

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24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24年度は以下の目的で研究を進めた。</p> <p>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</p> <p>① 臓器特異性規定機構の解析 臓器特異的な幹細胞維持機構の解明を目的に、膵臓、腸、肝臓由来 Sox9 陽性細胞の FACS sorting を行い、マイクロアレイでの発現パターン解析および in vitro での共培養実験で幹細胞間の互換性を検証する事を目的とした。</p> <p>② 幹細胞機能維持に関わるシステムの解析 Notch 機能解析として Hes1 ノックアウトと Notch-IC 発現によるフェノタイプを観察し、Notch が臓器横断的な幹細胞機能維持に関わるシステムとして機能しているか否かを検証する。</p> <p>II. 疾患モデルマウスの開発</p> <p>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。予想外の展開であるが、幹細胞をターゲットとした発癌遺伝子発現という観点からの皮膚腫瘍フェノタイプの発見は重要であると考え、その病態を明らかにする事を目的とした。</p> <p>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、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。</p>

2. 研究の実施状況

本年度の進捗状況は以下のとおりである。

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/Cre;ROSA26r ノックインマウスからの cell sorting を行っているが、回収細胞数が極端に少なく、なおかつ回収した RNA の質が悪い為に十分な解析が出来ていない。また、FACS sort 後の細胞の viability が悪く、in vitro での培養や異所性移植実験が困難な状況が続いている。

② 幹細胞機能維持に関わるシステムの解析

我々の論文(Furuyama et al. Nat. Genet. 2012)発表後、BAC transgene を用いた Sox9 系譜解析の論文が報告された。両者を比較すると、成体マウスでの Sox9 陽性膵管細胞が腺房細胞に分化できるか出来ないかについての大きな矛盾を来しており、学会で大きな議論を引き起こしている。そこで、本年度はこの相異なる結果に至ったメカニズム解析を行った。結論的には、我々のマウスと BAC transgene マウスの間で、内在性 Sox9 発現量が異なっている(我々のマウスでは CreER をノックインしている為に成体膵、肝で内在性 Sox9 発現量が低下している)事が判明した。そこで、我々のマウスで Notch1C の強制発現を行うと内在性 Sox9 発現量が回復し、腺房細胞分化能力も低下する事が分かった。2つの相異なった報告の原因を探求している間に、図らずも「成体膵管細胞の plasticity は Notch の制御を受ける Sox9 発現量によって規定されている」という成果が出た。また、長期フォローアップの結果、Sox9 陽性細胞で Hes1 を負活化しても膵管細胞からの腺房細胞供給能力は維持される事が分かった。

II. 疾患モデルマウスの開発

① 癌モデルマウスの作成

Sox9CreER;LSLKrasG12D;LSLp53R172H;ROSA26r マウスので生じたヒト organoid nevus 様皮膚腫瘍の中では、最初に Kras 変異を生じた細胞が Hedgehog シグナルを介して周囲の細胞へ働きかけ、異所性 Sox9 発現を引き起こしている事が判明した。上記成体膵管における Sox9 発現量の重要性と合わせて考察すると、細胞の Sox9 発現量の制御自身が治療ターゲットとなり得る事を示している。

② メタボリック症候群モデルマウスの解析

Sox9 Cre; prox1 floxed;ROSA26r、Sox9 CreER; prox1 floxed;ROSA26r で示された、メタボリック症候群様フェノタイプの主因となる臓器を探求する中で、褐色脂肪細胞中の神経組織が lineage label される事、β3アドレナリン受容体発現量が初期には上昇、後期に低下する事が判明した。中枢神経系による褐色脂肪組織機能制御の破綻が原因の可能性を示唆し、現在 Nestin-CreER マウスとの交配を行っている。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計2件
計8件	1. 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. <i>Surgery Today</i> . 42(5):411-6, 2012 2. Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, <u>Kawaguchi Y</u> , Taketo MM, Yonehara S, Chiba T. <i>Nat Genet</i> . 45(1):98-103, 2013

