

## 膵癌幹細胞と成体幹細胞の相同性

癌幹細胞の解析チーム（課題番号：117010）

研究期間：平成 23 年 7 月 22 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者：小玉正太 研究員：田中俊裕

以前から注目する膵島幹細胞群において、候補となる細胞群は未分化で誘導過程上流の遺伝子群が発現上昇していた。このため、同種同系で由来組織を同じくする腫瘍細胞（NIT-1、2）を抗がん剤による継代培養処理によりクローン化して癌幹細胞群を作成し、候補遺伝子に同様の発現上昇を調べ組織幹細胞と癌幹細胞との相同性を考察した。

### 【研究成果】

膵島幹細胞に関する研究成果から

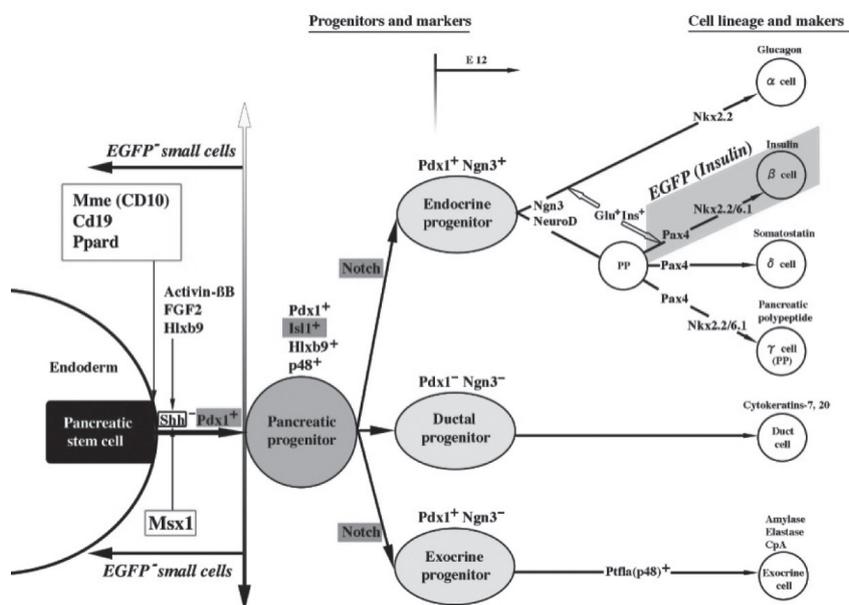
膵島幹細胞に関して、我々は以前より成体内でその候補と成る細胞群を規定してきた。さらに脾臓に由来した幹細胞の候補となる細胞群を、新たに細胞径による物理的な細胞選別と比較検討したところ、同一個体内の膵-脾に類似細胞を同定する事が可能であった。この事は、Insulin-Promoter derived GFP マウスを用いた in vivo の実験より、EGFP negative で Size restricted small cells を尾静脈より host (syngenic recipient mice) に注入し、donor chimera を host 膵臓から検出している。また自然発症糖尿病モデルマウス（NOD）を用いた系では、脾臓に由来する Hox11+CD45- 細胞群に、特定の環境下で膵内分泌細胞系列および膵管細胞系列の起源を認めていた。ただこれらの事象は、キメラ細胞を用いた膵臓内分化後の結果を同定したものであり、直達的な方法で膵臓内の膵島分化誘導を動的に捕捉したものではなかった。そこで以前より脾臓に由

来した幹細胞の候補となる細胞群を、新たに細胞径による物理的な細胞選別と比較検討したところ、同一個体内の膵-脾に類似細胞が存在し同定する事が可能であった。加えてこのプロジェクトに関する共同研究から、iPS 細胞の初期化遺伝子として知られる、Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4、Nanog らが host 脾臓で mRNA レベルとして高発現していた事も明らかとなっている。

癌幹細胞に関する研究から

膵島幹細胞では Msx1、Ppard、Mme、Pdx1 が高発現し、Notch、Isl1 が低発現していたことが明らかと成っているが、同種同系で由来組織を同じくする癌幹細胞に同様の未分化な遺伝子群が発現上昇し相同性を示すかを明らかとする為に、癌幹細胞群を作成した。

NIT-1、2 (ATCC, Manassas, VA) は NOD マウス由



来 insulinoma cell line であるが、この cell line を低量 Mitomycin C 含有培養液で継代培養し、癌幹細胞群をとし候補遺伝子に膵島幹細胞と同様の遺伝子発現上昇を認めるかを調べ、組織幹細胞と癌幹細胞との相同性を考察した。結果は癌幹細胞群に元来の 発癌遺伝子群の発現上昇を認めるのみで、分化上流遺伝子の発現上昇は認めなかった。

膵外分泌細胞からの膵島誘導について

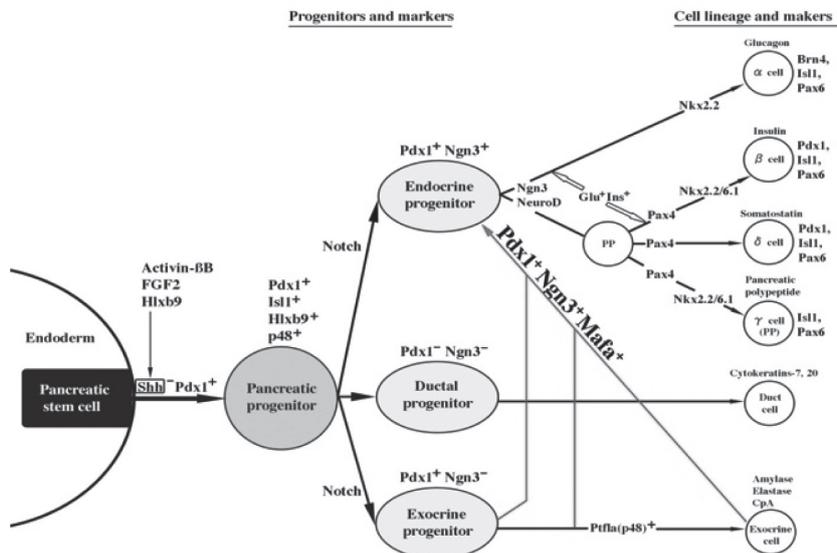
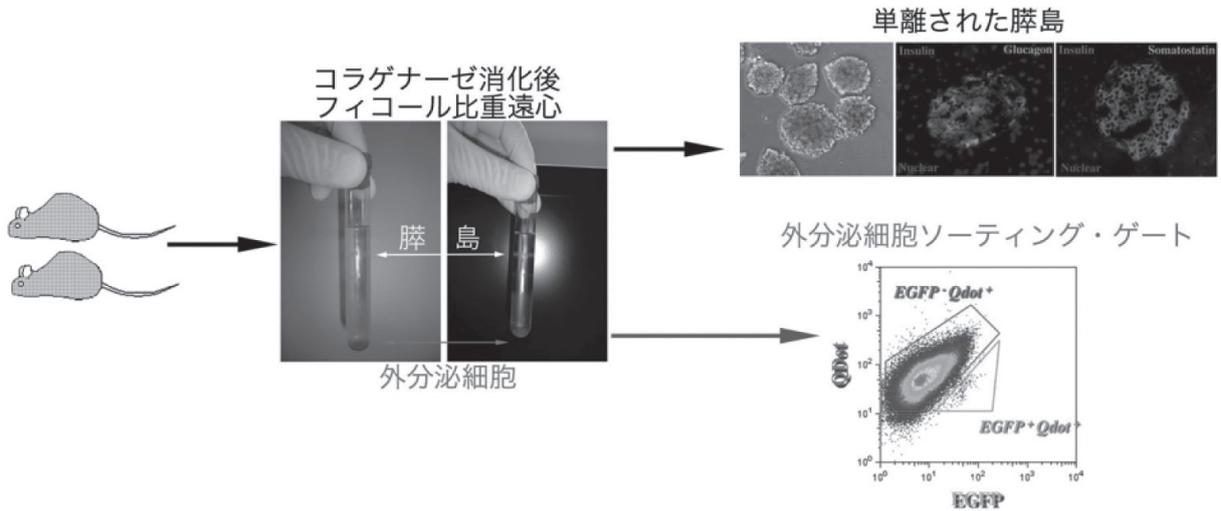
MIP-GFP Transgenic (Tg) マウスから膵島を単離し、膵島細胞と外分泌細胞を比重遠心で選別後、GFP 陽性のβ細胞以外の外分泌細胞は Cell Sorter で GFP 陰性細胞として回収後、リポフェクション法で Pdx1 Ngn3 MafA からの転写遺伝子を導入し、組織工学的手法で機能的膵島を再生した。

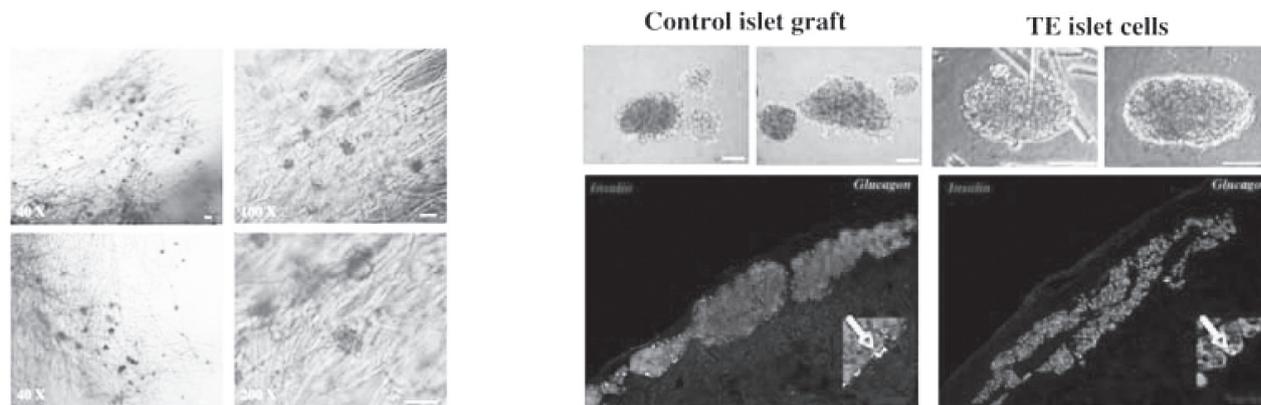
2 匹の MIP-GFP tg より、膵島および外分泌細胞をコラゲナーゼ消化後、フィコール比重遠心法により選別する。外分泌細胞はさらにセル・ソーティングで EGFP-QDot+ 細胞としてした。

結果は膵外分泌細胞から内分泌細胞を、MIP-GFP Tg マウスから EGFP negative sort された細胞に Pdx1 Ngn3 MafA の 3 遺伝子をリポフェクション法で比較的高い効率で遺伝子導入すると、Cyto-histochemistry 上陽性細胞が出現するが、導入されて後 EGFP を発現する細胞は 1% 未満となり、内分泌細胞を誘導する系として今後有効な臨床的な展開を期待する結果とならなかった。

組織工学的手法を用いた膵島再生

MIP-GFP Tg マウスから膵島を単離し、膵島細胞を single cell 化した細胞は、以前報告を行った膵島細胞再編率 30% に対し 68% と改善するも、残念ながら初期値





膵島の 100% を超える事はなかった。しかし、驚くべき事に単位膵島 DNA 当たりのインスリン含有量 (タンパク量) は約 2 倍量存在していた。つぎに糖尿病マウスに、通常血糖正常化する膵島数の半数で、再編された膵島を移植し、改善効果を観察したところ正常血糖化する下限膵島数量 200 個より少ない 100 個で正常化する事が、in vivo の実験により明らかとなった

### 【研究業績】 2011. 04 – 2014. 06

#### Publications (Full articles)

01. IKK $\beta$  Regulates Essential Functions of Vascular Endothelium Through Kinase-Dependent and -Independent Pathways. Ashida N., SenBanerjee S., Kodama S., Foo SY., Coggins M., Spencer J., Zamiri P., Shen D., Li L., Sciuto T., Dvorak A., Gerszten RE., Lin C., Karin M., Rosenzweig A., Nat Commun, 2011, 2: 318.
02. Fetal Hox11 expression patterns predict defective target organs: A novel link between Two-Layered Tissue-Engineered Urethra Using Oral Epithelial and Muscle-Derived Cells. Mikami H., Kuwahara G., Nakamura N., Yamato M., Tanaka M., \*Kodama S. (\*Corresponding Author) J Urol, 2012, 187(5):1882-9. (Cover Issue)
03. Oriented Collagen Scaffolds for Tissue Engineering. Isobe Y., Kosaka T., Kuwahara G., Mikami H., Saku T., \*Kodama S. (\*Corresponding Author) Materials, 2012, 5(3); 501-11. (Cover Issue)
04. Prevention of High-Mobility Group Box 1-Mediated Early Loss of Transplanted Mouse Islets in the Liver by Antithrombin III. Kojima D., Mera T., Nishinakamura H., Itoh T., Ogata T., Matsuoka N., Kodama S., Yasunami Y. Transplantation, 2012, 93(10); 983-8.
05. Mesenchymal Stromal Cells Improve Salivary Function and Reduce Lymphocytic Infiltrates in Mice with Sjögren's-Like Disease. Khalili S., Liu Y., Kornete M, Roescher N.,

Kodama S., Peterson A., Piccirillo CA., Tran SD. PLoS ONE, 2012, 7(6):e38615.

06. Vascular endothelial growth factor-C derived from CD11b+ cells induces therapeutic improvements in a murine model of hind limb ischemia. Kuwahara G., Nishinakamura H., Kojima D., Tashiro T., \*Kodama S. (\*Corresponding Author) J Vasc Surg, 2013, 57(4):1090-9.
07. Pretreatment of donor islets with the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. Mera T., Itoh T., Kita S., Kodama S. Kojima D., Nishinakamura H., Okamoto K., Ohkura M., Nakai J., Iyoda T., Iwamoto T., Matsuda T., Baba A., Omori K., Mullen Y., Ono L., Watari H., Taniguchi M., Yasunami T. Am J Transplant, 2013,13(8): 2154-60.
08. Treating salivary gland hypofunction at both initial and advanced stages of Sjögren's like disease: a comparative study of bone marrow- versus spleen-cell therapy with a one-year monitoring period. Khalili S., Faustman DL, Liu Y., Sumita Y., Blank D., Peterson A., \*Kodama S., \*Tran SD. (\*Corresponding Author.) Cytotherapy, 2014,16: 412-23.
09. Edaravone, a Free Radical Scavenger, Accelerates Wound Healing in Diabetic Mice. Naito R., Nishinakamura H., Watanabe T., Nakayama J., \*Kodama S. (\*Corresponding Author) Wounds, 2014, 26:163-71.
10. HMGB1-mediated early loss of transplanted islets is prevented by anti-IL-6R antibody in mice. Itoh T., Nitta T., Nishinakamura H., Kojima D., Mera T., Ono J., Kodama S., Yasunami Y. Pancreas, 2014, In Press (Manuscript ID: PANCREAS 13541)
11. M-CSF treated F4/80+ BMCs improve murine hind limb ischemia similar to M-CSF differentiated macrophages. Kuwahara G., Nishinakamura H., Kojima D, Tashiro T., \*Kodama S.

(\*Corresponding author)

PLOS ONE, 2014, 9(9):e106987 (DOI: 10.1371/journal.pone.0106987)

### *Presentations*

12. Two-layered tissue-engineered urethra using oral epithelial and muscle-derived cells.

Mikami H., Kuwahara G., Nakamura N., Yamato M., Tanaka M., \*Kodama S. (\*Correspondence) Symposium presentation, Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (TERMIS) – EU, (Granada, Spain) 2011, June 7-10

13. Vascular endothelial growth factor-C derived from CD11b positive macrophages

induces therapeutic improvements in a murine model of hind limb ischemia. Kuwahara G., Nishinakamura H., Kojima D., Tashiro T., \*Kodama S. (\*Correspondence) The 2012 Vascular Annual Meeting presented by Society for Vascular Surgery, (Washington DC, MD) 2012, June 7-9

14. M1 macrophages induce therapeutic improvements in a murine model of hind limb ischemia similar to M2 macrophages. Nishinakamura, H., Kuwahara, G., Kojima, D., Tashiro, T., \*Kodama S. - Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (TERMIS) – EU, (Genova, Italian Republic) 2014, June 10-13