

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-241703

(P2008-241703A)

(43) 公開日 平成20年10月9日(2008.10.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO1N 33/574 (2006.01)</b>	GO1N 33/574	A 4B063
<b>C12N 5/06 (2006.01)</b>	C12N 5/00	E 4B065
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2008-45507 (P2008-45507)	(71) 出願人	504159235 国立大学法人 熊本大学 熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号
(22) 出願日	平成20年2月27日 (2008.2.27)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(31) 優先権主張番号	特願2007-49374 (P2007-49374)	(72) 発明者	糸 昭苑 熊本県熊本市本荘2丁目2番1号 国立大 学法人熊本大学内
(32) 優先日	平成19年2月28日 (2007.2.28)	(72) 発明者	吉田 哲 熊本県熊本市本荘2丁目2番1号 国立大 学法人熊本大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	白木 伸明 熊本県熊本市本荘2丁目2番1号 国立大 学法人熊本大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌の検出方法

(57) 【要約】

【課題】膵臓幹細胞のマーカー分子を同定し、それを利用した膵臓幹細胞を検出する方法及び膵臓幹細胞を分離する方法を提供すること。

【解決手段】エピプラキン1 (EPPK1) 遺伝子の発現を検出することを含む、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌を検出する方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

エピブラキン1 (EPPK1) 遺伝子の発現を検出することを含む、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌を検出する方法。

## 【請求項 2】

対象細胞におけるエピブラキン1 (EPPK1) 遺伝子の発現を検出し、エピブラキン1 (EPPK1) を発現している細胞を膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌として同定することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

エピブラキン1 (EPPK1) に対する抗体を用いてエピブラキン1 (EPPK1) 遺伝子の発現を検出する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

エピブラキン1 (EPPK1) 遺伝子を発現する細胞を選択することを含む、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を分離する方法。

## 【請求項 5】

( a ) 膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を含む細胞試料を調製する工程、( b ) 該細胞試料にエピブラキン1 (EPPK1) に対する抗体を添加する工程、及び( c ) 該抗体が結合した細胞を分離する工程を含む、請求項 4 に記載の膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を分離する方法。

## 【請求項 6】

エピブラキン1 (EPPK1) に対する抗体を含む、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を検出又は分離するための試薬。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌の検出及び分離方法に関する。より詳細には、本発明は、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌の新規マーカー分子の発現を指標とした膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌の検出及び分離方法に関する。

## 【背景技術】

30

## 【0002】

組織幹細胞は、自己再生能および特定組織の成熟細胞への多分化能を有する細胞と定義されている(非特許文献1)。組織幹細胞の同定は膵臓の発生及び再生の研究における重要な課題である。この課題を解決するためには、幹細胞で特異的または選択的に発現している「マーカー分子」を見いだすことが特に重要である。

## 【0003】

組織幹細胞に関する情報は、造血幹細胞の研究から最も多く得られる。side-population subsetとCD34-、cKit+、Sca1+、Lin-というマーカー分子の組み合わせで定義される1個の細胞を移植することによってマウスの血液系が再構成され得ることが報告された。神経系では、ニューロンは著しい自己修復能や再生能は持たないと長年にわたり信じられてきた。しかし、Nestin、Musashi1などの神経幹細胞マーカーの発見は、自己再生する神経幹/前駆細胞がマウス、ラットおよびヒトの成体脳の脳室帯と海馬に存在することの証明において重要な役割を果たした。また、虚血傷害を受けたマウスの脳室内に増殖因子を投与すると、内因性の前駆細胞の増殖が促進されて神経細胞が再生することによって症状の回復が促される可能性がある。したがって、組織幹細胞の同定により再生医療の新たな戦略デザインが可能となる。

40

## 【0004】

成体の膵臓に幹/前駆細胞が存在することが示唆されている。インスリンを産生する細胞は定期的にターンオーバーされて、新しい細胞が生成されるが、これは細胞の量を維持するために不可欠である。再生機序を研究して再生医療に応用するためには、これ

