

分担研究者 浅島 誠 東京大学大学院総合文化研究科教授

研究要旨 昨年度行った高純度な膵臓組織を高効率で誘導する系を用い、マイクロアレイ解析によって遺伝子スクリーニングを行った。その結果、膵臓組織を含む前方内胚葉で特異的に発現する新規遺伝子を新たに同定することができた。

#### A. 研究目的

現在、幹細胞を用いた再生医療が提唱され、世界中で研究が行われている。糖尿病をはじめとする膵臓疾患の治療目的のためにも、こうした再生医療が重要な手段となると考えられる。ただ、内胚葉が膵臓や肝臓に分化して行く過程は非常に複雑であり、また異なる細胞間の相互作用が起こっていると考えられている。将来的に医療への応用を考えた場合、器官誘導系の確立に直接有用だけでなく、安全性確保の上でも、複雑な細胞分化のメカニズムを包括的に理解することが重要になってくると思われる。

我々は、ツメガエルの未分化細胞塊であるアニマルキャップを、胚葉誘導活性を持つアクチビンで処理することによって、心臓・腎臓などを始め様々な器官・組織を誘導する系を確立してきた。膵臓の誘導系に関しては、アクチビンに加えてビタミンA誘導体として知られるレチノイン酸を用いることによって膵臓を誘

導するという独自の系を確立した。この誘導系を用い、ディファレンシャルスクリーニング法あるいはマイクロアレイ解析によって膵臓形成に関わる遺伝子の単離を行い、膵臓分化メカニズムの解明を目指すことを目的にした。更に、昨年度は、より高効率な膵臓誘導を目指し、いくつかの誘導因子の処理・及び微量注入によって膵臓組織を誘導する新たな誘導系を確立した。

本年度は、新たに得られた膵臓誘導系を用い、マイクロアレイ解析によって新規膵臓誘導関連因子を単離し、機能解析を行うことを目標とした。

#### B. 研究方法

##### 1. 新規膵臓誘導系による膵臓組織の誘導

昨年度に報告したとおり、改良型の膵臓組織誘導系として、以下の通り行った。

① まず、ツメガエルの初期胚（4細胞期）

内胚葉化



内胚葉化  
側方化  
前方化



図1 内胚葉化・側方化・前方化することによって増加した膵臓領域。膵臓マーカーPdx1の発現をin situハイブリダイゼーションによって確認している。

に、アクチビンと同じTGF-betaスーパーファミリーに属する中胚葉誘導因子であるXnr-5をマイクロインジェクターを用いて微量注入した。これにより、初期胚に中内胚葉領域が拡大する。

②次に、背側領域を拡大させる目的で、中期胞胚期においてXnr5注入胚を塩化リチウムで処理した。塩化リチウムは、ツメガエル初期胚で背側決定に関与することが知られているWnt経路の抑制因子であるglycogen synthase kinase (GSK)3betaの機能を阻害することにより、初期胚の超背側化を引き起こすことが知られている。

③さらに、レチノイン酸処理をXnr5注入

-塩化リチウム処理胚に施した。これにより、胚は後方化が引き起こされ、結果として膵臓領域を含む部分の大幅な拡大を実現した(図1)。

膵臓領域のマーカーとしては、主にPdx-1遺伝子を用い、in situハイブリダイゼーションによって発現領域を同定することによってモニターした。

## 2. マイクロアレイ解析による新規膵臓関連因子の同定

1. によって誘導した膵臓組織は、尾芽胚期相当(ステージ24)まで培養した後、total RNAを抽出した。また、ネガティブコントロールとして非誘導条件(未処理胚)由来のtotal RNAも同様に抽出した。これらを用い、アジレントテクノロジー社製のマイクロアレイ解析装置で解析を行うためのターゲットRNA作成を行った。具体的には、total RNAを用いてcDNA合成を行った後、さらにCy3, Cy5標識されたターゲットRNAを合成した。これらを用い、ツメガエル44Kデザインアレイ(アジレント社製、当研究室にてデザインされたもの)に対して遺伝子発現の増減を測定した。

