

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861080

研究課題名(和文) 膵組織から膵幹細胞の分離方法の確立と、膵外分泌機能不全に対する治療方法の開発

研究課題名(英文) Extraction of pancreatic stem cells from pancreatic tissue and development of new therapeutic modality for pancreatic exocrine insufficiency.

研究代表者

近藤 成 (Kondo, Naru)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：00712217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵幹細胞からの膵腺房細胞への、分化・増殖に関する研究では、得られた細胞に対し、膵腺房細胞のマーカーとして、トリプシンとアミラーゼの免疫組織学的染色を行った結果、トリプシンとアミラーゼの発現を認めた。しかし、成熟した膵組織において、腺房細胞の増殖を誘導する方法の確立ができなかったため、今後の課題となった。

臨床面においては、膵外分泌機能を評価する方法として、 $^{13}C$ ラベル脂肪負荷呼吸気試験を用いて、膵切除後の残膵ボリュームと膵外分泌機能が相関することが確認された。これにより、 $^{13}C$ ラベル脂肪負荷呼吸気試験による膵外分泌機能評価の正当性が確認された。

研究成果の概要(英文)：Research about growth and differentiation from pancreatic stem cells to acinar cells was performed. Expression of trypsin and amylase in obtained cells were found by immunohistochemistry. However, methodology of growth of acinar cells in matured pancreatic tissue could not be established, and further researches will be needed. Clinically, pancreatic exocrine function was evaluated by  $^{13}C$ -labeled mixed triglyceride breath test. Significant correlation was found between remnant pancreatic parenchymal volume and pancreatic exocrine function. Therefore,  $^{13}C$ -labeled mixed triglyceride breath test was validated for evaluate the pancreatic exocrine function.

研究分野：膵外分泌機能

キーワード：膵幹細胞 トリプシン アミラーゼ PDX-1 GLP-1

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓外科領域では、近年の画像診断技術の発達による手術適応症例の増加と、手術手技および周術期管理の進歩により、術後長期生存例が増加している。2007年1年間の慢性膵炎推計受療患者数は47,100人(95%信頼区間40,200~54,000人)、年間推計受療数は人口10万人あたり36.9人、2007年1年間の新規慢性膵炎発症患者数は15,200人(95%信頼区間12,900~17,600人)、人口10万人あたりの推定新規発症患者数は11.9人であった。慢性膵炎の有病患者数は年々増加してきている。症例の増加に伴い、膵切除後あるいは慢性膵炎におけるPEIによる低栄養、またそれに伴うQOLの低下に対する対策は重要な課題と考えられる。

膵全摘術後やインスリン依存状態糖尿病における膵内分泌機能不全に対しては、膵移植や膵島移植などの治療法があり、さらにiPS細胞・ES細胞の利用など再生医療の分野や、膵外分泌細胞からの内分泌細胞への分化誘導など、様々な研究が進行している(Diabetes Frontier 2010)。しかしながら、膵外分泌機能不全の治療に関してはあまり研究が進んでおらず、現時点ではPEIに対しては長期にわたる膵酵素補充療法が必須で標準治療となっている。

## 2. 研究の目的

移植可能な膵腺房細胞の分離方法の確立と、膵癌や慢性膵炎、膵切除術後の膵外分泌機能障害(PEI;pancreatic exocrine insufficiency)において、標準治療である膵酵素補充療法(PERT;pancreatic enzyme replacement therapy)で効果不十分あるいは栄養状態の改善がみられないものに対して、膵腺房細胞移植による新しい膵外分泌機能不全治療方法の開発を目的とする研究を行う。

PEIの診断方法としては、有管法であるセクレチン検査や無管法である便中エラスターゼ-1検査やBT-PABA試験(PFD;pancreatic functioning diagnostic test)などがあるが、我々は13C標識混合中性脂肪呼吸気試験(13C-MGT-BT)も簡便で有用な方法として報告している(Surgery 2009)。具体的には、13C標識混合中性脂肪カプセル投与前および投与後1時間毎に7時間、専用の呼吸バックに呼吸採取を行う。呼吸は赤外分光分析装置POCone(大塚電子(株))で13CO<sub>2</sub>の存在比を測定し、前値との差のピーク値をC<sub>max</sub>、ピーク値を呈する時間をT<sub>max</sub>とする。体表面積を考慮して13CO<sub>2</sub>の1時間当たりの排泄率を算出し、13C標識脂肪カプセル投与後7時間までの排泄率の積分値(7時間13C累積回