50

らの細胞の由来を同定することが特に重要である。

【 0 0 0 5 】

胎児膵臓では、Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox gene 1 : 膵臓および十二指腸のホメオボックス遺伝子 1 ) が膵前駆細胞のマーカー分子として既知である。(非特許文献 1 及び 2 )。胎児のPdx1発現細胞は、内分泌細胞、外分泌細胞および膵管細胞に分化して、成体膵に存在するあらゆる種類の細胞を生じる(非特許文献 3 及び 4 )。しかし、Pdx1は出生後の膵臓のインスリンを産生する細胞でも発現しているので(非特許文献 5 及び 6 )、Pdx1は、成体膵前駆細胞の特異的なマーカー分子とは言えない。部分膵切除した膵臓(非特許文献 7 )、化学物質の投与により誘発した急性膵炎(非特許文献 8 )、または、分化細胞が培養した増殖前駆細胞に由来すると推定されるex vivo培養系(非特許文献 9 及び 1 0 )などの再生マウスモデルの増殖細胞を検討することにより、幹/前駆細胞であると推定される細胞が成体膵に存在するという一連のエビデンスが示されてきた。膵臓に軽度な損傷または障害のある生理的条件下で膵再生が起こる実験系が存在しないので、結果の解釈はさらに困難である。従って、成体膵で細胞を生じる幹/前駆細胞が確かに存在するか、または細胞の増殖が細胞増加の唯一の機序であるかについては、未だに一定の見解が得られていない(非特許文献 1 1 及び 1 2 )。

10

【 0 0 0 6 】

【非特許文献 1】Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H: Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371:606-9, 1994

【非特許文献 2】Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV: PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 22:983-95, 1996

20

【非特許文献 3】Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV, Teitelman G: Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 121:11-8, 1995

【非特許文献 4】Gu G, Dubauskaite J, Melton DA: Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129:2447-57, 2002

【非特許文献 5】Edlund H: Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 3:524-32, 2002

30

【非特許文献 6】Kume S: The molecular basis and prospects in pancreatic development. *Dev Growth Differ* 47:367-74, 2005

【非特許文献 7】Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE: A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42:1715-20, 1993

【非特許文献 8】Jensen JN, Cameron E, Garay MV, Starkey TW, Gianani R, Jensen J: Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 128:728-41, 2005

【非特許文献 9】Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil J: In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7999-8004, 2000

40

【非特許文献 1 0】Gershengorn MC, Hardikar AA, Wei C, Geras-Raaka E, Marcus-Samuels B, Raaka BM: Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* 306:2261-4, 2004

【非特許文献 1 1】Bonner-Weir S, Sharma A: Are there pancreatic progenitor cells from which new islets form after birth? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2:240-1, 2006

【非特許文献 1 2】Dor Y: beta-Cell proliferation is the major source of new pancreatic beta cells. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2:242-3, 2006

50

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

本発明は、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌のマーカー分子を同定し、それを利用した膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌を検出する方法及び膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を分離する方法を提供することを解決すべき課題とした。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

本発明者らは、膵幹/前駆細胞の分子マーカーとしてエピブラキン1 (EPPK1) という分子に注目した。胎児および成体の膵臓でのEPPK1の発現パターンから、EPPK1は胎児のPdx1発現膵前駆細胞、胎仔のNgn3陽性内分泌前駆細胞および未成熟な外分泌細胞、ならびに成体の膵管細胞、特に腺房中心細胞で強く認められることが示された。本発明者らは、軽度の膵再生を示すマウスの20%膵切除モデルを確立した。膵切除後の再生期にEPPK1発現膵管細胞が増加し、外分泌細胞に分化した。また、化生によって内分泌細胞と外分泌細胞の両方に分化する幹/前駆細胞であると以前に報告された「duct in foci (病巣の膵管)」細胞でもEPPK1は発現していた。上記の結果より、EPPK1は膵幹細胞のマーカー分子であることが実証された。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