## C. 研究結果

(1) 改良した膵臓誘導系の遺伝子レベルでの検証

Marker gene	pc/no
GATA4	8.6
GATA5	4.3
GATA6	8.9
HNF1 $\alpha$	4.5
HNF1 $\beta$	5.2
HNF3 $\alpha$	2.6
HNF3 $\beta$	3.8
HNF4 $\beta$	2.8
Prox1	2.9
LRH1	3.4
Apolipoprotein A1	27.5
FABP2	23.5

**図2. 各前方内胚葉マーカーの発現量比較。数字は非誘導条件に対する膵臓誘導条件での発現量比を示す。**

期胚について、実際に膵臓特異的に発現する遺伝子の発現量増加が見られるかどうかマイクロアレイによって解析した。その結果、GATA4-6、HNF-1, 3, 4 など、膵臓を含む前方内胚葉で発現する遺伝子の発現量の大幅な増加が見られた (図2)。これらの結果は、in situ ハイブリダイゼーションで検証した Pdx-1 だけでなく

他の遺伝子についても実際に発現量を上昇していることを示しており、改良誘導系によって膵臓領域の拡大が効率よく起こっていることを示唆している。

## (2) 膵臓誘導条件で増加する新規遺伝子の同定

次に、非誘導条件と比較して誘導条件で2倍以上 mRNA の存在量が多い遺伝子群の抽出を行った。その結果、約 22000 遺伝子の中から、約 550 個の該当する遺伝子を同定した。これらについて、遺伝子の空間的な発現パターンを知るために whole-mount in situ ハイブリダイゼーションを行った。その結果、すべてではないが、一部の遺伝子について膵臓を含む前方内胚葉で特異的に発現するものが存在した (図3)。

## D. 考察

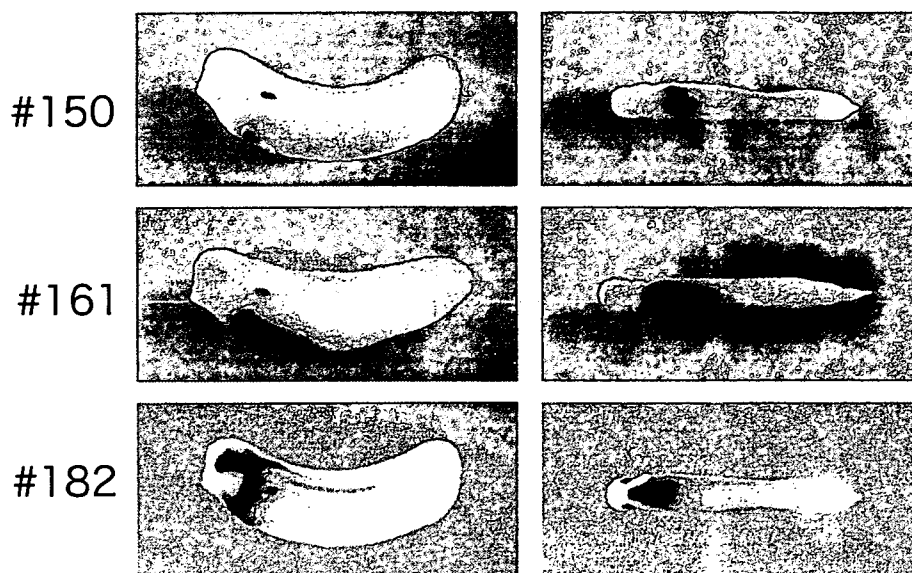


図3 同定した新規因子の一例。膵臓を含む前方内胚葉で特異的に発現する。

をより多く単離できる可能性は期待でき  
これは今後の検討課題である。

#### E. 結論

本年度は、前年度に系の改良を行った新規膵臓組織誘導系を用い、膵臓で発現する遺伝子の同定を行った。その結果、新たに膵臓を含む前方内胚葉で発現する新規因子を複数同定することができた。今後は、この因子に関しても機能解析等を行い、応用研究に適用できるかどうかについての検討を継続する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Suzawa K, Yukita A, Hayata T, Goto T, Danno H, Michiue T, Cho KW, Asashima M. Int J Dev Biol. 51(3):183-90. 2007

2. Sugimoto K, Okabayashi K, Sedohara A, Hayata T, Asashima M. Dev Neurosci. 29(6):468-79. 2007

##### 2. 学会発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakanishi M, Hamazaki TS, Komazaki S, Okochi H, Asashima M.	Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells in vitro.	Differentiation	75	001-11	2007
Tsuchiya M, Yoshida T, Taniguchi S, Yasuda K, Maeda A, Hayashi A, Tanaka J, Shigemoto M, Nitta K, Tsuchiya K.	In vivo suppression of mafA mRNA with siRNA and analysis of the resulting alteration of the gene expression profile in mouse pancreas by the microarray method.	Biochem Biophys Res Commun.	356 (1)	129-135	2007
Ohara-Imaizumi M, Fujiwara T, Nakamichi Y, Okamura T, Akimoto Y, Kawai J, Matsushima S, Kawakami H, Watanabe T, Akagawa K, Nagamatsu S.	Imaging analysis reveals mechanistic differences between first and second phase insulin exocytosis.	J Cell Biol	177	695-705	2007
Kaburagi Y, Okochi H, Satoh S, Yamashita R, Hamada K, Ikari K, Yamamoto-Honda R, Terauchi Y, Yasuda K, Noda M.	Role of IRS and PHIP on insulin-induced tyrosine phosphorylation and distribution of IRS proteins.	Cell Struct Function	32	69-78	2007
Ito Y, Hamazaki TS, Ohnuma K, Tamaki K, Asashima M, Okochi H.	Isolation of murine hair-inducing cells using the cell surface marker prominin-1/CD133.	J Invest Dermatol	127	1052-60	2007
Banas A, Tokuhara M, Okochi H, Ochiya T.	Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes.	Hepatology	46	219-228	2007
Kuwano Y, Fujimoto M, Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Komine M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H.	The involvement of Gab1 and PI 3-kinase in beta1 integrin signaling in keratinocytes.	Biochem Biophys Res Commun.	361 (1)	224-229	2007
Osada A, Iwabuchi T, Kishimoto J, Hamazaki TS, Okochi H.	Long-term culture of mouse vibrissal dermal papilla cells and de novo hair follicle induction.	Tissue Eng	13 (5)	975-982	2007
Nakahara M, Saeki K, Yogiashi Y, Kimura A, Horiuchi A, Nakamura N, Yoneda A, Saeki K, Matsuyama S, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Kaburagi Y, Yuo A.	The protein expression profile of cynomolgus monkey embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases.	J Electrophoresis	51	1-8	2007
Miura S, Kawanaka K, Kai Y, Tamura M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Ezaki O.	An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ ) mRNA in response to exercise is mediated by $\beta$ -adrenergic receptor activation.	Endocrinology	148 (7)	3441-48	2007
Yamazaki T, Nakamori A, Sasaki E, Wada S, Ezaki O.	Fish oil prevents sucrose-induced fatty liver but exacerbates high-safflower oil-induced fatty liver in ddymice.	Hepatology	46 (6)	1779-1790	2007
Tsuboyama-Kasaoka N, Sano K, Shozawa C, Osaka T, Ezaki O.	Studies of UCP2-transgenic and-knockout mice reveal that liver UCP2 is not essential for the anti-obesity effects of fish oil.	Am J Physiol Endocrinol Metab	294 (3)	E600-606	2008

Kamei Y, Miura S, Suganami T, Akaike F, Kanai S, Sugita S, Katsumata A, Aburatani H, Unterman TG, Ezaki O, Ogawa Y.	Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle : role of RXR / LXR and FOXO1.	Endocrinology		in press	
Suzawa K, Yukita A, Hayata T, Goto T, Danno H, Michiue T, Cho KW, Asashima M.	Xenopus glucose transporter 1 (xGLUT1) is required for gastrulation movement in Xenopus laevis.	Int J Dev Biol	51 (3)	183-90	2007
Sugimoto K, Okabayashi K, Sedohara A, Hayata T, Asashima M.	The role of XBTg2 in Xenopus neural development.	Dev Neurosci	29 (6)	468-79	2007
Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Yasuda K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M.	Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects.	J Hum Genet	53 (2)	174-180	2008