代表者  
 堀 裕一（HORI YUICHI）  
 神戸大学・保健学研究科・准教授  
 研究者番号：80248004

研究成果の概要（和文）：I型糖尿病では生命維持のためにインスリン注射が必要である。移植可能なインスリン産生細胞を用いた再生医療を目指して、本研究では、組織幹細胞を分離・培養することを目的としている。今回、汎幹細胞マーカー(CD133)ノックアウト/GFP ノックインマウスを作製した。CD133<sup>+/GFP</sup>マウスを用いて GFP の分布を検討すると、膵臓、肝臓、小腸では組織幹細胞の存在が示唆されている部位に GFP の発現を認めた。

研究成果の概要（英文）：Although pancreatic organ transplantation is only curable option in type I diabetes mellitus, there is an extreme shortage of engraftable donor tissue. Tissue-specific stem cells are uniquely suited for regenerative medicine of diabetes mellitus. To this end, we produced pan-stem cell marker (CD133) knockout/GFP knockin mice. In CD133<sup>+/GFP</sup> mice, GFP positive cells concentrated on the cells in specific region such as pancreas, liver and intestine, which is thought to be stem cell niche.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・膵臓外科学

キーワード：再生医療、糖尿病、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

I 型糖尿病では生命維持のためにインスリン注射が絶対的適応である。根治的治療としては膵臓移植があるが、慢性的なドナー不足は重要な課題である。我々はこれまで、糖尿病の再生医療を目指して、膵組織幹細胞の分

離・同定に成功している。

2. 研究の目的

効率良く、組織幹細胞を分離し、その特性を明らかにすることにより、in vitro でこれを増殖・分化させる培養系を確立する。

3. 研究の方法

汎幹細胞マーカー(CD133)ノックアウト/GFPノックインマウスを作成し、CD133<sup>+/GFP</sup>マウスからGFP陽性細胞を分離し、in vitroで増殖・分化させる培養系を確立する。

#### 4. 研究成果

このCD133<sup>+/GFP</sup>マウスを用いてGFPの分布を検討すると、膵臓ではterminal ductあるいはcentroacinar細胞、肝臓ではHering管、小腸では陰窩にGFPの局在を認めた。いずれも、組織幹細胞の存在が示唆されている部位であった。GFPを指標にしてcell sorterを用いてCD133陽性細胞を分離し、いくつかの成長因子の存在下で培養すると、未分化状態を保持したまま、増殖させることが可能となった。しかし、現在までのところ、インスリン産生細胞への分化を誘導するには至っていない。さらに、膵炎モデルで検討すると、CD133/GFP陽性の膵管様構造が再生することが明らかとなった。また、膵臓の未分化な細胞を示すSox9やPdx1が陽性であったことから、この再生膵管は未分化な細胞で構成されていることが判明した。

#### 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14件)

1. Ohtsubo I, Ajiki T, Hori Y, Murakami S, Shimizu K, Itoh T, Shimizu M, Fukumoto T, Ku Y. Distinct expression of CD133 between intraductal papillary neoplasms of the bile duct and bile duct adenocarcinomas. *Hepatol Res* 査読有 42: 574-582 (2012).
2. Komatsu S, Fukumoto T, Demizu Y, Miyawaki D, Terashima K, Sasaki R, Hori Y, Hishikawa Y, Ku Y, Murakami M. Clinical results and risk factors of proton and carbon ion therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 査読有 117: 4890-4904 (2011).
3. Komatsu S, Fukumoto T, Demizu Y, Miyawaki D, Terashima K, Sasaki R, Yamada I, Hori Y, Hishikawa Y, Ku Y, Murakami M. The effectiveness of particle radiotherapy for hepatocellular carcinoma accompanied with inferior vena cava tumor thrombus. *J Gastroenterol* 査読有 46: 913-920 (2011).
4. Hashimoto O, Shimizu K, Semba S, Chiba S, Ku Y, Yokozaki H, Hori Y. Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1a dependent manner in pancreatic cancer cells. *Pathobiology* 査読有 78: 181-192 (2011).
5. Takahashi M, Fukumoto T, Kido M, Tsuchida S, Takebe A, Kuramitsu K, Komatsu S, Hori Y, Ku Y. Morphometric analysis of conformational changes in hepatic venous system after right lobe living donor liver transplantation. *Hepatol Res* 査読有 41: 318-327 (2011).
6. Komatsu S, Murakami M, Fukumoto T, Hori Y, Hishikawa Y, Ku Y. Risk factors for survival and local recurrence after particle radiotherapy for single small hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 査読有 98: 558-564 (2011).
7. Terai S, Tsujimura T, Li S, Hori Y, Toyama H, Shinzeki M, Matsumoto I, Kuroda Y, Ku Y. Effect of oxygenated

perfluorocarbon on isolated islets during transportation. *J Surg Res* 査読有 162: 284-289 (2010).

8. Shinzeki M, Hori Y, Fujino Y, Matsumoto I, Toyama H, Tsujimura T, Sakai T, Ajiki T, Kuroda Y, Ku Y. Mucinous cystic neoplasm of the pancreas presenting with hemosuccus pancreaticus. *Surg Today* 査読有 40: 470-473 (2010).

9. Komatsu S, Hori Y, Fukumoto T, Murakami M, Hishikawa Y, Ku Y. Surgical spacer placement and proton radiotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 査読有 16: 1800-1803 (2010).

10. Kinoshita H, Hori Y, Fukumoto T, Ohigashi T, Shinohara K, Hayashi Y, Ku Y. Novel assessment of hepatic iron distribution by synchrotron radiation X-ray fluorescence microscopy. *Med Mol Morphol* 査読有 43: 19-25 (2010).

11. Fukumoto T, Komatsu S, Hori Y, Murakami M, Hishikawa Y, Ku Y. Particle beam radiotherapy with a surgical spacer placement for advanced abdominal leiomyosarcoma results in a significant clinical benefit. *J Surg Oncol*. 査読有 101: 97-99 (2010).

12. Hori Y. Insulin-producing cells derived from stem/progenitor cells: therapeutic implications for diabetes mellitus. *Med Mol Morphol* 査読有 42: 195-200 (2009).

13. Shimizu K, Itoh T, Shimizu M, Ku Y, Hori Y. CD133 expression pattern distinguishes intraductal papillary mucinous neoplasms from ductal adenocarcinomas of the pancreas. *Pancreas* 査読有 e207-e214 (2009).

14. Yamamoto M, Kamigaki T, Yamashita K, Hori Y, Hasegawa H, Kuroda D, Moriyama H, Nagata M, Ku Y, Kuroda Y. Enhancement of anti-tumor immunity by high levels of Th1 and Th17 with a combination of dendritic cell fusion hybrids and regulatory T cell depletion in pancreatic cancer. *Oncol Rep*. 査読有 22: 337-343 (2009).

[学会発表] (計 12 件)

1. Hori Y, Chiba S, Shimizu K. Direct interaction between human pancreatic cancer stem cells and stromal cells remodels extracellular matrix formation for cancer stem cell niche. 103<sup>rd</sup> American Association for Cancer Research, 2012 年 4 月 2 日, Chicago (USA)

2. Hori Y, Shimizu K, Ku Y, Ajiki T, Fukumoto T, Matsumoto I, Kusunoki N, Kido M. CD133 expression distinguished intraductal papillary mucinous neoplasms from ductal adenocarcinomas of the pancreas. The 1<sup>st</sup> JSGE International Topic Conference, 2010 年 9 月 25 日, 鎌倉プリンスホテル (神奈川県)

3. Hori Y, Ajiki T, Matsumoto I, Fukumoto T, Kusunoki N, Ku Y. Hypoxia induces tumor aggressiveness by an acquired stem-like phenotype in pancreatic cancer through

HIF1 $\alpha$  signaling. Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society, 2010年7月11日, 福岡国際会議場 (福岡県)

4. Hori Y, Hashimoto O, Ku Y. Hypoxia induces tumor aggressive phenotype by acquired stemness in pancreatic cancer. 40<sup>th</sup> American Pancreatic Association, 2009年11月4日, Honolulu (USA)

5. Hori Y. Isolation of putative pancreatic progenitor cells by sorting for CD133 and PDGFR-beta. 40<sup>th</sup> American Pancreatic Association, 2009年11月4日, Honolulu (USA)

6. Hori Y. Enrichment of putative pancreatic progenitor cells by sorting for prominin1 (CD133) and PDGFR-beta. The International Pancreatic Research Forum, 2009年4月1日, 京王プラザホテル (東京都)

7. 堀裕一, 癌幹細胞の関与からみた膵管癌と膵管内粘液性腫瘍の分子病理学的鑑別, 第69回日本癌学会総会, 2010年9月24日, 大阪国際会議場 (大阪府)

8. 堀裕一, 低酸素環境下における癌細胞の悪性度獲得機構の解明, 第65回日本消化器外科学会総会, 2010年7月16日, 海峡メッセ下関 (山口県)

9. 堀裕一, 膵癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発, 第97回日本消化器病学会, 2010年5月13日, 京王プラザホテル (東京都)

10. 堀裕一, 膵癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発, 第97回日本消化器外科学会, 2010年7月13日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

11. 堀裕一, 癌幹細胞治療を目的とした初代膵癌幹細胞株の樹立, 第42回日本膵臓学会, 2010年7月29日, 青森ホテルニューキャッスル (青森県)

12. 堀裕一, 膵癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発, 第43回日本臨床分子形態学会, 2011年9月9日, 大阪医科大学 (大阪府)

[図書] (計2件)

1. 木下秘我、堀裕一、具英成、日本臨床、肝・胆道系症候群、2010、175-177

2. 堀裕一、アークメディア、肝胆膵、2009、587-593

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 裕一 (HORI YUICHI)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：80248004

(2) 研究分担者

味木 徹夫 (AJIKI TETSUO)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：80379403

具 英成 (KU YONSON)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40195615