

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591023

研究課題名(和文)膵内外分泌幹細胞の同定と膵組織再生における役割

研究課題名(英文)Identification of endocrine and exocrine stem/progenitor cells in the pancreas.

研究代表者

洪 繁 (Ko, Shigeru)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90402578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、ヒト臓器の幹細胞マーカーとして良く知られているLGR5に着目し、膵組織再生との関わりについて検討を行なった。ヒト及びマウスの膵臓において、LGR5は他の幹細胞マーカーであるBMI1などと同じく、内分泌及び外分泌細胞のごく一部に発現していることが明らかとなった。またこれらの細胞では、外分泌細胞である腺房細胞マーカーアミラーゼや、内分泌細胞分化マーカーであるインスリン、グルカゴンなどのホルモンにも共陽性の細胞であり、ヒト及びマウスなどの膵においては、幹/前駆細胞として特殊な細胞が存在するのではなく、分化細胞の一部が未分化状態になることで組織幹細胞として働いている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have examined the expression and localization pattern of stem/progenitor cell marker, LGR5, in human and mouse pancreas. In the human and mouse pancreas, LGR5 is localized in a very limited subpopulation of cells in the pancreas together with other stem/progenitor cell marker such as BMI1. These stem/progenitor cell marker positive cells are also positive for exocrine cell marker amylase or endocrine cell marker insulin or glucagon. These findings suggest that in the human or mouse pancreas, there is no isolated stem/progenitor cells in the organ but the subpopulation of mature differentiated cells are the cells that are responsible for tissue repair/regeneration.

研究分野：生理学

キーワード：膵組織再生 組織幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)慢性膵炎は膵の進行性炎症性疾患であり、膵内・外分泌機能不全を特徴とする。慢性膵炎で認められる内・外分泌機能不全は非可逆的であり一旦障害されると回復しないと考えられている。そのため内・外分泌機能不全に対してインスリン療法や消化酵素補充療法が終生必要となる。

(2)1型糖尿病は、慢性膵炎に伴う膵性糖尿病とは違い膵島の細胞のみが特異的に障害される。1型糖尿病では進行した慢性膵炎に伴う膵性糖尿病と同じく、糖尿病に対するインスリン療法が終生必須である。この1型糖尿病に対しては以前から膵島移植や細胞移植などの細胞療法によってインスリン療法からの離脱を目指す治療が試みられているが、治療を要する患者数に比べてドナー膵が欠乏していることで、細胞移植療法は未だ少数例で行われているに過ぎない。

(3)近年、胚性幹細胞(ES細胞)や誘導多能性幹細胞(iPS細胞)に関する研究の進歩により、ES細胞やiPS細胞を分化させ細胞を*in vitro*で作成することも現実となりつつある。しかし、ES細胞を使用する再生医療には胎児の組織を使用する倫理的問題と、他人の細胞を移植することによる移植片宿主反応を起こす問題がある。iPS細胞を使用する再生医療には、iPS化に必要な癌遺伝子による移植細胞の癌化の問題があり、細胞移植による再生医療実現には乗り越えるべき課題が山積している。したがって、臨床で再生医療を実現するためには、各臓器での組織性幹細胞の同定とその治療への応用こそが、再生医療実現への最短距離であり、喫緊の課題であると考えられてきている。

(4)自己免疫性膵炎(AIP)は、その発症に自己免疫機序の関与が疑われる特殊な膵炎である。膵の腫大や膵管狭細像、IgG4高値を特徴とするが、副腎皮質ホルモン(プレドニゾロン、PSL)治療により画像的、血清学的な改善が得られる。我々はAIP患者の膵外分泌機能と膵組織像の変化を、PSL治療前後に解析した。その結果、治療前の膵は機能的・組織学的に高度に障害されていたが、PSL治療後には膵は機能が回復し、組織が再生することを発見した(Ko et al, *Gastroenterology* 2010)。つまりこれまで中枢神経系などと同じく成人では再生しないと考えられていた膵でも抗炎症療法により組織再生がおこることが明らかになった。我々は更にPSL治療によるAIPの膵再生に幹細胞マーカー蛋白の一つであるCD133(prominin-1)陽性導管細胞が関わっていることも報告した。

(5)これまで膵ではNGN-3, Sox-9, CA11, ALDH1, CD133をはじめ多くの幹細胞マーカー蛋白が同定されてきたが、内分泌、外分泌細胞とも未だ膵の再生分子機構の詳細は明らかではなく、組織幹細胞の存在に関して統一の見解は得られていない。最近の消化管幹/前駆細胞研究の進歩により、CD133の上位に

位置する幹細胞マーカーとして Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5(LGR5)が、同定された。陰窩底部の+4 position に位置するLGR5陽性消化管幹/前駆細胞は、LacZを用いた分化系統追跡実験により、全ての小腸及び大腸上皮細胞に分化できることから、消化管幹細胞と考えられている(Barker N et al, *Nature* 2007)。LGR5は腸管以外では皮膚幹細胞に発現しており、同様の分化系統追跡実験の結果皮膚を構成する全ての細胞に分化できることが証明された(Snippert HJ et al, 2010 *Science*)。

(6)我々はAIP患者でPSL治療後に膵が再生することを発見したことから、成人の膵でも組織幹細胞が存在し臓器の再生に関わっている可能性を明らかにした。そこでヒト及びマウスの腸管幹細胞マーカーであるLGR5遺伝子に着目しヒト成人膵にもLGR5陽性幹細胞が存在するのではないかと仮説を立てて研究を行った(平成19年~22年基盤研究C)。その結果、ヒト成人膵でも導管細胞、腺房細胞、膵島細胞などの一部に極めて少数のLGR5陽性細胞を発見した(図1)。これらの細胞では消化管などで既に幹・前駆細胞マーカーとして確立しているポリコム遺伝子群の一つであるBMI1にも陽性であった。即ち腸管や皮膚などの他の臓器と同じく、ヒトの膵臓でもLGR5が未発見の幹/前駆細胞を同定している可能性が非常に高いと考えられた

2. 研究の目的

本研究では、以上の発見を元に膵の組織障害後の臓器再生におけるLGR陽性内・外分泌組織幹・前駆細胞の役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)膵炎および糖尿病モデルマウスにおける組織幹・前駆細胞の動態解析

セルレイン膵炎モデル

マウスの腹腔にセルレインを投与し膵炎マウスを作製する。投与量及び期間の調節により、急性膵炎モデルを作成し、膵再生過程の変化を解析する。マウス膵でもLGR5や、BMI1陽性細胞を認めることは確認済みである。LGR5は細胞膜蛋白であり、抗Lgr5抗体を用いた蛍光免疫染色が可能である。膵外分泌細胞のうち腺房細胞は抗amylase抗体、導管細胞は抗アクアポリン1(Aqp1)抗体および抗CFTR抗体を用いることで、幹細胞マーカー発現細胞との区別は容易である。

(2)マウス成体におけるLgr5発現細胞の局在解析

セルレイン膵炎、STZ糖尿病モデルを用いた膵内・外分泌細胞再生機構の解析

(3)幹細胞マーカー(LGR5)陽性膵癌細胞の癌発育・転移における役割解析

ヒト膵癌手術標本におけるLGR5発現量と

患者の生命予後の解析

4. 研究成果

(1)ヒト及びマウス膵臓における、LGR5 の局在を検討したところ、LGR5 や BMI1 などの幹細胞マーカー蛋白が、哺乳類の膵臓の極一部の細胞に発現していることが明らかとなった。これらの細胞は、膵内分泌細胞、及び膵外分泌細胞に両方に存在していることが明らかとなった。

(2)これらの細胞では膵臓の外分泌細胞、腺房細胞のマーカーであるアミラーゼや、内分泌細胞のマーカーであるインスリンやグルカゴンと共局在していることから、ヒトを含む哺乳類の膵臓には、分化細胞の一部に未分化マーカーを発現している細胞が存在することから、これらの細胞では膵臓の組織幹細胞である可能性が考えられた。

(3)ヒト、及びマウス膵炎組織においては、これらの幹細胞マーカー陽性細胞の数が著明に増加していることから、炎症による障害により分化細胞が脱分化し、前駆細胞として働いている可能性も考えられた。

(4)ヒトの膵がん組織において、一部の細胞の細胞質内に LGR5 に対する免疫活性が存在することが明らかとなった。

(5)今後これらの知見を元に、ヒトの膵疾患患者における膵組織再生を目指した治療法の開発の手がかりとなると期待される。

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 19 件)

1. 石黒 洋, 洪 繁
【自己免疫性膵炎 20 年の軌跡】 AIP の治療と予後
自己免疫性膵炎に対するステロイド治療の意義 膵組織再生と膵外分泌機能回復、肝・胆・膵 (0389-4991)70 巻 2 号 Page295-300(2015.02) 査読無し
2. 山水 康平, 中武 悠樹, 洪 繁, 洪 実
【再生医療 2015 幹細胞と疾患 iPS 細胞の研究最前線】
(第 2 章)分化誘導と分化転換
転写因子を用いた多能性幹細胞から任意細胞への分化誘導法の開発
実験医学 (0288-5514)33 巻 2 号 Page239-246(2015.02) 査読無し
3. Kato Y, Miyauchi T, Abe Y, Kojić D, Tanaka M, Chikazawa N, Nakatake Y, Ko SB, Kobayashi D, Hazama A, Fujiwara S, Uchida T, Yasui M. Unprecedented cell-selection using ultra-quick freezing combined with aquaporin expression. PLoS One. 2014 Feb 18;9(2):e87644.doi: 10.1371/journal.pone.0087644. 査読有
4. 石黒 洋, 山本 明子, 中莖 みゆき, 藤

木 理代, 近藤 志保, 洪 繁, 柳元 孝介, 眞田 幸弘, 成瀬 達

【膵炎大全～もう膵炎なんて怖くない～】 コラム 嚢胞性線維症に伴う膵障害、胆と膵 (0388-9408)35 巻臨増特大 Page1235-1238(2014.10) 査読無し

5. 秋山 智彦, 洪 繁, 洪 実
【生殖細胞-全能性を獲得し、世代を紡ぐサイクル】 着床前期胚、生殖細胞、幹細胞にかかわる ZSCAN4
実験医学 (0288-5514)32 巻 6 号 Page870-876(2014.04) 査読無し
6. Mizuno N, Yatabe Y, Hara K, Hijioka S, Imaoka H, Shimizu Y, Ko SB, Yamao K. Cytoplasmic expression of LGR5 in pancreatic adenocarcinoma. Front Physiol. 2013 Sep 26;4:269. doi: 10.3389/fphys.2013.00269. 査読有
7. Ko SB, Azuma S, Yokoyama Y, Yamamoto A, Kyokane K, Niida S, Ishiguro H, Ko MS. Inflammation increases cells expressing ZSCAN4 and progenitor-cell markers in the adult pancreas. Am J Physiol. 2013 Jun;304(12):G1103-16. 査読有
8. 岡崎 和一(関西医科大学 消化器肝臓内科), 川 茂幸, 神澤 輝実, 伊藤 鉄英, 乾 和郎, 入江 裕之, 西野 隆義, 能登原 憲司, 久保 恵嗣, 大原 弘隆, 入澤 篤志, 藤永 康成, 長谷部 修, 西森 功, 田中 滋城, 下瀬川 徹, 田中 雅夫, 白鳥 敬子, 須田 耕一, 西山 利正, 内田 一茂, 菅野 敦, 窪田 賢輔, 洪 繁, 阪上 順一, 清水 京子, 杉山 政則, 多田 稔, 中沢 貴宏, 西野 博一, 浜野 英明, 廣岡 芳樹, 平野 賢二, 正宗 淳, 増田 充弘, 水野 伸匡, 山口 幸二, 吉田 仁, 日本膵臓学会・厚生労働省難治性膵疾患に関する調査研究班
「自己免疫性膵炎診療ガイドライン 2013」膵臓 (0913-0071)28 巻 6 号 Page717-783(2013.12) 査読有
9. 洪 繁, 洪 実
「膵臓の組織修復と組織幹細胞」
実験医学増刊「臓器円環による恒常性の維持・変容・破綻」, 実験医学 2013.3、羊土社、査読無し
10. Ko SB, Azuma S, Yoshikawa T, Yamamoto A, Kyokane K, Ko MS and Ishiguro H. Molecular mechanisms of pancreatic stone formation in chronic pancreatitis. Front Physiol. 2012;3:415.doi: 10.1152/ajpgi.00299.2012. 査読有
11. Song Y, Yamamoto A, Stewart M, Ko SB, Stewart A, Soleimani M, Kondo T, Jin CX, and Ishiguro H. Deletion of Slc26a6 alters the stoichiometry of apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in mouse pancreatic duct. Am J Physiol.

- 2012 ;303(8):C815-24. doi: 10.1152/ajpcell.00151.2012. 査読有
12. Nakakuki M, Fujiki K, Yamamoto A, Ko SB, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, Kondo S, Maruyama S, Yanagimoto K, Naruse S, Ishiguro H. Detection of large heterozygous deletion and a splicing defect in the CFTR transcripts from nasal swab of a Japanese case of cystic fibrosis. *J Hum Genet.* 2012 ;57(7):427-33 査読有
 13. Ohara H, Okazaki K, Tsubouchi H, Inui K, Kawa S, Kamisawa T, Tazuma S, Uchida S, Hirano K, Yoshida H, Nishino T, Ko SB, Mizuno N, Hamano H, Kanno A, Notohara K, Hasebe O, Nakazawa T, Nakanuma Y, Takikawa H. Clinical diagnostic criteria of IgG4-related sclerosing cholangitis 2012. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences,* 2012 ;19(5):536-42. doi: 10.1007/s00534-012-0521-y. 査読有
 14. Yanagisawa K, Tomida S, Matsuo K, Arima C, Kusumegi M, Yokoyama Y, Ko SB, Mizuno N, Kawahara T, Kuroyanagi Y, Takeuchi T, Goto H, Yamao K, Nagino M, Tajima K and Takahashi T. Seven-Signal Proteomic Signature for Detection of Operable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Discrimination from Autoimmune Pancreatitis. *International Journal of Proteomics.* 2012, 2012:510397 doi: 10.1155/2012/510397. 査読有
 15. Yi L, Naruse S, Furuya S, Yamamoto A, Nakakuki M, Nagao S, Yoshiharu D, Ko SB, Wei M, Kondo T, Ishiguro H. Structure and function of the pancreas in the polycystic kidney rat. *Pancreas,* 2012 ;41(8):1292-8 doi: 10.1097/MPA.0b013e31824c12f9. 査読有
 16. Mayumi T, Inui K, Maetani I, Yokoe M, Sakamoto T, Yoshida M, Ko SB, Hirata K, Takada T, The Urinary Trypsinogen-2 Dipstick for Acute Pancreatitis Study Group of The Japanese Society of Abdominal Emergency Medicine (UtrAP Study). Validity of the Urinary Trypsinogen-2 Test in the Diagnosis of Acute Pancreatitis, *Pancreas* 2012;41:869-875. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182480ab7. 査読有
 17. Ito S, Ko SB, Morioka M, Imaizumi K, Kondo K, Mizuno N, and Hasegawa Y. Three cases of bronchial asthma preceding autoimmune pancreatitis. *Allergology International.*2012; 61(1): 171-4. doi: 10.2332/allergoint.11-CR-0352. 査読有
 18. 洪 繁、吉川俊之、山本明子、東祥子、松浦俊博、京兼和宏、山田理、石黒洋 「膵導管細胞機能からみた膵炎再発の原因とその対策」特集「再発性膵炎の病態と治療」胆と膵 33(4), 2012、医学書院 2012年4月号、査読無し
 19. 岡崎和一、川茂幸、乾和郎、神澤輝美、田妻進、内田一茂、平野賢二、吉田仁、西野隆義、洪 繁、水野伸匡、濱野英明、菅野 敦、能登原憲司、長谷部修、中沢貴宏、中沼安二、滝川一、坪内博仁、大原弘隆「IgG4 関連硬化性胆管炎臨床診断基準 2012」日本胆道学会雑誌、第 26 巻第 1 号 59-63、査読有
- [学会発表](計 12 件)
1. Ko SB, “ ARHGAP9, a GTPase-activating protein, for CDC42/RAC1/RAC2, inhibits CFTR chloride channel activity through the STAS domain of SLC26 transporters ” International symposium for cystic fibrosis, Nagoya September 29-30, 2014, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Japan
 2. Ko SB, “ Autoimmune pancreatitis: Reorienting the goals of steroid therapy to repair, regeneration, and functional recovery of pancreatic tissues ” Second International Symposium on IgG4&Related disease.Hawaii, USA, 2013.02.16-19,Sheraton Wikiki, Hawaii.
 3. 洪 繁 細胞可塑性：膵内分泌細胞の可塑性を制御するシグナルネットワーク 「分化・未分化マーカーの発現からみたヒト膵細胞の可塑性」第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム 京都、2014 年 10 月 16 日(木) 9:00~11:30 第 8 会場(Room F)
 4. 加藤靖浩、田中 愛美、阿部陽一郎、中武悠樹、近澤奈々、洪 繁、洪 実、安井正人 「水分子動態を制御するアクアポリン発現と超急速凍結による細胞選択」第 2 3 回発達腎研究会、慶應義塾大学、東京、新宿、平成 26 年 8 月 31 日、口演
 5. 洪 繁、 「ヒト成人膵の自己再生能力：炎症、細胞障害と自己組織・機能再生」(独)科学技術振興機構 研究開発戦略センター(CRDS) 科学技術未来戦略ワークショップ

- 「先制医療のための自己再生システムに関する基盤技術開発」～これからの日本の再生医療の在り方～
平成 25 年 12 月 20 日(金) JST 東京別館 2 階 A2 会議室 13:00-18:00
6. 洪 繁、佐伯 恵太、樋口肇
「自己免疫性膵炎の治療 個別化治療の提案」
JDDW2013、シンポジウム 4
2013/10/9、高輪プリンスホテル、品川、東京
7. 洪 繁
「自己免疫性膵炎の治療 個別化治療の提案」
第 21 回若手膵臓研究会、TKP ガーデンシティ品川、東京
平成 25 年 10 月 9 日(水)
8. 洪 繁
「自己免疫性膵炎の外分泌及び内分泌機能の治療経過」
厚生労働省科学研究費、難治性疾患克服研究事業
IgG4 関連疾患に関する調査研究、研究代表者 千葉 勉
平成 24 年度、第 2 回 班会議、2013/2/23(Fri)、京都大学 学友会館
9. 洪 繁、松浦俊博、石黒 洋
「遺伝性膵疾患の病態と治療法」
ワークショップ 17 遺伝性肝胆膵疾患の病態と治療法、第 20 回 JDDW2012
神戸国際会議場 国際会議室、神戸市 2012/10/12
10. 洪 繁
「遺伝性膵疾患の病態と治療法」
第 20 回若手膵臓研究会
生田神社会館、神戸市、2012/10/10
11. 洪 繁、京兼和宏、山田理、松浦俊博
「慢性膵炎組織における幹細胞マーカーの発現」
シンポジウム 4 慢性膵炎は治療介入により改善するか？
第 43 回日本膵臓学会大会 2012/6/28-29
ホテルメトロポリタン山形、山形市、2012/6/28
12. 洪 繁、京兼和宏、松浦俊博
「慢性膵炎の線維化と自己免疫性膵炎の線維化の比較検討」
第 98 回日本消化器病学会総会
シンポジウム 8、「臓器線維化(肝・膵を中心)研究・診療の最前線」
京王プラザホテル、新宿区、東京、2012/4/19-4/21

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

洪 繁 (KO, Shigeru)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：90402578

(2) 研究分担者

洪 実 (KO, Minoru)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：5063199

中武 悠樹 (NAKATAKE, Yuhki)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20415251
(平成 26 年 3 月末まで)

石黒 洋 (ISHIGURO, Hiroshi)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授
研究者番号：90303651

山本 明子 (YAMAMOTO, Akiko)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・准教授
研究者番号：60402385

新飯田 俊平 (NIIDA, Shunpei)
独立行政法人国立長寿医療研究センター・バイオバンク・バイオバンク長
研究者番号：10137630
(平成 25 年 3 月末まで)

松浦 俊博 (MATSUURA, Toshihiro)
独立行政法人国立長寿医療研究センター・消化機能診療部・部長
研究者番号：80501626
(平成 25 年 3 月末まで)