

課題番号	LS063
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	成体肝・膵特異的幹細胞機能維持機構の解明とその破綻による疾患モデルの開発
研究機関・ 部局・職名	京都大学・iPS 細胞研究所・教授
氏名	川口義弥

1. 当該年度の研究目的

<p>本研究では①肝臓・膵臓の幹細胞が幹細胞としての働きを果たすのに必要な仕組みを明らかにし、同時に肝臓・膵臓・腸における幹細胞間の互換性を検証する。さらに、②マウスを用いて、幹細胞に遺伝子異常を起こすことによって癌やメタボリック症候群を含む疾患モデルマウスを作製・解析し、病気のメカニズムの理解を深め、新たな治療法開発に必要な基盤的情報を集積することを目標とする。平成23年度の具体的な研究計画は以下の通りであった。</p> <p><b>I. 成体肝膵臓器特異的幹細胞の同定と幹細胞機能維持にかかわるシステムの解析</b></p> <p>① 臓器特異性規定機構の解析</p> <p>1) 腸・肝・膵より分離した Sox9 陽性細胞の単培養や他臓器由来 Sox9 陰性細胞との共培養で挙動変化の有無を検証する。</p> <p>2) 1)で得られた各種臓器由来 Sox9 陽性細胞をヌードマウスの同所・あるいは異所に移植する。移植された Sox9 陽性細胞の lineage を検討し、運命変化の有無を判定する。</p> <p>② 幹細胞機能維持に関わるシステムの解析</p> <p>成体 Sox9 陽性細胞での Hes1, Rbpj, <math>\beta</math> catenin 等を inducible knock-out を行い解析する。</p> <p><b>II. 疾患モデルマウスの開発</b></p> <p>① 膵癌モデルマウスの作成</p> <p>1) Sox9CreER;LSLKrasG12D;LSLp53R172H;ROSA26r 6-8 週令マウスを用いてタモキシフェン誘導性に活性型 Kras と変異体 p53 を発現させ、フェノタイプを観察する。</p> <p>2) 腫瘍が生じれば GFP 陽性癌細胞,陰性癌細胞をそれぞれ in vitro culture での増殖能の比較・およびヌードマウスへの皮下移植実験と自然歴の検討を開始する。</p> <p>② メタボリック症候群モデルマウスの解析</p> <p>膵・筋肉・脂肪組織の詳細な組織学的検討、絶食試験・インスリン負荷試験でのインスリン抵抗性の検討、高脂肪食負荷による病態の変化などを検討し、病態の本質に迫る。</p>
--

2. 研究の実施状況

**I. 成体肝膵臓器特異的幹細胞の同定と幹細胞機能維持にかかわるシステムの解析**

① 臓器特異性規定機構の解析

成体 Sox9-EGFPノックインマウス肝臓由来 Sox9陽性細胞のFACS sortingを行った。培養条件設定に苦労している状況である。移植実験には進めていない。膵臓に関しては候補遺伝子として ptf1aを想定し、成体 Sox9 陽性細胞で ptf1aを不活化したところ、ptf1aが不活化された膵腺房細胞数が減少した。

② 幹細胞機能維持に関わるシステムの解析

成体 Sox9 CreER マウスで Hes1 を不活化するマウスの解析を行った。腸では goblet 細胞への分化、膵臓では腺房細胞への分化が促進された。興味深い事に、この分化促進は長期観察では消失しており、Hes1 以外の分子による Notch シグナリングの再調整を思わせる。

**II. 疾患モデルマウスの開発**

① 膵癌モデルマウスの作成

膵癌形成を予想していたが、意外な事にヒト organoid nevus に酷似した皮膚腫瘍を生じた。そこでヒト organoid nevus 病変部の遺伝子解析を行ったところ、42病変中7病変に KrasG12D,T20A の変異が確認された。マウスは、20週で全てのマウスが死亡したため、膵腫瘍形成は確認されなかった。

② メタボリック症候群モデルマウスの解析

Sox9 陽性細胞において胎生期に prox1 不活化すると生後6ヶ月令で肥満、インスリン感受性低下による耐糖能異常、脂肪肝を呈した。一連のフェノタイプの原因の責任臓器を探索する目的で膵臓特異的 prox1 不活化マウスを作成して比較したところ、膵臓が原因ではないと結論された。電子顕微鏡での検討で褐色脂肪組織のミトコンドリア異常がみられた。成体での prox1 不活化でも基本的に同様のフェノタイプを確認している。

3. 研究発表等

雑誌論文  計 11 件	(掲載済み一査読有り) 計9件 A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer. Kanai M, Yoshimura K, Asada M, Imaizumi A, Suzuki C, Matsumoto S, Nishimura T, Mori Y, Masui T, <u>Kawaguchi Y</u> , Yanagihara K, Yazumi S, Chiba T, Guha S, Aggarwal BB. Cancer Chemother Pharmacol. 68(1):157-642011,2011  Noninvasive Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm with Para-Aortic Lymph Node Metastasis: Report of a Case Nagai K, Doi R, Koizumi M, Masui T, <u>Kawaguchi Y</u> , Yoshizawa A, Uemoto S Surg Today. 41(1):147-52, 2011  Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine Furuyama K, <u>Kawaguchi Y*</u> , Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, Hosokawa S, Elbahrawy A, Soeda T, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi M, Takaori K, Doi R, Nishi E, Kakinoki R, Deng JM, Behringer RR, Nakamura T, Uemoto S Nat Genet. 43(1):34-41, 2011  Thrombotic microangiopathy-like disorder after living-donor liver transplantation: a single-center experience in Japan.Hori T, Kaido T, Oike F, Ogura Y, Ogawa K, Yonekawa Y, Hata K, <u>Kawaguchi Y</u> , Ueda M, Mori A, Segawa H, Yurugi K, Takada Y, Egawa H, Yoshizawa A, Kato T, Saito K, Wang L, Torii M, Chen F, Baine AM, Gardner LB, Uemoto S. World J Gastroenterol. 17(14):1848-57.2011
--------------------	---

様式19 別紙1

	<p>RBP-J promotes the maturation of neuronal progenitors. Komine O, Nagaoka M, Hiraoka Y, Hoshino M, <u>Kawaguchi Y</u>, Pear WS, Tanaka K. Dev Biol. 354(1):44-54.2011</p> <p>The distribution of atypical epithelium in main-duct type intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Ito T, Doi R, Yoshizawa A, Sakikubo M, Nagai K, Kida A, Koizumi M, Masui T, <u>Kawaguchi Y</u>, Manabe T, Uemoto S. J Hepatobiliary Pancreat Sci.; 18 (2): 241-6. 2011</p> <p>A case of progressive digital ischemia after early withdrawal of gemcitabine and S-1 in a patient with systemic sclerosis. Zaima C, Kanai M, Ishikawa S, <u>Kawaguchi Y</u>, Masui T, Mori Y, Nishimura T, Matsumoto S, Yanagihara K, Chiba T, Mimori T. Jpn J Clin Oncol. 41(6):803-6. 2011</p> <p>In vitro generation of insulin-secreting cells from human pancreatic exocrine cells Minami, K, Doi R, <u>Kawaguchi Y</u>, Nukaya D, Hagiwara Y, Noguchi H, Matsumoto S, Seino S J Diabetes Invest. 2(4):271-5. 2011</p> <p>Successful Neoadjuvant Treatment with Radiochemotherapy and Systemic Chemotherapy for the Locally Advanced Pancreatic Head Cancer: Report of a Case Masui T, Doi R, Ogawa K, Kami K, Machimoto T, Seo S, <u>Kawaguchi Y</u>, Egawa H, Matsugu Y, Uemoto S. Hepato- gastroenterology. 58(110):1809-13. 2011</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計1件 Genetic lineage tracing, a powerful tool to investigate the embryonic organogenesis and adult organ maintenance of the pancreas <u>Kawaguchi Y*</u>, Takaori K, Uemoto S J Hepatobiliary Pancreat Sci. 18(1):1-5, 2011</p> <p>(未掲載) 計1件 Delayed gastric emptying improved by straight stomach reconstruction with twisted anastomosis to the jejunum after pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (PPPD) in 118 consecutive patients at a single institution. Masui T, Doi R, <u>Kawaguchi Y</u>, Uemoto S. Surg Today. [Epub ahead of print]</p>
<p>会議発表 計9件</p>	<p>川口義弥発表9件 (専門家向け)</p> <p>“肝臓・膵外分泌・腸管における SOX9 陽性前駆領域からの持続的細胞供給” 第 97 回日本消化器病学会総会 東京、2011 年 5 月 13 日～5 月 15 日 主催：日本分子生物学会</p> <p>“成体腸・肝臓・膵臓の維持機構” 第 21 回大阪若手がんセミナー(FOCS)、大阪、2011 年 7 月</p> <p>“成体肝・膵・腸の維持機構” 第 29 回日本ヒト細胞学会学術集会 富山、2011 年 8 月 20 日～8 月 21 日 主催：日本ヒト細胞学会</p> <p>“Cre/loxP を用いた細胞系譜解析法による臓器発生・成体臓器維持機構の解明” 第 52 回日本組織細胞化学総会学術集会 金沢、2011 年 9 月 24 日～9 月 25 日 主催：日本組織細胞化学会</p>