## 【0009】

即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) エピブラキン1 (EPPK1) 遺伝子の発現を検出することを含む、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌を検出する方法。

(2) 対象細胞におけるエピブラキン1 (EPPK1) 遺伝子の発現を検出し、エピブラキン1 (EPPK1) を発現している細胞を膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌として同定することを特徴とする、(1)に記載の方法。

(3) エピブラキン1 (EPPK1) に対する抗体を用いてエピブラキン1 (EPPK1) 遺伝子の発現を検出する、(1)又は(2)に記載の方法。

## 【0010】

(4) エピブラキン1 (EPPK1) 遺伝子を発現する細胞を選択することを含む、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を分離する方法。

(5) (a)膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を含む細胞試料を調製する工程、(b)該細胞試料にエピブラキン1 (EPPK1) に対する抗体を添加する工程、及び(c)該抗体が結合した細胞を分離する工程を含む、(4)に記載の膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を分離する方法。

(6) エピブラキン1 (EPPK1) に対する抗体を含む、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を検出又は分離するための試薬。

## 【発明の効果】

## 【0011】

本発明により、エピブラキン1は再生時に誘導され、組織内での局在パターンが幹細胞マーカー遺伝子としての定義を満たしていることが見出された。すなわち、エピブラキン1は膵臓の初期発生においては、胎仔の膵臓前駆細胞のマーカーであるPdx1遺伝子に先立ち発現する。また再生膵のモデルである膵切除マウスでは、増生する中心外分泌細胞、そして、膵島では細胞、また細胞から脱分化した細胞の幹細胞と認められる細胞にも発現することが認められた。これらの結果により、エピブラキン1が膵幹細胞マーカーであることが実証された。ヒトなどの発生によって形成される臓器では体性幹細胞が少数ではあるが、存在していると考えられている。こういった体性幹細胞が膵臓においても存在することが報告されている。膵臓の幹細胞を同定し、それについての研究を進めることができれば、幹細胞の賦活化の際の指標、あるいは幹細胞を分離する際の指標として用いることができるので、幹細胞を用いた再生医学、あるいは創薬において広範囲な応用が考えられる。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0012】

以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

本発明による膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌を検出する方法においては、エピブラキン1 (EPPK1) 遺伝子の発現を指標とする。EPPK1はブラキンファミリーに属する遺伝子であり、形質膜関連の接着ジャンクションで細胞骨格線維とアンカータンパク質を互いに結合させる (Jefferson JJ, Leung CL, Liem RK: Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:542-53, 2004 ; 及びRoper K, Gregory SL, Brown NH. The 'spectraplakins': cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families. *J Cell Sci* 115:4215-25, 2002)。EPPK1は当初、皮膚細胞で発現する遺伝子として、また水疱症を引き起こす自己抗原としてクローニングされたが、内胚葉に由来するさまざまな臓器でも発現していることが後になって明らかにされた (Fujiwara S, Takeo N, Otani Y, Parry DA, Kunimatsu M, Lu R, Sasaki M, Matsuo N, Khaleduzzaman M, Yoshioka H: Epiplakin, a novel member of the Plakin family originally identified as a 450-kDa human epidermal autoantigen. Structure and tissue localization. *J Biol Chem* 276:13340-7, 2001)。EPPK1は成体膵でも発現していることが報告されたが (Spazierer D, Fuchs P, Prohl V, Janda L, Oehler S, Fischer I, Hauptmann R, Wiche G: Epiplakin gene analysis in mouse reveals a single exon encoding a 725-kDa protein with expression restricted to epithelial tissues. *J Biol Chem*. 278:31657-66, 2003)、EPPK1が発現している細胞の種類や胎児膵前駆細胞でのEPPK1発現の有無は不明である。

