

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660259

研究課題名(和文) 脾臓と膵臓間葉系細胞の分化転換系を応用した膵臓器官再生支持環境の構築

研究課題名(英文) Spleen mesenchymal cells incorporated into the pancreatic microenvironment

研究代表者

後飯塚 僚 (GOITSUKA, RYO)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：50301552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Tlx1欠損マウスでは脾臓が形成されないだけでなく、脾臓になるべき間葉系細胞が背側膵臓においてビメンチンおよびデスミン陽性の間葉系細胞として存在することを明らかにした。さらに、胎仔器官培養系を用いて解析した結果、コントロールでは、間葉系細胞の一定の方向性を持った移動が認められたが、Tlx1が欠損した状況では細胞はランダムな動きを示し、方向性が観察されなかった。したがって、Tlx1欠損では脾臓原基と膵臓原基の分離不全あるいは脾臓原基の胃の大湾にそった移動不全が起こり、脾臓になるべき細胞が膵臓の間葉系組織の中に取り残される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tlx1 is an essential transcription factor for spleen organogenesis. We have demonstrated by genetic lineage-tracing of Tlx1-expressing cells and their progeny using Tlx1CreER-Venus;Rosa26-tdTomato mice that Tlx1 deficiency causes these cells to be incorporated into the dorsal pancreatic mesenchyme, where they give rise to desmin- and vimentin-positive cells scattering around the endocrine, exocrine and ductal cells. By using the embryonic gut organ culture system, we observed that Tlx1-expressing descendants expanded in spleno-pancreatic mesenchyme through the mesenchyme overlying the stomach from the posterior to anterior direction. In contrast, individual cells of the Tlx1-deficient spleno-pancreatic mesenchyme appeared to migrate randomly. These findings suggest that the Tlx1-deficient progeny derived from precursors, in which Tlx1 was transcriptionally activated, fail to move out from spleno-pancreatic mesenchyme, thus being misallocated to the dorsal pancreas.

研究分野：統合動物科学

キーワード：間葉系細胞 幹細胞 再生 発生 微小環境 免疫 脾臓 膵臓

1. 研究開始当初の背景

膵臓は後胃間膜に隣接した臓側中胚葉に、脾臓原基と共通した脾臓膵臓間充織 (Splenopancreatic mesenchyme) として発生し、そこに上皮前駆細胞が貫入し、間葉系細胞と相互作用することによって、膵管や内分泌・外分泌腺系列への分化運命が決定される。この膵臓上皮細胞の分化や増殖に間葉系細胞との相互作用が必要であることは、間葉系組織を取り除いた膵臓原基の上皮は *in vitro* で増殖が起きないことが 1962 年に初めて示され、また近年、膵臓上皮細胞と間葉系幹細胞の共培養で、上皮前駆細胞からインスリン産生細胞への分化が促進されることや膵臓間葉系細胞をジフテリア毒素誘導的に欠損可能な遺伝子改変マウスを用いて、間葉系細胞が内分泌・外分泌前駆細胞の増殖や分化に必須であることが報告されている。しかしながら、膵臓の発生や再生については、上皮前駆細胞の内分泌・外分泌細胞への分化を制御する転写因子に関する研究が精力的に行われている一方、膵臓上皮前駆細胞が貫入・分化する場となる間葉系組織の形成や上皮細胞との相互作用に関する研究は立ち遅れている現状である。

2. 研究の目的

膵臓の内分泌機能を担うβ細胞の分化誘導系法などの技術は進展しているが、現状での最も重要な課題は作製したβ細胞の長期間にわたる生体での維持である。本研究は膵臓上皮前駆細胞に由来する内分泌細胞、外分泌細胞、膵管細胞の形成・再生を直接的に制御する技術の開発ではなく、発生学的に近縁な間葉系組織である脾臓をその代用として用いることで、内分泌細胞などの膵臓上皮細胞組織を生体内で維持・支持する微小環境を開発する基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

脾臓の発生に必須のホメオドメイン転写因子である *Tlx1* の遺伝子座に、タモキシフェン依存的に *loxP* 配列を切断する Cre 組換え酵素と変異エストロゲン受容体リガンド結合部位の融合 (CreER) 遺伝子ならびにリボソームエンターサイトが付加した緑色蛍光 (Venus) 遺伝子をノックインしたアレルをホモに有する *Tlx1^{CreER-Venus/CreER-Venus}* マウスを用いて、本マウスを、*loxP* 配列に囲まれた STOP 配列を除去すると赤色蛍光を発する R26R-tdTomato レポーターマウスと交配することで、胎仔期に脾臓原基を形成していた間葉系細胞が *Tlx1* 欠損環境では膵臓に検出されるシステムを構築する。本システムを用いて、間葉系細胞の脾臓から膵臓への分化転換プロセスならびにそれに伴って起こる細胞・遺伝子レベルの変化を解析することにより、脾臓微小環境と膵臓微小環境を構成する間葉系細胞の性状ならびに機能の比較を行う。

4. 研究成果

(1) 脾臓と背側膵臓の間葉系組織は同じ間充織から発生し、その後、脾臓原基は膵臓原基と分離し、胃の大湾にそって脾臓原基が進展することによって、独立した脾臓が形成されるが、*Tlx1^{CreER-Venus/CreER-Venus}*, *Rosa26-tdTomato* マウスでは脾臓が形成されないだけでなく、脾臓になるべき間葉系細胞が脾臓と共通の原基から発生する背側膵臓にのみ局在し、腹側膵臓には検出されることが明らかになった。

(2) 免疫組織学的解析を行った結果、膵臓に認められる tdTomato 陽性細胞はアミラーゼ陽性の外分泌腺、インスリン陽性の内分泌腺、DBA-lectin 陽性の膵管上皮細胞ではなく、デスミンならびにビメンチン陽性の間葉系細胞であることが判明した。

(3) *Tlx1* 欠損胎仔膵臓に認められる tdTomato 陽性細胞は 5 週令の成体膵臓においても維持され続けていた。

(4) 胎齢 13.5 日の *Tlx1* 欠損ならびにコントロールマウスの脾臓原基に発現する遺伝子についてマイクロアレイ解析を行った結果、膵臓の発生に関与する遺伝子群について差異は認められなかった。

(5) 胎齢 13.5 日の *Tlx1* 欠損ならびにコントロールマウスの脾臓原基の細胞増殖ならびに細胞死について検討した結果、顕著な差は観察されなかった。

(6) 脾臓原基が形成される胎齢 11.5 日に *Tlx1* 発現細胞を tdTomato で標識し、胎齢 12.5 日の胎児から脾臓原基を含む消化管を取り出し、胎齢 14.5 日に相当する 48 時間の間、器官培養を行い、標識された細胞の挙動について観察した。その結果、コントロールでは、tdTomato 陽性細胞の一定の方向性を持った移動が認められたが、*Tlx1* が欠損した状況では細胞はランダムな動きを示し、方向性が観察されなかった。したがって、*Tlx1* 欠損では脾臓原基と膵臓原基の分離不全あるいは脾臓原基の胃の大湾にそった移動不全が起り、脾臓になるべき細胞が膵臓の間葉系組織の中に取り残される可能性が示唆された。

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)

- ① Yokoyama, T., Nakatake, M., Kuwata, T., Goitsuka, R., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Valk, P. J. M., Delwel, R. and Nakamura, T.: Tranactivation of *Sty11/Slp1* by *Meis1*

- promotes CXCL12/CXCR4 signaling and myeloid leukemogenesis in vivo. *J. Clin. Invest.* 126:1664-1678.
doi: 10.1172/JCI81516. (2016) (査読有)
- ② Yoshioka, K., Oda, A., Notsu, C., Ohtsuka, T., Kawai, Y., Suzuki, S., Nakamura, T., Mabuchi, Y., Matsuzaki, Y., and Goitsuka, R. Loss of the homeodomain transcription factor Prepl perturbs adult hematopoiesis in the bone marrow. *PLOS ONE*, **10**, e0136107. doi: 10.1371/journal.pone.0136107. (2015) (査読有)
- ③ Seki, Y., Kikuchi, Y., Yoshimoto, R., Aburai, K., Kanai, Y., Ruike, T., Iwabata, K., Goitsuka, R., Sugawara, F., Abe, M., and Sakaguchi, K.: Promotion of crystalline cellulose degradation by expansins from *Oryza sativa*. *Planta*, **241**, 83-93 (2015)
doi: 10.1007/s00425-014-2163-6. (査読有)
- ④ Tashiro, Y., Murakami, A., Goitsuka, R., Shimizu, T., Kishimoto, H., and Azuma, T.: An asymmetric antibody repertoire is shaped between plasmablasts and plasma cells after secondary immunization with (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl chicken gamma-globulin. *Int. Immunol.*, **27**:609-620 (2015).
doi: 10.1093/intimm/dxv040. (査読有)
- ⑤ Nakahara, R., Kawai, Y., Oda, A., Nishimura, M., Murakami, A., Azuma, T., Kaifu, T. and Goitsuka, R.: Generation of a Tlx1^{CreER-Venus} knock-in mouse strain for the study of spleen development. *Genesis*, **52**, 916-923 (2014)
doi: 10.1002/dvg.22829. (査読有)
- ⑥ Okumura, K., Saito, M., Aoto, Y., Hachiya, T., Sakakibara, Y., Katsuragi, Y., Hirose, S., Kominami, R., Goitsuka, R., Nakamura, T. and Wakabayashi, Y.: Meis1 regulates epidermal stem cells and is required for skin tumorigenesis. *PLOS ONE*, **9**, e102111. (2014)
doi: 10.1371/journal.pone.0102111. (査読有)
- ⑦ Ariki, R., Morikawa, S., Mabuchi, Y., Suzuki, S., Nakatake, M., Yoshioka, K., Hidano, S., Nakauchi, H., Matsuzaki, Y., Nakamura, T. and Goitsuka, R. Homeodomain transcription factor Meis1 is a critical regulator of adult bone marrow hematopoiesis. *PLOS ONE*, **9**, e87646. (2014)
doi: 10.1371/journal.pone.0087646. (査読有)
- ⑧ Hirayama T., Asano, Y., Iida, H., Watanabe, T., Nakamura, T. and Goitsuka, R. Meis1 is required for the maintenance of postnatal thymic epithelial cells. *PLOS ONE*, **9**, e89885. (2014)
doi: 10.1371/journal.pone.0089885. (査読有)
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 後飯塚僚: 髄外造血ニッチとしての脾臓微小環境の形成機構、福岡大学医学部再生医学研究所セミナー、福岡大学(福岡)、2016年2月24日
- ② Akihisa Oda, Chihiro Notsu, and Ryo Goitsuka: Overexpression of Tlx1 *in situ* causes extramedullary hematopoiesis in the adult spleen. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015年11月18-20日
- ③ Toru Kasahara, Akihisa Oda, and Ryo Goitsuka: Transcription factor Tlx1 regulates cell migration of the spleno-pancreatic mesenchyme in spleen organogenesis. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015年11月18-20日
- ④ Chihiro Notsu, Akihisa Oda, and Ryo Goitsuka: Maintenance of the white pulp architecture in the postnatal spleen requires Meis1 expression in mesenchymal progenitor cells. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015年11月18-20日
- ⑤ Yasuyuki Tashiro, Akikazu Murakami, Ryo Goitsuka, Takeyuki Shimizu, Hidehiro Kishimoto and Takachika Azuma: An asymmetric antibody repertoire is shaped between plasmablasts and plasma cells after secondary immunization with (4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl; NP) hapten. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015年11月18-20日
- ⑥ Katsumoto, T., Yamagata, K., Ogawara, Y., Nakamura, T., Goitsuka, R., and Kitabayashi, I.: Endogenous MOZ was essential for MOZ-TIF2-induced Meis1 upregulation and AML development. 第77回日本血液学会学術集会、ホテル日航金沢、金沢、2015年10月16-18日
- ⑦ Kasahara, T., Oda, A., and Goitsuka, R.: Cell fate mapping of embryonic spleen primordium cells expressing the transcription factor Tlx1. 第24回日本バイオイメージング学会学術集会、東京理科大学葛飾キャンパス、東京、2015年9月26-28日
- ⑧ 小田朗永、笠原透、野津智尋、後飯塚僚: ホメオドメイン転写因子 Tlx1 は赤脾髄における赤芽球・マクロファージの維持に關与する、第25回学術集会 Kyoto T cell Conference、芝蘭会館、京都、2015年5月15-16日
- ⑨ 笠原透、中原亮、野津智尋、小田朗永、後飯塚僚: ホメオドメイン転写因子 Tlx1 は脾臓原基間葉系細胞の分化運命を規定する、第25回学術集会 Kyoto T cell Conference、芝蘭会館、京都、2015年5月15-16日
- ⑩ Akihisa Oda, Ryo Nakahara, Chihiro Notsu, Toru Kasahara, and Ryo Goitsuka: Contribution of Tlx1-expressing mesenchymal cells to splenic