様式19 別紙1

	<p>“iPS細胞を用いた糖尿病治療法の開発戦略” CiRA Mini-Symposium2011 -iPS細胞、新たなる挑戦- 京都(京大)、2011年11月11日 主催:京都大学 iPS細胞研究所</p> <p>“Genetic lineage tracing を用いた肝・胆・膵・腸管形成と臓器維持構造の解明” 第25回肝類洞壁細胞研究会学術学会 東京、2011年12月17日～12月18日 主催:肝類洞壁細胞研究会</p> <p>“膵外分泌組織・腸における Sox9 陽性前駆細胞領域からの持続的細胞供給” 第34回日本分子生物学会、横浜、2011年12月13日～12月16日 主催:日本分子生物学会</p> <p>“genetic lineage tracing を用いた臓器形成・維持機構の解析 ” 第五回京大病院 iPS細胞・再生医学研究会、京都(京大)、2012年2月3日 主催:京大病院 iPS細胞・再生医科学研究会、武田薬品工業株式会社</p> <p>“膵臓の再生について” iPS細胞産学合同研究会、京都(京大)、2012年3月29日 主催:iPS細胞産学合同研究会</p> <p>専門家向け 計9件 一般向け 計0件</p>
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p><a href="http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/kawaguchi_summary.html">http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/kawaguchi_summary.html</a></p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>[幹細胞って何だ。] 平成23年11月19日 京都(茶論 de 御台) 高校生 12名 理系志望の高校生を対象にES細胞、iPS細胞、組織幹細胞、癌幹細胞などに関して分かりやすく解説した。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	122,000,000	79,200,000	0	42,800,000	0
間接経費	36,600,000	23,760,000	0	12,840,000	0
合計	158,600,000	102,960,000	0	55,640,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	76,864,477	0	0	76,864,477	72,195,367	4,669,110	0
間接経費	23,760,000	0	0	23,760,000	1,034,138	22,725,862	0
合計	100,624,477	0	0	100,624,477	73,229,505	27,394,972	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	63,894,550	凍結マイクローム、培養装置、実験試薬等
旅費	106,420	研究成果発表費(東京、横浜、金沢)等
謝金・人件費等	3,140,728	研究補助員費
その他	5,053,669	マウス飼育管理料等
直接経費計	72,195,367	
間接経費計	1,034,138	
合計	73,229,505	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
研究用保冷库	三洋電機株式会社製 研究用 保冷库 MPR-721	1	596,400	596,400	2011/9/14	京都大学
超低温槽	米国サーモフィッシャーサイエン ティフィック社製 レボ超低温 槽 (Bタイプ) ULT-1186- 3SI	1	1,275,750	1,275,750	2011/9/20	京都大学
多本架冷却速心機	トミー工業株式会社製 多本架 冷却速心機 AX-310	1	1,187,917	1,187,917	2011/9/28	京都大学
微量高速冷却速心機	トミー工業株式会社製 微量高 速冷却速心機 MX-305	2	1,079,925	2,159,850	2011/9/28	京都大学
オートクレーブ	トミー工業株式会社製 オートク レーブ LSX-500	1	580,125	580,125	2011/9/28	京都大学
リサーチ用高性能凍結マイクローム	独逸ライカバイオシステムズ・ヌ スロフ社製 リサーチ用高性能 凍結マイクローム CM3050S IV	1	6,408,150	6,408,150	2011/9/29	京都大学
HERAcell CO2インキュベーター	サーモフィッシャーサイエンティ フィック社製 HERAcell CO2 インキュベーター 150i 5102 6633	4	937,125	3,748,500	2011/10/11	京都大学

クリーンベンチ(片面型)	昭和科学株式会社製 クリーンベンチ(片面型) S-1301PR VU	3	781,515	2,344,545	2011/10/13	京都大学
ステリサイクルCO2インキュベーター	米国サーモフィッシャーサイエンス社製 ステリサイクルCO2インキュベーター 370A	4	847,875	3,391,500	2011/10/27	京都大学
凍結保存容器	米国テラワートン社製 凍結保存容器LS6000	1	693,000	693,000	2011/10/31	京都大学
バイオハザード対策用キャビネット	三洋電機株式会社製 バイオハザード対策用キャビネット(MHE-132AJ)	1	1,411,200	1,411,200	2011/11/7	京都大学
ステリサイクルCO2インキュベーター	米国サーモフィッシャーサイエンス社製 ステリサイクルCO2インキュベーター 370A	2	847,875	1,695,750	2011/11/10	京都大学
超低温槽	米国サーモフィッシャーサイエンス社製 レブコ -86°C超低温槽(縦型) UXF300	1	1,410,150	1,410,150	2012/1/19	京都大学
倒立型ルーペ顕微鏡位相差セット	オリンパス株式会社製 倒立型ルーペ顕微鏡位相差セット チルディング双眼仕様(プリセント) CKX41/CKX-TBI	1	620,392	620,392	2012/2/24	京都大学
超低温槽	米国サーモフィッシャーサイエンス社製 レブコ-86°C超低温槽(縦型) UXF300	1	1,410,150	1,410,150	2012/3/1	京都大学
液体窒素凍結保存容器	テラワートン 液体窒素凍結保存容器LS-6000	1	588,000	588,000	2012/3/8	京都大学