

研究課題別評価

1. 研究課題名:ptf1a 遺伝子導入による異所性膵組織誘導の機構解明

2. 研究者氏名:川口 義弥

3. 研究の狙い:

糖尿病に対する根本的治療法の確立を目的に、生物学的活性を持つ異所性膵組織の誘導を目指す。異所性組織誘導の場として、ヒトでしばしば異所性膵組織が形成される胃・十二指腸を想定し、胎生期膵形成で未分化内胚葉上皮から膵への運命決定に重要な役割を演じる ptf1a を遺伝子導入することにより、膵組織が誘導されるか否かの検討を目的とする。膵内分泌/外分泌細胞の分化には単なる転写因子の ON・OFF ではなく、転写因子発現量の調節が重要であると仮定すると ptf1a 発現量の調節により誘導される膵細胞の種類が異なってくる事が予想され、インシュリン産生細胞の誘導に最適な遺伝子導入量/発現量の決定が最大の問題点であると考えられた。また、膵内分泌細胞の分化過程で ptf1a 発現量は次第に減弱することが分かっていたので、遺伝子導入後に細胞分裂とともに発現量が低下することを期待して非増殖型アデノウイルスによる遺伝子導入を行う事、さらに、遺伝子導入後の組織の viability を常時確認できるという3次元組織培養の強みを活かして最適アデノウイルス力価と培養条件の決定を行う方針を固めた。

4. 研究結果:

① 異所性膵組織形成のメカニズムを解明

生体の形態形成は胎生期における極めて正確な body patterning 機構に沿って行われる。ところがヒトではしばしば異所性組織が形成される。Body patterning は homeobox 遺伝子、hedgehog シグナリング、BMP シグナリング、Notch シグナリング等により制御されていることが次第に分かってきた。我々は Notch シグナリングの主要な effector である Hes1 ノックアウトマウスに ptf1a lineage tracing を組み合わせる事により、ヒトでしばしば異所性膵組織が発見される胃前庭部、十二指腸、胆管、Vater 乳頭部に ptf1a の異所性発現があり、それらはすべて膵組織である事を明らかにした。すなわち、Hes1 は胃・十二指腸・胆管において ptf1a を負に制御することにより、細胞外からの膵形成誘導因子 (ptf1a ポジティブレギュレーター) の影響を受けずに本来の臓器への分化を維持していると考えられる。また、発生早期の検討から、十二指腸異所性膵は cdx2 陽性十二指腸前駆細胞からの transcommitment により形成される事が明らかとなった。このことは Notch シグナリングが異なった臓器の前駆細胞間における可塑性を制御すると同時に、細胞の運命決定に重要な遺伝子 (ptf1a) の発現制御を行うことで臓器形成 (膵形成) の場を定めている事を示唆している。

② 胎生期十二指腸組織からの異所性膵組織誘導

上に述べた Hes1 ノックアウトマウスにおいて異所性膵組織が形成された場所は全て、もう一つの膵形成に重要な遺伝子である pdx1 の発現領域内であった。そこで pdx1 陽性胎生期胃・十二指腸に対してアデノウイルスによる ptf1a 遺伝子導入を行い、異所性膵が形成されるか否かを組織培養で観察した。様々なアデノウイルス力価と培養期間による条件で PCR によるマーカー発現を検討した結果、ウイルス力価を低力価 ($1 \sim 10 \times 10^6$ PFU) で感染させると培養開始 4 日目で endogenous ptf1a が発現しはじめ、7 日目でインシュリン産生細胞の誘導に成功した。Endogenous ptf1a の発現は膵前駆細胞を経た分化を示す。組織学的には十二指腸腸管上皮から複数の場所でインシュリン産生細胞が pdx1 陽性細胞と連続して間質へと発芽しており、

正常膵形成と類似した形態を示していた。(しかし、詳細な検討でも胃上皮からは内分泌細胞の誘導は確認されなかった。) 誘導されたインシュリン産生細胞は培養液の糖濃度の変化に反応してインシュリンを分泌し、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ヌードマウスへの移植実験で血糖値を低下させることが確認された。また、この条件ではグルカゴン産生細胞、ソマトスタチン産生細胞も誘導され、内分泌前駆細胞を経た分化誘導であることを示唆している。

一方、高力価の感染では内分泌細胞は誘導されず、外分泌細胞のみが誘導された。低力価感染で、十二指腸のみに内分泌細胞が誘導された事実を重視し、正常膵発生初期の *pdx1* 発現量を胃と十二指腸で比較したところ、十二指腸により多く発現することが判明した。そこで *ptf1a/pdx1* の共遺伝子導入を行った。その結果、4日目の endogenous *ptf1a* の誘導はアデノ *ptf1a* 力価 $1\sim 30\times 10^6$ PFU と、*ptf1a* 単導入の場合より広い範囲でみられた。ところが、実際に7日目にインシュリンが誘導されたのは $10\sim 30\times 10^6$ PFU で、*ptf1a* 単導入の場合よりより高力価にシフトした。実験前に予想していた転写因子発現量による運命決定だけではなく、転写因子発現量比によっても細胞分化の方向性が制御される可能性を示している。

以上、胎児組織にたいする *ptf1a* 遺伝子導入による異所性膵組織の誘導という当初の研究目的は達成され、そこではある一定の *ptf1a* 発現量、*ptf1a/pdx1* 発現量比が重要であると考えられた。

5. 自己評価:

糖尿病に対する根本的な新規治療法として膵再生を考えた場合、必要となる(再生すべき)インシュリン産生細胞の数はそれほど多いものではないことは膵亜全摘術と膵全摘術の予後の違いが端的に証明している。そこで、これまでに得られた発生生物学的解析による知見を基とし、ヒトで実際に見られる異所性膵組織形成をふまえ、腸管に対する“膵決定遺伝子/*ptf1a*”遺伝子導入というアイデアで実験を行った。第一回の領域会議で江口総括から「この研究は必ず成功する。まずは胎児組織に的を絞って始めなさい。」という力強い助言に支えられて研究に着手した。

研究開始後、Notch シグナリングの異常によって下部胆管が膵組織に置き換わるという報告が出た。異所性の膵形成においても *ptf1a* 発現が必ず先行しているはずだと考え、*Hes1* ノックアウトと *ptf1a* lineage tracing を組み合わせたと、胆管のみならず胃前庭部、十二指腸、Vater 乳頭部に異所性 *ptf1a* 発現と膵組織形成を見いだした。これはヒト異所性膵組織形成のメカニズムの一端を示した可能性がある。そこでは異なった臓器の前駆細胞間に Notch シグナリングで制御される“可塑性”が存在することが判明し、少なくとも胎児組織を用いた遺伝子導入による分化誘導は可能であるとの自信を深めた。ところが、実際の実験ではインシュリン産生細胞の誘導の至適条件設定にかなり苦労した。実験前の予想通り、転写因子発現量が細胞分化の方向性を決定することが明らかとなっただけでなく、転写因子発現量比の重要性を示す結果が得られた事は大きな収穫であった。以上、今回の研究で胎児組織を用いた膵組織誘導、糖尿病モデルマウスへの移植実験による血糖低下の確認が出来たことは幸いであった。

その一方で、実際の膵再生医療にむけた成体組織での検討が研究期間内に完了できなかったことが非常に残念である。そこでは胎児組織でみられたような可塑性が存在するか否かが大きな問題となり得る。しかし、自分としてはその点はかなり楽観している。すなわち、ヒトにおける様々な疾患でみられる“組織化生”は、成体組織の可塑性を十分に示していると思われるからである。たとえば、胃や食道組織にみられる腸上皮化生、膵管細胞が腸上皮や胃上皮の性質を獲得する膵管内乳頭状粘液産生腫瘍などはその好例である。今後も転写因子遺伝子導入という方法にこだわらず、これらの疾患の原因となり得る細胞外環境の解析とあわせて異所性膵組織誘導の条件をひとつひとつ同定してゆくというスタンスで幅広く研究を続け

て行きたいと思います。

6. 研究総括の見解:

個体の発生過程で膵臓がいかにして形成され、それに如何なる遺伝子が関与しているかを論理的に考察し、腸管から膵組織を誘導形成させることによって、膵臓障害を克服するための再生医療技術の確立を最終目標とする将来性の高いユニークな研究である。

ptf1 遺伝子の導入による異所性膵組織の誘導形成に真正面から取り組み、異所的な膵組織分化には、ptf1 遺伝子と pdx1 遺伝子の発現量とそれらの量比が重要であることを実証した。この成果を踏まえ、人工的に形成された膵組織を糖尿病モデルマウスに移植し、その有効性を確認することに成功した。さらに、マウス胎児を用いて異所性膵組織を誘導形成させ得ることも明らかにした。このように、臨床応用を目標としながら、基礎的な面でも大きな貢献しており、当初の目的を十分達成し、将来の臨床応用への道を着実に歩みつつある研究として高く評価する。

7. 主な論文等:

- Tulachan S.S., Doi R*, Kawaguchi Y, Tsuji S, Nakajima S, Masui T, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, Kami K, Fujimoto K and Imamura M
All-Trans Retinoic Acid Induces Differentiation of Ducts and Endocrine Cells by Mesenchymal/Epithelial Interactions in Embryonic Pancreas. Diabetes 52: 76-84, 2003
- Koizumi M, Doi R*, Toyoda E, Masui T, Tulachan S.S, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Gittes, G.K and Imamura M
Increased PDX-1 expression is associated with outcome in patients with pancreatic cancer. Surgery 134:260-6, 2003
- Hingorani S.R., Petricoin III E.F., Maitra A, Rajapakse V., King C., Jacobetz M. A., Ross S., Conrads T. P., Veenstra T. D., Hitt B. A., Kawaguchi Y., Johann D., Liotta L.A., Crawford H. C., Putt M. E., Jacks T., Wright C.V.E., Hruban R.H., Lowy A.M and Tuveson D.A.*
Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. Cancer Cell 4:437-49, 2003
- Koizumi M, Doi R*, Toyoda E, Tulachan S.S, Kami K, Mori T, Ito D, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Gittes G.K, and Imamura M.
Hepatic regeneration and enforced PDX-1 expression accelerate transdifferentiation in liver. Surgery 136: 449-57, 2004
- Hoshino M*, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, Watanabe M, Bito H, Terashima T, Wright C.V.E. Kawaguchi Y, Nakao K, Nabeshima Y.
Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. Neuron.47:201-13, 2005
- Koizumi M, Doi R*, Fujimoto K, Ito D, Toyoda E, Mori T, Kami K, Kawaguchi Y, Gittes GK, Imamura M.
Pancreatic epithelial cells can be converted into insulin-producing cells by GLP-1 in conjunction with virus-mediated gene transfer of pdx-1. Surgery.138:125-33 2005
- Fukuda A, Kawaguchi Y*, Furuyama K, Kodama S, Kuhara T, Horiguchi M, Koizumi M, Fujimoto K, Doi R, Wright C.V.E, and Chiba T
Loss of the Major Duodenal Papilla Causes Common Bile Duct Stone Formation in Pdx1 null Mice. Gastroenterology. in press

・Fujitani Y, Fujitani S, Boyer D, Gannon M, Kawaguchi Y, Ray M, Shiota M, Stein R, Magnuson M.A, and Wright CVE*

Targeted deletion of cis-regulatory region for pdx1 reveals dosage responses of foregut differentiation, pancreas organogenesis and function.

Genes & Dev. in press

・Fukuda A, Kawaguchi Y*, Furuyama K, Kodama S, Horiguchi M, Kuhara T, Koizumi M, Boyer D, Fujimoto K, Doi R, Kageyama R, Wright C.V.E, and Chiba T

Notch Pathway Controls Regional Specification of Pancreas in Mouse Endoderm by Regulating Ptf1a Expression. (submitted)

(* : corresponding author)

・川口 義弥

膵、十二指腸分化における転写因子ptf1aの機能 医学のあゆみ 204 : 507-508, 2003

・川口 義弥

膵臓はどのように再生されるのか? 分子消化器病 1 : 43-49, 2004

・川口 義弥、土井隆一郎、河本 泉、藤本 康二、今村 正之

インスリン治療下糖尿病患者の周術期輸液管理 消化器外科 27 : 437-442, 2004

・川口 義弥

内胚葉系の分化に関する最近の動き Frontiers in Gastroenterology. 9 : 62-69, 2004

8. 受賞

第 22 回 Cytoprotection 研究会奨励賞 (平成 17 年 2 月 4 日 京都)

「腹側膵—胆管の発生における Notch signal による分化制御」