様式19 別紙1

	<p>(掲載済みー査読無し) 計5件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 膵の発生と制御 川口義弥 肝胆膵 65(1): 107-120, 2012 2. Genetic lineage tracing (細胞系譜解析法)を用いた臓器形成・維持機構の解析 川口義弥 組織細胞化学 2012: 131-142, 2012 3. 胆管膵管上皮細胞は肝細胞,膵房細胞の幹細胞か 川口義弥 分子消化器病 9(4): 330-335, 2012 4. Sox9 陽性膵管細胞の多能性 川口義弥 内分泌・糖尿病・代謝内科 36(3):189-195, 2013 5. Notch-Hes シグナルによる膵発生の制御機構 福田晃久、川口義弥 内分泌・糖尿病・代謝内科 36(3):196-203, 2013 <p>(未掲載ー査読有り) 計1件 Sox9 and reprogramming of liver and pancreatic progenitors. <u>Kawaguchi Y*</u> <i>J.Clin.Invest.</i> in press</p>
<p>会議発表 計9件</p>	<p>専門家向け 計9件</p> <p>* 招待講演 8件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 第112回日本外科学会(2012. 4. 12. 千葉) 川口義弥 “成体肝・膵外分泌・腸の維持機構” 2. 第55回日本糖尿病学会(2012. 5. 17. 横浜) 川口義弥 “多能性幹細胞を用いた糖尿病治療法開発の展望” 3. 第19回肝細胞研究会(2012. 6. 29. 札幌) 川口義弥 “肝・膵・腸の形成／維持機構” 4. 第67回日本消化器外科学会(2012. 7. 20. 富山) 川口義弥 “細胞を再び生やす”という観点からの再生医学の展望 5. 第37回組織細胞化学会講習会(2012. 8. 1. 高槻) 川口義弥 “genetic lineage tracing (細胞系譜解析法)を用いた臓器形成・維持機構の解析” 6. 第99回日本消化器病学会(2013. 3. 21. 鹿児島) 川口義弥 “消化器病学領域における再生医療の展望” 7. 第72回米国糖尿病学会(72nd scientific sessions of American Diabetes Association) 2012. 6. 11 Philadelphia Yoshiya Kawaguchi “In vivo plasticity of adult ductal cells” 8. 第9回国際糖尿病連合西太平洋地区会議／第4回アジア糖尿病学会学術集会(9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress/ 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the study of Diabetes) 2012. 11. 26. Kyoto Yoshiya Kawaguchi “Paths to the induction of functional islets from pluripotent cells” <p>* 査読付き学会発表 1件 国際幹細胞学会第10回年次大会(ISSCR 2012)2012. 6. 15 yokohama Yoshiya Kawaguchi “In vitro conversion of gut into pancreatic tissue”</p> <p>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>

様式19 別紙1

Webページ (URL)	http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/kawaguchi_summary.html
国民との科学・技術対話 の実施状況	京都大学アカデミックデイ（平成24年9月2日）で発表した。 題名：「肝臓・膵臓・腸を保つ樹木のような細胞供給のしくみ」 対象者：一般の方 参加者数：650名 内容：Sox9 陽性細胞の lineage tracing 結果の解説
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24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	21,400,000	21,400,000	0
間接経費	36,600,000	23,760,000	6,420,000	6,420,000	0
合計	158,600,000	102,960,000	27,820,000	27,820,000	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	4,669,110	21,400,000	0	26,069,110	23,088,835	2,980,275	0
間接経費	22,725,862	6,420,000	0	29,145,862	9,272,705	19,873,157	0
合計	27,394,972	27,820,000	0	55,214,972	32,361,540	22,853,432	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	14,422,014	倒立型ルーチン顕微鏡、顕微鏡用デジタルカメラ、実験試薬等
旅費	139,780	研究成果発表費(千葉、神奈川、鹿児島)等
謝金・人件費等	3,293,208	研究補助員費
その他	5,233,833	マウス飼育管理費、学会参加費等
直接経費計	23,088,835	
間接経費計	9,272,705	
合計	32,361,540	

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
顕微鏡	オリンパス株式会社製 倒立型ルーチン顕微鏡CKX41N-FL/PHP	1	1,288,980	1,288,980	2013/2/15	京都大学
顕微鏡用デジタルカメラ	株式会社 ニコン社製 顕微鏡用デジタルカメラ Digital Sight DS-Filc-L3標準セット	1	810,600	810,600	2013/2/15	京都大学