収率(%))を求める。13C-MGT-BTと便中エラスターゼ-1検査との比較から7時間13C累積回収率のカットオフ値の検討を行い、その結果、PEIの定義として7時間13C累積回収率5%をカットオフ値と定めた(Surgery 2009)。膵切除後13C-MGT-BTの結果、当科では56%(128例/227例)のPEIを認めた。膵切除術後PEI発症危険因子は、過去の報告より残膵の線維化の程度(Dig Surg 2008)、膵消化管再建方法(J Am Coll Surg 2005)、大量膵切除(Br J Surg 2007)、膵癌や慢性膵炎などの疾患(J Gastrointest Surg 2006 / Scand J Gastroenterol 2007)など様々な報告がみられる。当科における膵切除術後PEI発症危険因子の検討では、多変量解析の結果から術後残膵容量が低値のものが独立した発症危険因子であった(Hazard ratio 5.54, 95% confidence interval 2.79 - 11.3)。また、我々は膵切除術後の病理標本の膵断端を用いて、アザン染色にて膵腺房細胞を脂肪組織や線維組織と識別し、腺房細胞が全体に占める割合(腺房細胞面積比)を測定し、これを13C呼吸気試験の7時間13C累積回収率と比較検討した。その結果、全症例では腺房細胞面積比は13C累積回収率と有意な正の相関関係を示した(n=110, R=0.35, P<0.001)。以上より、膵腺房細胞量とPEIは密接な関係にあることが示唆された。

膵切除術後PEIの現在の治療方法としては、膵酵素補充療法が標準治療であるが、大量膵切除症例、つまり残膵容量の小さい症例に対しては不十分であることが多い。当科での術後膵酵素補充療法効果判定の検討においても、7時間13C累積回収率平均値は1.4±0.2%から3.8±0.5%に有意に改善を認めるが(P<.001)、不十分である症例が多くみられる。

近年、肝・膵・小腸の幹細胞系に関する研究で、細胞の転写因子Sox9に着目してそれぞれの成体幹細胞の同定を試みた研究が報告され、膵については膵管から膵外分泌細胞へ持続的な細胞の供給が健常児の臓器維持と障害後の再生過程において行われていることが報告されている(Nature genetics 2011)。それによれば、成体では膵内分泌細胞への幹細胞からの分化は停止しているのに対し、膵外分泌細胞は膵管および腺房中心細胞から腺房へ供給されていることが判明し、また膵臓の幹細胞は1日で約3%が腺房細胞に分化していることが報告された。

-1 膵組織から膵幹細胞の分離方法の確立  
本研究において、まず膵組織からの幹細胞系の分離の手法を確立する。また膵幹細胞から膵腺房細胞への分化・培養方法を確立

し、膵外分泌機能を十分に有する移植可能な膵腺房細胞を開発する。

得られた膵腺房細胞に対し、トリプシン染色により消化酵素分泌能を確認する。

-2 膵外分泌機能不全ラット実験モデルへの膵腺房細胞の移植

分離した膵幹細胞、膵腺房細胞を膵切除ラットモデルまたは膵外分泌機能不全ラットモデルの膵に移植し、その前後での膵外分泌機能を 13C 脂肪吸収呼吸気試験により測定する。また、その栄養状態も評価し、膵の幹細胞移植による効果について検討する。

-3 ES 細胞からの膵腺房細胞の分化誘導と移植

ES 細胞 (embryonic stem cells) からの膵外分泌細胞への段階的分化の研究報告もあり (Stem Cells Dev 2011)。ES 細胞から膵外分泌細胞を分化誘導し、これを膵切除ラット実験モデルに移植し、膵外分泌機能を測定する。また、移植後の膵組織を組織学的に検討し、移植した細胞の生着の程度を評価する。

### 3. 研究の方法

膵組織からの幹細胞系の分離の手法を確立する。これにより得られた膵幹細胞から膵腺房細胞への分化・培養方法を確立し、膵外分泌機能を十分に有する移植可能な膵腺房細胞を開発する。

膵幹細胞、膵腺房細胞を膵切除ラットモデルまたは膵外分泌機能不全ラットモデルの膵に移植し、その前後での膵外分泌機能を 13C 脂肪吸収呼吸気試験により測定する。また、その栄養状態も評価し、膵の幹細胞移植による効果について検討する。