microenvironment formation during organogenesis and regeneration. Venice Thymus Meeting 2015, Venice International University, Italy, 2015年4月9-13日

- ⑪ Akihisa Oda, Ryo Nakahara, Chihiro Notsu, Toru Kasahara, and Ryo Goitsuka: The role of postnatal mesenchymal cell population retaining a potential to give rise to various types of mature stromal cells in the spleen. 第43回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館、2014年12月10-12日
- ⑫ Yasuyuki Tashiro, Ryo Goitsuka and Takachika Azuma: Isotype-specific regulation of antibody secretion and affinity maturation during immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl; NP) hapten. 第43回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館、2014年12月10-12日
- ⑬ Ryo Nakahara, Chihiro Notsu, Akihisa Oda, and Ryo Goitsuka: Contribution of Tlx1-expressing mesenchymal cells to splenic microenvironment formation during organogenesis and regeneration. 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014年11月25-27日
- ⑭ Yuichi Wakabayashi, Kazuhiro Okumura, Megumi Saito, Yoshimasa Aoto, Yasubumi Sakakibara, Ryo Kominami, Ryo Goitsuka, Takuro Nakamura, and Eriko Isogai: Meis1 is a crucial regulator of epidermal stem cell maintenance and skin carcinogenesis. 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014年11月25-27日
- ⑮ Tomoo Owa, Shinichiro Taya, Tomoki Nishioka, Takuro Nakamura, Ryo Goitsuka, Kozo Kaibuchi, Mikio Hoshino: Role of Meis1 in the cerebellar development. 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014年11月25-27日
- ⑯ 後飯塚僚: 脾臓の微小環境を構成する間葉系細胞の起源と機能. 第157回日本獣医学会学術集会、北海道大学高等教育推進機構、2014年9月9-12日
- ⑰ 小田朗永、野津智尋、中原亮、後飯塚僚: 成体脾臓微小環境の維持における Tlx1 発現間葉系細胞の役割. 第24回学術集会 Kyoto T cell conference, 京都平安ホテル, 2014年5月16-17日

[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]

ホームページ等

<http://www.ribs.tus.ac.jp/laboratories/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後飯塚 僚 (GOITSUKA RYO)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授
研究者番号: 50301552

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし