

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32639

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22500385

研究課題名(和文) ツメガエル胚の未分化細胞を用いた臓器レベルの膵臓形成と生体移植による機能解析

研究課題名(英文) In vitro induction and in vivo transplantation of the pancreatic organ using the undifferentiated cells of Xenopus embryo.

研究代表者

有泉 高史 (ARIZUMI, Takashi)

玉川大学・農学部・教授

研究者番号：30286166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：ツメガエル胚の未分化細胞塊(アニマルキャップ)を個々の細胞に解離し、アクチビンとレチノイン酸で処理してできた再集合体は膵臓に分化する。これを他の胚に移植して成体まで育てると、正常な膵臓と同じ構造をもつ第二の膵臓(異所性膵臓)が作られた。異所性膵臓の機能を摘出実験や糖負荷試験を通して解析した結果、異所性膵臓は形態だけでなく、血糖調節能力においても正常な膵臓と同等であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We attempted to develop a reliable experimental system for in vitro pancreas induction based on the dissociation/reaggregation protocol previously reported. Additional treatment of the reaggregates with retinoic acid after the activin induction dramatically changed their gene expression and histodifferentiation patterns from heart to pancreas. Next, we tried to prove that the in vitro-induced pancreatic primordium can develop a structural and functional pancreas by the in vivo ectopic transplantation. The ectopic pancreas showed the same morphological features as to the normal functioning pancreas composed of the exocrine and endocrine portions. Moreover, the fact that the ectopic pancreas actually regulates blood glucose level was proved by the extirpation experiment and the glucose tolerance test.

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：発生工学 器官創製 膵臓 未分化細胞 生体移植

1. 研究開始当初の背景

ツメガエル胚のアニマルキャップは多分化能をもち、試験管内でさまざまな細胞や組織に分化することができる。しかしながら従来の研究では、膵臓や心臓などの「臓器」を特異的かつ高率で形づくることは困難であった。

アニマルキャップにはおよそ 1,000 個の細胞が含まれ、それらが数層のシート状構造を作っている。このような構造を一時的に壊すことが臓器形成の鍵となると仮定し、アニマルキャップを個々の細胞に解離してからアクチピンで処理し、再び集合させた。その結果、100%の確率で再集合体を心臓へ分化させることに成功した [Ariizumi *et al.* 2003、kinoshita *et al.* 2010]。

一方、再集合体をさらにレチノイン酸で処理すると、心臓への分化が完全に抑えられ、代わりに膵臓へ分化することが本研究の開始当初に明らかになった。再集合体から作られた膵臓にはインスリン遺伝子などの発現が見られ、培養を続けると腺房に似た構造も認められた。このような試験管内で作られた膵臓を生体に移植した場合、外分泌部と内分泌部からなる三次元的な構造をもち、アミラーゼなどの消化酵素を合成・分泌し、さらにインスリンを分泌して血糖調節を行う「臓器レベル」の膵臓を形づくることが確認できれば、膵臓発生の分子メカニズムの解明と再生医療への応用に向けた本研究の重要性が高まると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物の膵臓発生のモデル動物としてアフリカツメガエルを実験材料に用い、未分化細胞から臓器レベルの膵臓形成を試みる。最初に、未分化細胞塊であるアニマルキャップが膵臓に分化する過程で、正常な膵臓発生と同様の遺伝子発現を行うことを確認する。続いて、アニマルキャップから作

られた膵臓を他の胚に移植して臓器レベルの膵臓を形成させる。この実験では移植によって生じた第二の膵臓(異所性膵臓)について、三次元的な構造を解析するとともに血糖調節能力を中心にその機能を詳細に解析する。これらの実験により、未分化細胞から臓器レベルの膵臓を形づくる条件を明らかにして再生医療への応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

本研究では、試験管内で分化誘導した膵臓の遺伝子発現を正常な膵臓発生と比較するとともに、これらの膵臓を単独培養したときの構造と機能を解析した(1)。続いて、膵臓の生体移植実験を行い、移植場所や移植時期などを検討して異所的な膵臓形成との関係を調べた(2)。移植を行った個体が成体まで育った段階で、膵臓の最も重要な機能の一つである血糖調節に焦点を当てて異所性膵臓の構造と機能を解析した(3)。

(1) 膵臓の分化誘導〔遺伝子発現および構造と機能の解析〕

アニマルキャップを解離/再集合処理およびアクチピン/レチノイン酸処理して作られた再集合体は膵臓に分化する。この試験管内での膵臓発生が、分子レベルで正常な膵臓発生と同様に進行することを両者の遺伝子発現を比較することによって明らかにする。解析する遺伝子は、膵臓発生の初期の段階で発現する *Pdx1* や *Ptf1a*、分化した膵臓に発現する *carboxypeptidase A*、アミラーゼ、インスリン、グルカゴンなどである。これらの遺伝子の発現時期や発現場所を RT-PCR 法や whole-mount *in situ* hybridization 法によって解析する。

一方、アニマルキャップから作られた膵臓がそれ自体どの程度まで分化するかを知るため、試験管内で単独培養を行う。培養した膵臓は組織学的レベル、電子顕微鏡レベルで構

造を観察するとともに、各種の抗体を用いて免疫組織化学的に組織分化を解析する。

(2) 生体移植実験〔移植方法の検討〕

試験管内で分化誘導した膵臓を他の胚に移植して臓器レベルの膵臓形成を試みる。ここでは、宿主に用いる胚の発生段階、膵臓を移植する場所、移植する膵臓の大きさ（細胞数）などを検討して、移植した膵臓が確実に臓器レベルの膵臓を形成する条件を決定する。その際、移植した膵臓を宿主胚の組織と区別するため、蛍光色素を注入した胚または GFP 標識した胚のアニマルキャップから膵臓を作製してドナーに用いる。移植を受けた胚は幼生期の各段階で解剖し、異所的に形成された膵臓を組織学的に観察するとともに、アミラーゼ、インスリン、グルカゴンなどに対する抗体を用いて免疫組織化学的にも膵臓分化を確認する。

(3) 生体移植実験〔成体における異所性膵臓の構造と機能の解析〕

ツメガエルの場合、膵臓を完全に摘出して高血糖になるが死亡することはない。そこで本研究では、膵臓を移植した胚がカエルまで成長した段階で膵臓の摘出実験を行い、異所性膵臓をもつ血糖調節能力を明らかにする。具体的には、a) 正常なカエルからの膵臓摘出、b) 異所性膵臓をもつカエルからの宿主膵臓のみの摘出、c) 異所性膵臓をもつカエルからの宿主膵臓と異所性膵臓の全摘出、などを行って摘出後の血糖値変化を記録する。例えば c) の実験で、宿主の膵臓を摘出して高血糖値が上昇せず、異所性膵臓を摘出した時点で高血糖となれば異所性膵臓が血糖調節に働いていたことが確認できる。このほかにも糖負荷試験や ELISA 法による血中インスリン濃度測定によって異所性膵臓の血糖調節能を詳細に解析する。また異所性膵臓の構造については、腺房構造、ランゲルハンス島（細胞・細胞）膵管、血管などの存在と位置関係を正常

な膵臓と比較し、三次元的な臓器レベルの膵臓を形成していることを確認する。

4. 研究成果

(1) 膵臓の分化誘導〔遺伝子発現および構造と機能の解析〕

試験管内での膵臓形成が正常な膵臓形成と同じように進行することを確認するため、膵臓分化の指標となる各種遺伝子の発現パターンを解析した。その結果、試験管内で分化誘導した膵臓においても、膵臓発生の初期段階で発現する遺伝子（*Pdx1* や *Ptf1a*）、膵臓分化を示す遺伝子（*carboxypeptidaseA*、アミラーゼ、インスリン、グルカゴンなど）が正常な膵臓と同様に発現することが確認された。

また、試験管内で作られた膵臓の微細構造を電子顕微鏡で観察するとともに、各種抗体（抗アミラーゼ抗体、抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体）で免疫組織化学的に解析した結果、腺房構造を示す外分泌部と数種類の細胞からなる内分泌部の組織分化が確認された。

(2) 生体移植実験〔移植方法の検討〕

試験管内で分化誘導した膵臓を他の胚に移植する方法を検討した。胚の発生段階や移植場所などを検討した結果、初期神経胚（発生段階第 20 期）の腹部に移植した場合に、宿主の膵臓と同等な形態をもつ第二の膵臓が形成されることが明らかになった。移植実験では、移植片を蛍光色素で標識したアニマルキャップから作製することによって宿主胚の組織と区別した。移植を受けた胚を変態期までの各発生段階で解剖した結果、腹部に作られた第二の膵臓は宿主の膵臓と同様な組織分化を示し、各種抗体（抗アミラーゼ抗体、抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体）を用いた免疫組織化学的解析ではいずれの抗体に対しても陽性反応を示した。

(3) 生体移植実験〔成体における異所性膵臓の構造と機能の解析〕

膵臓の生体移植を受けた個体が成体（カエル）まで成長した段階で異所性膵臓を摘出し、その形態的な特徴を組織学的および免疫組織化学的に解析した。ヘマトキシリン・エオシン染色した異所性膵臓の組織切片では、正常な膵臓と同等の組織構造をもつ腺房やランゲルハンス島が観察された。電子顕微鏡による微細構造の観察では、ランゲルハンス島に細胞や細胞の存在が確認された。抗アマラーゼ抗体、抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体など、各種の抗体を用いた免疫組織化学的観察においても、各抗体に対して明らかに陽性を示す結果が得られた。

一方、成体の体内に存在する異所性膵臓の機能に関して、血糖調節能力を中心に解析した。最初に、正常なカエルから膵臓を摘出して、高血糖状態のカエルを得た。次に、異所性膵臓をもつカエルから宿主の膵臓のみを摘出して、血糖値の変化を経時的に記録した。その結果、後者のカエルは高血糖状態にならず、血糖値をほぼ正常値に保っていることが明らかになった。これは、体内に残された異所性膵臓が正常な膵臓と同等の血糖調節能力をもつことを示している。さらに、糖負荷試験や血中インスリン濃度測定を行った結果、異所性膵臓が実際にインスリンを分泌して血糖調節を行っていることが確認できた。

以上の結果から、試験管内で未分化細胞から分化誘導され、生体移植を経て作られた異所性膵臓は、組織学的・免疫組織化学的に正常な膵臓と同等であり、血糖調節においても正常膵臓と同様に機能する「臓器レベル」の膵臓であることが証明された。

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8件)

有泉高史. アクチビンと臓器形成. 東京都生物教育研究会 1: 112-116. 2013. 査読無.

Nejigane S, Takahashi S, Haramoto Y, Michiue T, Asashima M. Hippo signaling components, Mst1 and Mst2, act as a switch between self-renewal and differentiation in *Xenopus* hematopoietic and endothelial progenitors. *Int J Dev Biol.* 57: 407-414. doi: 10.1387/ijdb.130010st. 2013. 査読有.

Morita M, Yamashita S, Matsukawa S, Haramoto Y, Takahashi S, Asashima M, Michiue T. Xnr3 affects brain patterning via cell migration in the neural-epidermal tissue boundary during early *Xenopus* embryogenesis. *Int J Dev Biol.* 57: 779-786. doi: 10.1387/ijdb.130161tm. 2013. 査読有.

Takano K, Obata S, Komazaki S, Masumoto M, Oinuma T, Ito Y, Ariizumi T, Nakamura H, Asashima M. Development of Ca²⁺(+) signaling mechanisms and cell motility in presumptive ectodermal cells during amphibian gastrulation. *Dev Growth Differ.* 53: 37-47. doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01220.x. 2011. 査読有.

Nejigane S, Takahashi S, Haramoto Y, Michiue T, Asashima M. The transcriptional coactivators Yap and TAZ are expressed during early *Xenopus* development. *Int J Dev Biol.* 55: 121-126. doi: 10.1387/ijdb.103130sn. 2011. 査読有.

Kinoshita M, Ariizumi T, Yuasa S, Miyoshi S, Komazaki S, Fukuda K, Asashima M. Creating frog heart as an

organ: *in vitro*-induced heart functions as a circulatory organ *in vivo*. Int J Dev Biol. 54: 851-856. doi: 10.1387/ijdb.093036mk. 2010. 査読有.

Yamagishi M, Ito Y, Ariizumi T, Komazaki S, Danno H, Michiue T, Asashima M. Claudin5 genes encoding tight junction proteins are required for *Xenopus* heart formation. Dev Growth Differ. 52: 665-75. doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01204.x. 2010. 査読有.

Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. PLoS One. 5: e14099. doi: 10.1371/journal.pone.0014099. 2010. 査読有.

[学会発表](計5件)

三浦颯人, 田川日奈子, 有泉高史. 変態促進させたアホロートルの四肢再生. 日本動物学会第84回大会. 2013/9/26. 岡山.

有泉高史. アクチビンと臓器形成. 日本生物教育会第68回大会. 2013/8/8. 東京.

永山誓史, 有泉高史, 田村宏治, 横山 仁. Different cellular contribution of somite-derived tissues to limb regeneration in larval and adult *Xenopus*. 日本発生生物学会第46回大会 (APDBN 共催). 2013/5/31. 島根.

永山誓史, 有泉高史, 横山 仁, 田村宏治. アフリカツメガエルの四肢再生にお

ける体節由来組織の寄与について. 日本動物学会第83回大会 2012/9/15 大阪.

有泉高史, セン徳川, 高橋秀治, 浅島 誠. ツメガエル胚のアニマルキャップから分化誘導した膵臓の血糖調節能. 日本動物学会第82回大会. 2011/9/21. 旭川.

6. 研究組織

(1)研究代表者

有泉 高史 (ARIIZUMI Takashi)
玉川大学・農学部・教授
研究者番号: 30286166

(2)研究分担者

高橋秀治 (TAKAHASHI Shuji)
広島大学・理学研究科・特任准教授
研究者番号: 90447318