また、ES 細胞 (embryonic stem cells) からの膵外分泌細胞への分化誘導について検討し、ここで得られた膵外分泌細胞を膵切除ラット実験モデルに移植し、13C-MTG-BT により膵外分泌機能を測定する。また、移植後の膵組織を組織学的に検討し、移植した細胞の生着の程度を評価する。

膵の幹細胞については、細胞を未分化状態に保つ働きのある転写因子 SOX9 が幹細胞で発現しており、タモキシフェン誘導性 CreloxP 系を用いて Sox9 発現細胞の解析を行う。Sox9 遺伝子に CreER 遺伝子を挿入した Sox9-IRES-CreER マウスと LacZ レポーターマウスである Rosa26R マウスを掛け合わせて得た個体にタモキシフェンを投与すると Sox9 を発現している細胞とその子孫の細胞が LacZ 標識される。膵については Sox9 は膵管および腺房中心細胞に発現しており、そこから腺房細胞の供給がされている (Nature genetics 2011)。このことから膵の幹細胞を選択的に収集する方法を検討していくことが可能と推測する。

膵島移植における膵島の分離にはコラゲナ

ーゼによる処理や遠心分離などが用いられているが、膵の幹細胞の分離についても同様な手法を行い、LacZ 標識された幹細胞を選択的に収集できる方法を検討していく。

また、マウスの胎児の膵から c-Kit などの造血幹細胞の表面抗原を用いた膵幹細胞の分離と培養、さらに膵内分泌細胞への分化に関する報告がされている (International Journal of Endocrinology)。この報告では磁気細胞分離が使用されている。このような表面抗原や磁気細胞分離についても検討する。

分離した膵幹細胞に対し、膵腺房細胞への分化誘導の手法を検討していく。ES 細胞からの膵外分泌細胞の分化誘導の研究では、膵幹細胞は PDX-1 を発現し、膵外分泌細胞への分化に関しては FGF7、glucagon-like peptide-1 (GLP-1)、nicotinamide などが関連していると報告されている (Stem Cells Dev 2011)。成熟した膵組織に PDX-1 を発現する細胞があるか、また成熟膵組織に対し FGF7・GLP-1・nicotinamide などを投与することで膵腺房細胞を増殖させることが可能かどうかを検討する。

膵幹細胞からの分化誘導の検討では、得られた細胞に対し、膵腺房マーカーとしてトリプシンとアミラーゼの免疫組織化学的検索を行い、腺房細胞としての機能の有無について確認する。

膵幹細胞の分離、膵腺房細胞への分化誘導・増殖が可能となった時点で、50%・90%膵切除モデル実験ラットで得られた膵組織から膵幹細胞を分離し、膵腺房細胞へ分化誘導・培養し、膵切除ラットモデル・膵外分泌不全ラットモデルへの膵幹細胞・膵腺房細胞を再度移植する実験を行う。移植前と移植後 3 か月・6 ヶ月の時点での膵外分泌機能を 13C-MTG-BT で測定し、移植を行わなかった群との間で比較検討を行う。また、移植を行わなかった群と栄養状態を血液検査にて評価して比較を行い、膵腺房細胞移植の効果を検討する。

移植後の膵組織を採取し、移植した細胞の生着の程度について組織学的な検討を行う。また、移植後に有害事象の発生を認めれば、その都度対策を検討行う。

### 4. 研究成果

膵幹細胞からの膵腺房細胞への、分化・増殖に関する研究では、得られた細胞に対し、膵腺房細胞のマーカーとして、トリプシンとアミラーゼの免疫組織学的染色を行った結果、トリプシンとアミラーゼの発現を認めた。しかし、成熟した膵組織において、腺房細胞の増殖を誘導する方法の確立ができなかったため、今後の課題となった。

臨床面においては、膵外分泌機能を評価する方法として、 $13C$ ラベル脂肪負荷呼気試験を用いて、膵切除後の残膵ボリュームと膵外分泌機能が相関することが確認された。これにより、 $13C$ ラベル脂肪負荷呼気試験による膵外分泌機能評価の正当性が確認された。

#### 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 1件)

Okano K, Murakami Y, Nakagawa N, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Kondo N, Takahashi S, Sueda T.

Remnant pancreatic parenchymal volume predicts postoperative pancreatic exocrine insufficiency after pancreatectomy.

Surgery. 2016 ;159:885-92 (査読あり)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0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 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

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

近藤 成(Kondo Naru)

広島大学、大学病院、病院助教

研究者番号:00712217

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: