

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：82506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591893

研究課題名(和文) 膵島移植のための遺伝子導入のない成熟膵腺房細胞リプログラミングの包括的検索

研究課題名(英文) Reprograming of mouse acini induced by EGFR receptor ligands

研究代表者

浅野 武秀 (Asano, Takehide)

独立行政法人国立病院機構(千葉東病院臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：80143311

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)：移植臓器の不足の解決のために再生医学は重要である。iPS細胞は全能性であり、理論上はあらゆる臓器再生の源となりうるが、遺伝子導入されていること、発癌性の問題が解決には時間とコストが必要である。今回我々は、マウス膵腺房細胞すなわち上皮細胞の可塑性に着目し、遺伝子導入のないリプログラミングが可能かどうかを検討した。マウス膵上皮細胞は我々の開発した培養方法および上皮細胞増殖因子の存在下に、幹細胞マーカー陽性であり、かつ間質細胞の性質をもった細胞に変化した。マイクロアレイを用いた包括的遺伝子検索により、極めて多数の遺伝子発現の変動が生じる現象であり、胎生期に発現する遺伝子群の発現も認められた。

研究成果の概要(英文)：Beta-cell replacement is a promising therapy for type 1 diabetes. But shortage of pancreas donor is serious problem in Japan. Many reports has been existed about success of induction beta-cell from embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells (iPS), however risk of teratoma formation is obstacle for clinical application. Here we show EGFR receptor ligands can dedifferentiate pancreatic acini derived from adult mice. Nestin positive cells can be obtained and they show stem cell like characters.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医療 幹細胞 可塑性 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

末期臓器不全に対する唯一の有効な治療法として移植医療があるが、本邦においては、移植臓器が絶対的に不足しており、ごく一部の患者さんだけが移植の恩恵を受けることができるという状況が長らく続いている。今後もこの問題が解決する見込みはなく、再生医療のテクノロジーによる臓器再生の可能性が、世界中で模索されている。

胚性幹細胞 (ES 細胞) および本邦において開発された iPS 細胞は、あらゆる臓器や組織に分化する潜在力をもっているとされ、再生医療の出発点となる細胞として期待されている。しかし、この2種類の細胞は、臨床応用を困難にする問題点がある。

ES 細胞においては、使用そのものに倫理的問題がある。この問題の解決には社会的コンセンサスを得たうえで、法的整備が必要であり、近い将来の臨床応用は考えにくい。

ES 細胞/iPS 細胞においては、奇形腫をはじめとする腫瘍発生のリスクがある。幹細胞性 (stemness) と発癌は密接に関連しており、この問題の解決には、不可能ではないにしても大きな困難を伴うことが予想される。

したがって、たとえ ES 細胞や iPS 細胞から膵島細胞への分化誘導が可能になったとしても、早期の臨床応用は不可能と予想されていた。

2. 研究の目的

腺房細胞のリプログラミングを制御する分子機構の解明

1) マウス膵の検討では、膵腺房細胞のリプログラミングと上皮間質移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) は、同時に生じる。ヒト膵由来膵腺房細胞においても、同じ現象が生じているかどうかを検討する。

2) EMT が生じているならば、EMT の鍵となるレギュレーターである Twist, Bmi1, Zeb-1, MiR-200a などが、膵腺房細胞のリプログラミングに重要な役割を果たしていることが予想される。リプログラミング前後の細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた RNA 発現解析を行い、これらの遺伝子あるいは新規遺伝子の発現に関しパスイ解析を行う。

3. 研究の方法

腺房細胞分離条件の確定

マウス膵腺房細胞における検討は行っていないため、種々の条件で遠沈を行い、腺房細胞分離の至適条件を決定する。分離した細胞は血清含有培地において培養を開始する。

(1) 腺房細胞分離条件の確定

膵腺房細胞は他の線維芽細胞や膵島細胞に比べて重く、血清含有 PBS あるいは、フィコール溶液にて遠沈分離が可能である。しかし、

種々の条件で遠沈を行い、腺房細胞分離の至適条件を決定する。分離した細胞は血清含有培地において培養を開始する。

(2) 分離した腺房細胞の微少環境によるリプログラミング能の検討

(2)-1 増殖因子含有培地における腺房細胞のリプログラミング能の検討

分離した腺房細胞を、低接着性細胞培養フラスコにおいて培養する。マウス膵においてリプログラミングに成功した EGF, FGF-2 などの増殖因子を加えて培養することで、細胞の形態変化を観察する。また分子生物学的マーカーを用いて幹細胞性を測定する。すなわち、上皮の形質の喪失は、E-カドヘリンの発現の消失、間質細胞の形質の獲得は、ビメンチンの発現を免疫染色で検討する。また、リプログラミングされ、膵幹細胞の性質に近づけば、ngn3, pax6 などの転写因子が発現することが予想された。

マウス腺房細胞より抽出した RNA およびリプログラミングした腺房細胞より total RNA の抽出を行う。

これらの RNA をアジレント社の Whole human genome oligo DNA マイクロアレイ (SurePrint G3 HumanGE マイクロアレイキット 8x 60k) にハイブリダイズし、遺伝子発現プロファイルを得る。データ解析はアジレント社の GeneSpring GX ソフトウェアを用いる。クラスター解析およびパスウェイ解析を行い、リプログラミングに関与するシグナリングパスウェイ候補の同定を行う。

4. 研究成果

我々が行った腺房細胞培養法は、Miyamoto らが報告したマウス膵組織培養法を改変したものである。

CD1 マウスの膵を摘出後細切し、コラゲナーゼ処理を行った後、密度勾配遠心により腺房細胞が豊富な分画を抽出し、ゼラチンコート培養皿上で培養したものである。培養液は通常の DMEM 培地に 10% の FBS を加えたものに、EGF を 50ng/ml の濃度で加えている。

Miyamoto らの方法では、コラーゲンゲル内で腺房細胞を3次元培養したところ、TGF の刺激下に、膵腺房細胞が、サイトケラチン陽性の管上皮細胞に transdifferentiation を生じている。この変化の intermediate としてネスチン陽性細胞が生じていること、Notch シグナリングが鍵となるシグナリングパスウェイであることが示されている。

我々の方法では、transdifferentiation ではなく、形態的に線維芽細胞に類似したネスチン陽性細胞を誘導しこれを増殖、保存することが可能であることを示した。

Preliminary な結果ではあるが、このネスチン陽性細胞は無血清培地に nicotinamide, HGF などを加えた分化メEDIUM中で培養することにより、インスリン陽性細胞、グルカゴン陽性細胞などを誘導することができ、

Pdx1, ngn3 など膵発生関連遺伝子の発現も immunofluorescence 法で確認できた。これらのことから、マウス膵腺房細胞から、EGF の刺激下に誘導されたネスチン陽性細胞は、分化能をもちかつ性質を変えずに増殖可能であることから、膵幹細胞様細胞であると考えられる

(1)発現遺伝子の大規模変動

CD1 マウスより分離した当日 (Day=0) に対する 7 日目 (Day=7) の発現遺伝子の変動を Affymetrix Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 array を用いて解析を行った。このマイクロアレイは 45101 プローブを搭載し、21732 遺伝子を網羅している。

発現 2 倍以上の増加は 2216 遺伝子、発現 1/2 以下の減少は 4174 遺伝子であり、Nestin 陽性細胞への変化は、極めて多数の新規タンパク合成を伴うダイナミックな変化であることが判明した。

(2)パスウェイ解析

パスウェイ解析では、ダイナミックな新規タンパク合成を反映して、スプライシングに関連した遺伝子群スプライストーム、腺上皮の形態から線維芽細胞様の間質細胞への変化を反映していると考えられる、接着因子の遺伝子群が、極めて有意に増加していた。以下、癌関連パスウェイ、アクチン細胞骨格、細胞周期、プロテアソームに関連する遺伝子群が増加していた。癌関連パスウェイの増加は示唆に富むものである。今回の変化に特徴的なのは、細胞形態の変化であり、上皮 - 間葉変換はその一部を説明するものである。上皮精の喪失、増殖能の獲得を得るが癌化とは異なった今回のモデルで、癌関連パスウェイの増加を認めることは、癌化に関連する遺伝子誘導は、本来癌化以外の機能を持っていることを示唆するものと思われる。

Category	Term	Count	%	PValue
KEGG_PATHWAY	スプライストーム	45	2.56996	7.15E-14
KEGG_PATHWAY	接着因子	54	3.083952	6.41E-11
KEGG_PATHWAY	癌関連パスウェイ	73	4.169046	2.51E-10
KEGG_PATHWAY	アクチン細胞骨格	56	3.198172	2.67E-10
KEGG_PATHWAY	細胞周期	36	2.055968	7.14E-08
KEGG_PATHWAY	プロテアソーム	20	1.142204	9.39E-08

(3) クラスタ解析

クラスタ解析の結果からは胎生期発生関連遺伝子の高発現を認めた。今回得られた Nestin 陽性細胞は、幹細胞様の性質をもつものと考えられるが、胎生期関連遺伝子の高発現はこれに矛盾しない結果である。胎生期のみ発現し、成体では発現しないと考えられている遺伝子であっても、今回のモデルのように大きな形態変換を伴い大規模な転写が誘導されるような状況では、未知の機能を発揮しているものと考えられる。

Annotation cluster	P_Value
in utero embryonic development	1.0E-4
B-cell leukemia/lymphoma 10; predicted gene 6141	
BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	
Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6; predicted gene 5917; predicted gene 15785; predicted gene 4852; predicted gene 2541	
EGL nine homolog 1 (C. elegans)	
GA repeat binding protein, alpha	
LIM and senescent cell antigen-like domains 1	
MAD homolog 2 (Drosophila)	
PRP19/PSO4 pre-mRNA processing factor 19 homolog (S. cerevisiae)	
SKI-like	

再生医療に有用な、分化能が豊富で扱いやすく、よく増えて性質があまり変わらない安全で癌化しにくい細胞をどのようにしたら得ることができるであろうか。組織に微小に存在する幹細胞ポピュレーションをいかに効率よく収集できるであろうか。

技術を洗練させることはもちろん必須であるが、今一度幹細胞性はいかに得られるかを考察する必要があると思われる。Hanna らの秀逸なレビューを参考に考えてみたい。

細胞の pluripotency すなわち幹細胞性は、3 つの因子で決定される。外的因子 extrinsic factor、内的遺伝学的要素 intrinsic genetic determinant、そして胚細胞あるいは受精卵を期限とするエピジェネティックである。

今回の我々の腺房細胞培養系では、遺伝子導入はしていないので、個々の細胞のゲノム情報は同一である。換言すれば genetic background は同一である。個々の細胞に、培養条件と増殖因子という外的条件が加わり、エピジェネティックな変化も証明はされていないが加わっている可能性がある。

遺伝学的情報が一定の細胞集団の中で (すなわちほとんどの生物個体や実験系の中で) 細胞の多様性がどのように決定されるかは、エピジェネティックな変化による細胞のとりうる状態の総体である状態空間のなかで、その細胞がどの位置を占めるかによって決定されるとするエピジェネティックランドスケープという考え方がある (13)。細胞はその時の環境により、取りうる状態を一定の確立で遷移しており、その変化はノイズという概念で示される。同じ環境、同じ刺激であっても、クローナルな細胞集団は同じ挙動をするとは限らず、その変化のバリエーションがノイズであり、これが多様性の源であり、したがって幹細胞性の源であると考えられる。今後より有用な細胞を得るためには、ノイズを測定する手法の確立が望まれる。ノイズを測定するためには、細胞一つ一つのリアルタイムイメージングが必要であり、これらの手法の進展とシステム生物学的な解釈の進化により、幹細胞性の理解が進み、臨床応用可能な細胞の樹立にむけた研究の発展に寄与するものと考えられる。

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 1件)

鈴木一史

遺伝子導入のない成熟膵腺房細胞のリプロ
グラミング

Organ Biology, Vol.20, No.2, 2013 (査読
あり)

〔学会発表〕(計 1件)

鈴木一史, 浅野武秀, 吉田 徳子, 宮内
英聡, 白鳥 享, 松原 久裕

遺伝子導入のないマウス成熟膵腺房細胞の
リプログラミング

第41回 日本膵・膵島移植研究会

2014年3月7日 名古屋

〔図書〕(計 1件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 1件)

名称: 成体膵由来膵幹細胞の製造方法

発明者: 鈴木一史 浅野武秀

権利者: 国立大学法人 千葉大学

種類:

番号: 特願 2005-116309

出願年月日: 平成 17年 4月 13日

取得年月日: 平成 26年 8月 1日

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野武秀 ()

研究者番号: 80143311

(2) 研究分担者

鈴木一史 ()

研究者番号: 00586737

(3) 連携研究者

()

研究者番号: