

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25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

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こと、さらに②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25年度は以下の具体的研究目的を設定して研究を進めた。

**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  
Sox9 陽性細胞を含む組織培養系を用い、共培養、移植実験に inducible lineage tracing を組み合わせる手法等を用いて、“周囲環境変化による細胞の運命変化が起こるか否か”を解明する。

② 幹細胞機能維持に関わるシステムの解析  
前年度までの研究で、Sox9 陽性成体膵管細胞において Notch による Sox9 発現制御機構、Sox9 発現量による腺房細胞への分化制御機構が存在すると考えた。論理構成をより明らかにするための周辺データの整備を行なう。

**II. 疾患モデルマウスの開発**

① 癌モデルマウスの作成  
前年度までに行った Sox9CreER;LSLKrasG12D;LSLp53R172H;ROSA26r マウスの解析から、ヒト organoid nevus に酷似した皮膚腫瘍を生じた。その病態を明らかにし、治療モデル実験を加えて論文投稿を目指した。  
一方、当初の目的であった膵癌モデルを新たに作製し、マウス膵癌モデルにおける Pdx1 遺伝子の機能解明を行なう事を目標とした。

② メタボリック症候群モデルマウスの解析  
前年度までに行った Sox9 Cre; prox1 floxed;ROSA26r, Sox9 CreER; prox1 floxed;ROSA26r の解析で、このマウスは肥満、インスリン感受性低下による耐糖能異常、脂肪肝を呈し、メタボリック症候群モデルマウスと見なされた。また、このマウスの褐色細胞組織のミトコンドリア異常を発見した。このマウスで見られたフェノタイプの主因となる臓器を探求する事を目的とした。

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**

③ 臓器特異性規定機構の解析

実験系構築そのものに難渋していたが、Sox9 陽性細胞を含む成体膵、腸を細切し、disperse で軽く消化した後に Matrigel を用いて三次元培養する方法立ち上げにようやく成功しつつあるものの、これまでのところ他臓器由来間質細胞との共培養実験による“周囲環境変化によって細胞の運命変化が起こるか否か”に関する明確な解を得られていない。

② 幹細胞機能維持に関わるシステムの解析

Notch 改変マウスの全膵組織を用いた PCR 解析と細胞数算出の結果から、確かに Notch は細胞レベルで Sox9 発現量を制御していること、更に Hes1 自身と Sox9 発現量の両方が Sox9 陽性膵管細胞の腺房細胞分化能力を規定していることを示した。

また、膵外分泌細胞の可塑性制御において、Ptf1a が腺房細胞維持に必須であり、Ptf1a を失った細胞は、ADM(Acinar to Ductal Metaplasia)と似通った膵管細胞様変化を示す事が分かった。

**II. 疾患モデルマウスの開発**

① 癌モデルマウスの作成

皮膚腫瘍モデルでは最初に発がん変異を起こした細胞が Hedgehog シグナルを介して周囲細胞に異所性 Sox9 発現を引き起こしている事、Hedgehog シグナル阻害薬である cyclopamine 投与でほぼ半数のマウスで腫瘍縮小効果がみられる事を示した。

一方、膵癌モデルとして、Elastase-CreER を用いて成体膵腺房細胞特異的に oncogenic Kras 発現マウスを新たに作製し、同モデルにおける Pdx1 遺伝子の機能解明を続行中。

② メタボリック症候群モデルマウスの解析

成体褐色細胞自身は Sox9 を発現しないため、ミトコンドリア異常の原因はその支配臓器である甲状腺や神経系との臓器相関に由ると想定した。甲状腺ホルモン値は正常であり、Nestin-CreER マウスを用いた成体神経系特異的 Prox1 ノックアウトを試みた。しかし、このマウスは脳室近傍の幹細胞のみに Cre 活性を認め、褐色組織内の神経細胞の Prox1 ノックアウトが不可能であった。現在、胎生期神経系での Prox1 ノックアウトを試みている。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計4件
計8件	<ol style="list-style-type: none"> <li>Temporal identity transition from Purkinje cell progenitors to GABAergic interneuron progenitors in the cerebellum. Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Taya S, Kumai M, Minaki Y, Hamaguchi A, Inoue YU, Inoue T, Miyashita S, Fujiyama T, Yamada M, Chapman H, Campbell K, Magnuson MA, Wright CV, <u>Kawaguchi Y</u>, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M. Nat Commun. 2014 Feb; 5:3337</li> <li>Expression of SOX9 in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Meng F, Takaori K, Ito T, Masui T, Kawaguchi M, <u>Kawaguchi Y</u>, Uemoto S. Pancreas. 2014 Jan;43(1):7-14</li> <li>CAPS1 deficiency perturbs dense-core vesicle trafficking and Golgi structure and reduces presynaptic release probability in the mouse brain. Sadakata T, Kakegawa W, Shinoda Y, Hosono M, Katoh-Semba R, Sekine Y, Sato Y, Tanaka M, Iwasato T, Itohara S, Furuyama K, <u>Kawaguchi Y</u>, Ishizaki Y, Yuzaki M, Furuichi T. J Neurosci. 2013 Oct, 33(44):17326-34.</li> <li>Sox9 and programming of liver and pancreatic progenitors. <u>Kawaguchi Y</u>. J Clin Invest. 2013 May, 123(5):1881-6</li> </ol>

様式19 別紙1

	<p>(未掲載一査読有り) 計4件</p> <p>5. Specification of spatial identities of cerebellar neuron progenitors by <i>ptf1a</i> and <i>atoh1</i> for proper production of GABAergic and glutamatergic neurons. Yamada M1, Seto Y, Taya S, Owa T, Inoue YU, Inoue T, <u>Kawaguchi Y</u>, Nabeshima Y, Hoshino M. J Neurosci. 2014 Apr, 34(14):4786–800</p> <p>6. Comparative outcomes between initially unresectable and recurrent cases of advanced pancreatic cancer following palliative chemotherapy. Xue P, Kanai M, Mori Y, Nishimura T, Uza N, Kodama Y, <u>Kawaguchi Y</u>, Takaori K, Matsumoto S, Uemoto S, Chiba T. Pancreas. 2014 Apr; 43(3):411–6</p> <p>7. Radiotherapy for patients with isolated local recurrence of primary resected pancreatic cancer : Prolonged disease-free interval associated with favorable prognosis. Nakamura A, Itasaka S, Takaori K, <u>Kawaguchi Y</u>, Shibuya K, Yoshimura M, Matsuo Y, Mizowaki T, Uemoto S, Hiraoka M. Strahlenther Onkol. 2014 Apr, 190(5):485–90, Epub 2014 Mar 6</p> <p>8. Neutrophil-to-lymphocyte ratio for predicting palliative chemotherapy outcomes in advanced pancreatic cancer patients. Xue P, Kanai M, Mori Y, Nishimura T, Uza N, Kodama Y, <u>Kawaguchi Y</u>, Takaori K, Matsumoto S, Uemoto S, Chiba T. Cancer Med. 2014 Apr, 3(2):406–15, Epub 2014 Feb 12.</p>
<p>会議発表 計10件</p>	<p>専門家向け 計10件</p> <p>1. 川口義弥、第7回 S-Target 学術講演会「消化器領域における再生医療の展望」、大阪、平成25年8月1日</p> <p>2. 川口義弥、第2回山梨 DM Expert-Meeting「iPS細胞を用いた新規糖尿病治療法開発の展望」、甲府、平成25年9月13日</p> <p>3. 川口義弥、第49回日本赤十字社医学会総会 特別講演 I「多能性幹細胞を用いた糖尿病治療法開発の展望」、和歌山、平成25年10月17-18日</p> <p>4. 川口義弥、「健康長寿社会の実現に向けた疾病の予知・予防・診断・治療技術の俯瞰と産業連関分析への展開～糖尿病を事例として～」、東京、平成25年10月22日、文部科学省 科学技術・学術政策研究所</p> <p>5. 川口義弥、平成25年度洛友会「iPS細胞を用いた新規糖尿病治療法開発の展望」、神戸、平成25年11月9日</p> <p>6. 川口義弥、第13回日本先進糖尿病治療研究会 特別講演「iPS細胞を用いた糖尿病に対する再生医療の展望」、東京、平成25年11月30日</p> <p>7. 川口義弥、Advans 研究会 2013「iPS細胞を用いた新規糖尿病治療法開発の展望」、東京、平成25年12月14日-15日</p> <p>8. 川口義弥、学術情報誌「Islet Equality」座談会「膵β細胞の再生医療と糖尿病治療への応用」、東京、平成26年1月7日</p> <p>9. 川口義弥、「健康長寿社会の実現に向けた課題解決型シナリオプランニング～2型糖尿病を対象として～」、東京、平成26年2月21日、文部科学省 科学技術・学術政策研究所</p> <p>10. 川口義弥、糖尿病治療 UPDATE「iPS細胞を用いた機能的膵島細胞誘導の展望」、東京、平成26年3月14日</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</p> <p>(出願中) 計0件</p>

様式19 別紙1

Webページ (URL)	京 都 大 学 iPS 細 胞 研 究 所 川 口 研 究 室 Web ペ ー ジ : <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>
国民との科学・技術対話の実施状況	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 「iPS細胞を用いた新規糖尿病治療法開発の展望」、平成25年10月28日、東京(六本木ヒルズ)、iPS細胞研究基金寄付者約170名、iPS細胞研究基金寄付者感謝の集いにて糖尿病のメカニズムおよびiPS細胞を用いた糖尿病治療の研究について講演</li> <li>2. 「iPS細胞を用いた新規糖尿病治療法開発の展望」、平成25年12月15日、京都(キャンパスプラザ京都)、ライオンズクラブ会員・京都市民、111名、iPS細胞先端技術講演会にて糖尿病のメカニズムおよびiPS細胞を用いた糖尿病治療の研究について講演</li> <li>3. 「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」、平成26年2月28日-3月1日、東京(ベルサール新宿グランド)、大学・研究機関の研究者、企業関係者、学生、一般、327名、FIRSTシンポジウム「科学技術が拓く2030年へのシナリオ」にて膵管組織の可塑性、皮膚腫瘍のメカニズムを中心に、NEXT研究の成果をポスター発表</li> </ol>
新聞・一般雑誌等掲載 計2件	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 京都新聞、平成26年2月2日1頁「iPSで膵島移植を研究」 (インターネット:<a href="http://www.kyoto-np.co.jp/top/article/20140202000016">http://www.kyoto-np.co.jp/top/article/20140202000016</a>)</li> <li>2. 産経新聞、平成26年2月5日27頁「立体膵島細胞 年内にも」</li> </ol>
その他	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成25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せん

## 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	100,600,000	21,400,000	0	0
間接経費	36,600,000	30,180,000	6,420,000	0	0
合計	158,600,000	130,780,000	27,820,000	0	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	2,980,275	21,400,000	0	24,380,275	24,380,275	0	0
間接経費	19,873,157	6,420,000	0	26,293,157	26,293,157	0	0
合計	22,853,432	27,820,000	0	50,673,432	50,673,432	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	18,114,215	CO2インキュベーター、液体窒素、実験試薬等
旅費	42,920	研究成果発表(愛知、東京)
謝金・人件費等	3,290,273	研究補助員費
その他	2,932,867	マウス飼育管理費、試薬送料等
直接経費計	24,380,275	
間接経費計	26,293,157	
合計	50,673,432	

## 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
ActivinA	Human/Mouse/R at,Recombinant	1	561,750	561,750	2013/7/25	京都大学
米国サーモフィッ シャーサイエンティ フィック社製 CO2 インキュベーター	HERAcell CO 2インキュベータ 150i ステンレス チャンバー	1	1,383,375	1,383,375	2013/10/3	京都大学
				0		