## 【0013】

EPPK1の発現パターンを図8に要約する。E10.5の段階では、膵上皮細胞のほとんどがEPPK1、Pdx1ダブル陽性膵前駆細胞であった (図2A~C、図8)。E15.5ではEPPK1は外分泌細胞および内分泌前駆細胞で認められたが、いずれの前駆細胞でもPdx1の発現はもはやみられなかった (図2、図8)。Pdx1はE9~10の膵前駆細胞で発現していたが、外分泌細胞および内分泌細胞ではいったん発現が消失し、その後、成熟した (細胞では再び発現がみられた (図8))。細胞は最終分化した細胞なので、Pdx1は本当の意味では膵前駆細胞マーカーとはみなされない。一方EPPK1は、E10.5のPdx1陽性膵前駆細胞、E15.5のNgn3陽性外分泌前駆細胞およびアミラーゼ陽性内分泌前駆細胞など、あらゆる種類の胎児前駆細胞で認められた。生後マウスの膵臓では、EPPK1は腺房中心細胞などの膵管細胞で主に発現しており (図3、図8)、腺房細胞や膵島では発現していなかった。これらの細胞が膵臓のターンオーバーに関与するかを検討するため、膵切除を行った (図4)。20%膵切除により、病巣領域だけでなく遠位部での再生過程の観察も可能であった。一方、90%または70%膵切除では、残存膵のほとんどが生理的条件での再生とは異なる経路を経て病巣領域に変化した。BudU標識実験からは、同程度の増殖が病巣領域だけでなく遠位部でも起こることが明らかになった。EPPK1、Hes1ダブル陽性腺房中心細胞を詳細に調べたところ、これらの細胞はBrdUを取り込んだ後、アミラーゼおよびEPPK1陽性の分化途中の細胞を経て、アミラーゼ発現細胞を生じることが明らかになった。以上のデータは、EPPK1発現腺房中心細胞は増殖能が高い腺房前駆細胞であることを強く示唆する (図5、図6、図8)。以上より、腺房中心細胞でのHes1の発現からNotchシグナル伝達が腺房細胞の再生過程を制御している可能性があることが示された。膵切除、膵炎、IFN トランスジェニックマウスなど、膵臓に傷害があるときに「focal region (病巣領域)」という化生領域に出現する「duct in foci (病巣の膵管)」と呼ばれる膵管細胞では他の再生経路が働くという報告がいくつか存在する。傷害直後に、サイトケラチン陽性の病巣の膵管の細胞が病巣領域に出現した。これらの細胞は膵管細胞、外分泌細胞または腺房中心細胞に由来する可能性がある (図8)。その後、Pdx1陽性細胞が出現した。データを裏付ける細胞系譜追跡実験はまだ実施されていないが、このPdx1陽性細胞は (細胞、 (細胞、外分泌細胞に分化する再生の幹/前駆細胞であると考えられる (図8))。本明細書の実施例における免疫組織化学的分析により、EPPK1はPdx1の発現に先立ち病巣部の膵管で発現し、それ以後は病巣領域

10

20

30

40

50

でPdx1と共発現していることが明らかになった(図7、図8)。

【0014】

以上より、EPPK1は、胎生期と成体期の膵臓で、幹/前駆細胞であると考えられるあらゆる種類の細胞で発現していることが判明した。EPPK1発現細胞の増殖は、急性の膵病変または腺房細胞の再生に伴って増加する。上記の通り、EPPK1は膵幹/前駆細胞のマーカーとしての基準を満たすものである。

【0015】

本発明における「EPPK1」は、特にその由来を記載しない限り、脊椎動物由来であり、好ましくは哺乳動物由来である。例えばヒトEPPK1遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列は、DNA: NM 031308.1、アミノ酸: NP 112598に示されており、ラットEPPK1遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列は、DNA: XM 001074770、アミノ酸: XP 001074770、DNA: XM 001059215、アミノ酸: XP 001059215(両方ともGenes similar to Epiplakinとして登録されている。これら2つの遺伝子は同一のものと思われる)に示されており、マウスEPPK1遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列は、DNA: NM 144848.2、アミノ酸: NP 659097に示されている。

