

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

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

【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。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している。

【総合評価】

<input type="checkbox"/>	特に優れた成果が得られている
<input type="radio"/>	優れた成果が得られている
<input type="checkbox"/>	一定の成果が得られている
<input type="checkbox"/>	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

総合的な観点から、優れた成果が得られたと判断する。
本研究課題では当初の目的である「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の解明」を達成する前に、成体膵管細胞の可塑性は、Sox9 発現量と、それを制御する Notch シグナルの両方により規定されているという新たな知見が得られた。この研究過程で得られた新知見をもとに、「Sox9-IRES-CreER ノックインマウスと BAC Sox9-CreER トランスジェニックマウスにおける成体膵臓維持機構の違いを明らかにする」ことを新たな目的として研究を遂行し、腺房細胞分化／維持に関わる Ptf1a/Pdx1 機能の解明について知見をえている。また、腫瘍モデルの作製と解析の検討では、Sox9CreER;LSLKrasG12D;LSLp53R172H;ROSA26r マウスは、膵癌を形成せずにヒト organoid nevus 様皮膚腫瘍を形成するという新知見がえられた。細胞の Sox9 発現量の制御自身、あるいは Hedgehog シグナル制御が治療ターゲットとなり得ることが明らかとなった。このように本研究は多くの成果をあげたといえる。

研究実施体制、マネジメントも適切であり、助成金の執行状況は問題ない。知的財産権の出願はない。

② 目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

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・解析が目的であった。研究の過程で海外からの研究結果との整合性の問題が起こり、当初の目的そのものは完全に達成されたとはいえない。しかし目的外の成果が得られたことから、本研究では今後の展開に重要な新知見が得られたと考えられる。

(1) Sox9 発現量と Notch シグナルによる成体膵管細胞可塑性の制御

Sox9-IRES-CreER ノックインマウスと BAC Sox9-CreER トランスジェニックマウスの2つの lineage tracing 結果の違いを説明するものとして、Sox9 発現量に着目した。Real time PCR を用いて Sox9 発現量を検証すると、Sox9-IRES-CreER ノックインマウスでは、出生直後では肝臓／膵臓ともにワイルドタイプマウスと同じであったが、成体期肝臓／膵臓においてはワイルドタイプマウスに比べて Sox9 発現量が低下していることを示した。BAC Sox9-CreER トランスジェニックマウスでの Sox9 発現量はおそらくワイルドタイプマウスと同じと考えられるので、成体期における2つのマウスの腺房細胞分化／肝細胞分化の程度の違いは Sox9 発現量で説明可能と考えられた。そこで、Sox9-IRES-CreER ノックインマウスを用いて Notch シグナルの effector である Hes1 をノックアウトして Notch を不活化すると膵管細胞からの腺房細胞分化が促進され、逆に Notch-IC を強制発現させて Notch シグナルを強めると腺房細胞分化が抑制されると同時に Sox9 発現量が上昇した。すなわち、成体膵管細胞の可塑性は、Sox9 発現量と、それを制御する Notch シグナルの両方によって規定されるという成果がえられた。一方、膵障害に伴う膵管細胞からの内分泌細胞新生の可能性に関し、Hes1 ノックアウトに膵管結紮による膵障害を加えても内分泌細胞分化は起こらないことが明らかとなった。さらに、1年間をかけた長期フォローアップの結果、Hes1 を不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ことが分かった。一方、肝臓に関しては Notch による分化能力制御は明らかでなかった。

(2) 腺房細胞分化／維持に関わる Ptf1a/Pdx1 機能の解明

上記研究成果から、膵管細胞から腺房細胞に分化するステップと腺房細胞自身の維持に関与する因子の同定を試みている。この課題は研究開始当初の計画にはなく、がん化メカニズムとの関連を考え、研究の concept を「胎生期遺伝子群の成体臓器における意義を解明すること」に置いた。その結果、胎生期膵発生で腺房細胞分化に必須の遺伝子 Pdx1 や Ptf1a を Sox9 陽性前駆細胞で不活化しても腺房細胞は分化するが、その後の腺房細胞の維持ができなくなることを明らかとした。

(3) Sox9 陽性細胞の互換性の検証

腸・肝・膵それぞれの Sox9 陽性細胞における臓器特異性の確立、あるいはそれらの互換性を検証することを目的とした。当初の計画では、それぞれの臓器由来 Sox9 陽性細胞を FACS ソートした後に混合培養や移植によって互換性の検討が試みられた

が、ソート後の細胞の viability が極端に悪く、培養条件設定の技術的課題が未解決のまま残った。そこで、成体腸を三次元培養する技術を獲得して研究を続行しているが、これは今後の課題として残されている。

II. 疾患モデルマウスの開発

(1) 腫瘍モデルの作製と解析

Sox9CreER;LSLKrasG12D;LSLp53R172H;ROSA26r マウスは、腭癌を形成せずにヒト organoid nevus 様皮膚腫瘍を形成するという新知見がえられた。これまでこの腫瘍におけるがん遺伝子変異は報告されていなかったが、ヒトサンプルの解析から H-RAS 変異がこの腫瘍の原因と報告されている。しかし、その病態は依然明らかでなく、モデルマウスの作成と解析の意義は大きい。今回作成したモデルマウスは、遺伝子変異導入と同時に lineage tracing で変異細胞の運命を追跡できることにある。その結果、生じた皮膚腫瘍には lineage 陽性と陰性の細胞が混在していることから、最初に Kras 変異を生じた Sox9 陽性毛嚢幹細胞が Hedgehog シグナルを介して周囲の細胞へ働きかけ、皮脂腺や表皮幹細胞に異所性 Sox9 発現を引き起こしていることが判明した。細胞の Sox9 発現量の制御自身、あるいは Hedgehog シグナル制御が治療ターゲットとなり得ることが明らかとなった。

(2) メタボリック症候群マウスの解析

Sox9 陽性細胞選択的に胎生期で Prox1 を不活化する Sox9 Cre; prox1 floxed;ROSA26r マウスおよび成体にて不活化する Sox9 CreER; prox1 floxed;ROSA26r マウスの両方が、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なることが分かった。これらのフェノタイプの主因となる臓器を探求する中で、両マウスの褐色細胞組織のミトコンドリアが極めて低形成になる異常を発見した。Lineage tracing の結果、胎生期不活化マウスにおいては褐色細胞自身はその形成過程で Sox9 を発現しているために Prox1 が不活化されるが、成体期不活化マウスにおいては褐色脂肪細胞中の神経組織が lineage label されること、 β 3 アドレナリン受容体発現量が初期には上昇、後期に低下することを明らかとした。つまり、成体褐色細胞では Sox9 は発現しておらず、褐色細胞自身の Prox1 は正常であるにも関わらず、Sox9 陽性の神経細胞の Prox1 が不活化されたために、二次的に褐色細胞機能低下に至っていると考えられた。つまり、Sox9Cre が多くの臓器に発現しているために、責任臓器の同定を困難にしている状況であるが、むしろ予想外の結果から、これまで分かってこなかった病態が明らかになる可能性が高い。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

成体の肝臓や膵臓の組織維持や臓器特異的幹細胞の存在については長年の課題であった。本研究では、Sox9 発現量による成体膵管細胞の可塑性制御という新たな概念を確立した。成体膵管細胞においても Sox9 発現量、及び Notch シグナルによって細胞の文化能力（可塑性）が制御されていることを示した。このことは、成体臓器維持機構や成体幹細胞研究領域に留まらず、がん研究に波及効果を及ぼすものであろう。

Organoid Nevus は、小児期に見られる比較的頻度の高い皮膚腫瘍である。組織学的には、皮脂腺、毛嚢、表皮の 3 つの皮膚 compartment を含む過誤腫と考えられてきた。今回の研究成果によって Sox9 陽性毛嚢前駆細胞が、hedgehog シグナルの活性化を介して皮脂腺や表皮前駆細胞に異所性 Sox9 発現を引き起こすことが判明した。Sox9 発現量と腫瘍との関係あるいは Hedgehog シグナル制御が及ぼす腫瘍への影響などが一定程度解明されたといえよう。これらの成果は当初の目的外に得られたものであり、意義深いものである。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

組織形成、維持に関与する幹細胞の存在が報告されており、その幹細胞を利用した臓器再生研究は非常に注目されている。本研究の Sox9 は肝臓、膵臓、十二指腸と一連の臓器の幹細胞維持に関与する非常に重要な因子と考えられ、この研究成果が幹細胞研究を進展させることが期待できる。研究で形成が認められた organoid nevus は、前癌病変とも考えられている皮膚腫瘍であるが、これまでその原因は明らかにされていなかった。本研究により organoid nevus の発生過程における Sox9 や Hedgehog シグナルの関与が明らかにされたことにより、今後さらに詳細は腫瘍発生過程の解明につながる可能性がある。

腫瘍発生における Sox9 や Hedgehog シグナルなどの関与が明らかになれば、これらを修飾すべく低分子化合物のスクリーニングなどを介して、新たな悪性新生物に対する創薬につながる可能性がある。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

適切な研究実施マネジメントである。指摘事項に対しても適切に対処している。

研究成果を全国学会、国際学会で積極的に発表しており、その成果の一部は既に論文 (21 件) として掲載されている。会議発表は 29 件、その他新聞などの発表もある。知的財産権の出願はない。

肝臓、膵臓、腸の細胞供給のしくみについて約 650 人の参加者を対象として会が開催されているなど、5 回の講演会が実施された。