10

【0016】

本発明におけるEPPK1遺伝子としては、例えば(a)上記に示したEPPK1蛋白質をコードする塩基配列を含む核酸、(b)EPPK1蛋白質において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、および/または付加したアミノ酸配列をコードする核酸、(c)EPPK1蛋白質をコードする塩基配列と60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有する塩基配列を含む核酸、(d)EPPK1蛋白質のアミノ酸配列と60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸、または(e)EPPK1蛋白質をコードする核酸とストリンジентな条件でハイブリダイズする核酸などが含まれる。上記(b)において、改変されるアミノ酸数は、通常1から15個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、より好ましくは1から5個である。また、上記の(e)の核酸は、ヒトなどのEPPK1遺伝子の蛋白質コード配列を含む核酸、または対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。例えば、ヒトなどのEPPK1遺伝子の蛋白質コード配列中の任意の連続する部分配列または全長からなる核酸(DNAまたはRNA)とストリンジентな条件でハイブリダイズする核酸を含むものでもよい。あるいはヒトなどのEPPK1遺伝子の蛋白質コード配列からなる核酸とストリンジентな条件でハイブリダイズする核酸を含むものであってもよい。ストリンジентなハイブリダイゼーションの条件としては、例えば例えば5×SSC、7%(W/V)SDS、100μg/ml変性サケ精子DNA、5×デンハルト液を含む溶液中、48から52程度の温度でハイブリダイゼーションを行い、その後、48から68で2×SSC(又は1×SSC中、又は0.5×SSC中、又は0.1×SSC)中で、1時間洗浄する条件などを挙げることができる。

20

30

【0017】

「膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌の検出」としては、例えば、細胞画分に膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌が含まれているかを検出したり、その割合を定量することなどが含まれる。また膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌の検出には、該細胞の「同定」も含まれる。また、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を「分離する」とは、細胞集団中を、該細胞または該細胞を含む細胞集団とそれ以外の細胞集団とに分離することを言う。本発明において膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞の分離は、細胞集団中の該細胞の割合を高めることであってよい。

40

【0018】

膵臓幹細胞とは、膵臓細胞への分化能を持つ未分化細胞を言う。肺絨毛細胞は、喘息のときに粘液分泌細胞になる細胞である。肝幹細胞とは、肝細胞への分化能を持つ未分化細胞を言う。

50

## 【0019】

本発明は、EPPK1遺伝子の発現を指標とする、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌の検出方法および分離方法を提供する。本発明者らは、EPPK1遺伝子が膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌のマーカーであることを見出した。EPPK1遺伝子を発現する細胞（EPPK1陽性細胞）を検出または選択することにより、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌を検出・同定したり、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を特異的に分離することができる。本発明においてEPPK1遺伝子の発現は、EPPK1 mRNAの産生および/またはEPPK1蛋白質の産生であってよい。すなわち、EPPK1 mRNAまたはEPPK1蛋白質を検出することにより、EPPK1遺伝子の発現を検出することができる。例えば、EPPK1 mRNAの検出は、EPPK1 cDNA断片またはオリゴヌクレオチドを用いたノーザンハイブリダイゼーション、RNAプロテクションアッセイ、またはRT-PCRなどの公知の方法により実施することが可能である。EPPK1蛋白質の検出は、抗EPPK1抗体等を用いたウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA、免疫組織化学、FACS (fluorescence activated cell sorting; 蛍光活性化細胞分離) を用いる方法等の公知の方法により検出することができる。

10

## 【0020】

本発明の検出方法および分離方法においては、EPPK1蛋白質を検出することによりEPPK1遺伝子の発現を検出することが好ましい。また、FACS等のセルソーターを用いることで、効率的に細胞を検出または分画することもできる。

20

## 【0021】

本発明の検出または分離に用いる細胞としては特に制限はなく、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌が含まれると予想される組織または細胞などを用いることができる。例えば、生体膵臓の細胞などから膵臓幹細胞を検出または回収することができる。細胞は脊椎動物由来の細胞であり、好ましくは哺乳動物細胞（例えば、マウス、ラットなどのげっ歯類、サル、ヒトなどの霊長類等の細胞）である。ヒトへの応用を考えた場合には、ヒト細胞が好ましい。

## 【0022】

細胞試料の調製は公知の方法に従って行うことができる。例えば組織から膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌を含む試料を調製するには、組織などを回収してミンス後、コラゲナーゼ、ディスパーゼを含む酵素溶液で処理し細胞を分散させる。このようにして調製した細胞から膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌を検出・分離することができる。

30

## 【0023】

また、本発明の方法は株化細胞に適用することもできる。哺乳動物胎児もしくは新生児の膵臓から調製した細胞を不死化し、本発明の方法により例えば成熟膵臓細胞への分化能を持つ膵臓幹細胞を選択することもできる。ES細胞由来の細胞を用いてEPPK1陽性細胞を単離することも可能である。また、本発明の方法を、新生児および成人の組織、例えば臍帯、胎盤、羊膜、または骨髄などから得た細胞試料に適用することによって、膵臓幹細胞を得ることもできる。

## 【0024】

膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌を検出する本発明の方法は、具体的には、(a)細胞におけるEPPK1遺伝子の発現を検出する工程、および(b)EPPK1遺伝子を発現する細胞を膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌と同定する工程により実施することができる。例えば、EPPK1陽性細胞の存在または割合を測定する工程により、それぞれ膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌の存在または割合を知ることができる。EPPK1陽性細胞を高い割合で含む細胞集団には、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌が高い割合で含まれていると判断される。従って、EPPK1遺伝子を発現する細胞を選択する工程により、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を選択することができる。例えば、(a)細胞におけるEPPK1遺伝子の発現を検出する工程、および(b)EPPK1遺伝子を発現する細胞を分離する工程、により膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝

40

50

幹細胞を分離することができる。あるいは予め細胞を分画しておき、分画された細胞においてEPPK1遺伝子の発現を検出し、EPPK1遺伝子を発現する細胞を選択することにより膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を分離・選択することができる。

【0025】

膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞の分離は、好ましくは細胞表面に発現するEPPK1蛋白質に結合する抗体を用いて、(a)膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を含む細胞試料を調製する工程、(b)該細胞試料にエピブラキン1(EPPK1)に対する抗体を添加する工程、及び(c)該抗体が結合した細胞を分離する工程により行うことができる。

【0026】

分離した細胞を回収することにより、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞を回収することができる。例えば、ビーズやマトリックス等の水不溶性担体に抗EPPK1抗体またはEPPK1蛋白質に結合するリガンドを固定化し、これに細胞を直接的または間接的に結合させる方法、免疫吸着カラムによる分離、蛍光抗体標識細胞分離法、免疫磁気ビーズによる分離法などがある。また、上記の工程(c)は、FACSなどのセルソーターを用いて行うことができる。セルソーターを用いた細胞の分離は公知の方法により行うことができる。

10

【0027】

本発明において調製された細胞は、適当な培地を用いて培養したり保存したりすることができる。培地は、血清や増殖・分化因子などを補うことができる。培地としては、例えば、約10%ウシ胎仔血清(FCS)またはこれと同等の補剤を含むDMEMなどが挙げられるがこれに限定されない。例えば、アクチビン10ng/mlとbFGF 5ng/ml (in 10%FBS/DMEM, 又は15%KSR/DMEM)の存在下で培養でき、あるいは下記の培地で培養できる。

20

(培地組成)

F12/DMEM(without glucose)=1:1	100mL
L-Glu	1mL
PS	1mL
NEAA	1mL
0.1M 2-ME	100 µL
MITO(+)	100 µL
Forskolin(40mM)	2.5 µL
BPE	500 µL
Ethanolamine(1mM)	100 µL
Trypsine Inhibitor(2.5mg/mL)	1mL

30

なお、

MITO(+) Serum Extender : (BD, Cat.No. 50006)

BPE: Bovine Pituitary Extract (Invitrogen, Cat.No. 13028-014)

また、下記の細胞外基質の上で培養できる :

Matrigel (MATRIGEL TM Matrix) (BD, 354234) >

Collagen Type IV; from Human Placenta, Acid soluble

【0028】

40

細胞の培養としては、細胞の維持、インキュベート、増殖、または保存などであってよく、例えば *in vitro* であれば、適当な培地中、37、5%CO<sub>2</sub>、湿環境下でインキュベートすることが挙げられる。

【0029】

また、EPPK1が膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞のマーカーとなることから、EPPK1遺伝子の発現を指標として膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞をモニターすることが可能である。これを基に、例えば様々な薬剤や遺伝子の発現、その他の刺激などが膵臓幹細胞に及ぼす影響を評価することができる。例えば、被検試料がEPPK1の発現に及ぼす効果を検出することにより、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、又は肝幹細胞に作用する様々な薬剤をアッセイすることも可能である。

50



## 【0030】

本発明はさらに、エピブラキン1 (EPPK1) に対する抗体を含む、膵臓幹細胞、肺絨毛細胞、肝幹細胞、又は膵臓癌を検出又は分離するための試薬に関する。エピブラキン1 (EPPK1) に対する抗体は、EPPK1蛋白質またはその部分ペプチドを免疫原として用いたり、あるいはEPPK1蛋白質を発現する細胞を免疫原として用いることによって製造することができる。

## 【0031】

免疫原としてのEPPK1蛋白質が由来する動物の種類に特に制限はなく、ヒト、サル、マウス、ラット、ウシ、ウサギ、その他の脊椎動物由来のEPPK1蛋白質を用いることができる。抗体は、公知の方法に従って作製することが可能である。例えば、モノクローナル抗体であれば、公知の細胞融合法により製造することができる。

10

## 【0032】

上記抗体は、適宜生理食塩水、緩衝液、塩、安定剤などと組み合わせて膵臓幹細胞の検出用試薬または分離用試薬とすることができる。例えばこの抗体を用いて組織中の膵臓幹細胞の分布や量を検査したり、細胞試料中の膵臓幹細胞の濃度を測定したりすることができる。抗体は蛍光標識されていてもよい。

## 【0033】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

20

## 【実施例】

## 【0034】

実施例1:

## (A) 方法

## (1) 動物

トランスジェニックマウスPdx1/GFP (Gu G, Wells JM, Dombkowski D, Preffer F, Aronow B, Melton DA: Global expression analysis of gene regulatory pathways during endocrine pancreatic development. *Development* 131:165-79, 2004) はハーバード大学Melton博士とバンダービルト大学G. Gu博士から供与された。野生型ICRマウスはSLC社(日本、神奈川県)から入手した。受胎日を膈栓の存在で確認してE0.5と記録した。8週齢のマウスを成体として用いた。

30

## 【0035】

## (2) 抗体

ウサギ抗EPPK1抗体はウィーン大学G. Wiche博士から供与された (Spazierer D, Fuchs P, Proll V, Janda L, Oehler S, Fischer I, Hauptmann R, Wiche G: Epiplakin gene analysis in mouse reveals a single exon encoding a 725-kDa protein with expression restricted to epithelial tissues. *J Biol Chem.* 278:31657-66, 2003)。モルモット抗Hes1抗体はR. Kageyama博士(京都大学)から供与された。マウス抗Ngn3抗体 (Cat #F25A1B3, Zahn S, Hecksher-Sorensen J, Pedersen IL, Serup P, Madsen O: Generation of monoclonal antibodies against mouse neurogenin 3: a new immunocytochemical tool to study the pancreatic endocrine progenitor cell. *Hybrid Hybridomics* 23:385-8, 2004) はDevelopmental Studies Hybridoma Bankから入手した。使用した他の一次抗体は、マウス抗BrdU抗体 (Cat #B-2531, シグマ社、ミズーリ州セントルイス)、マウス抗GFP抗体 (Cat #11814460001, ロシュ社、インディアナ州、インディアナポリス)、ウサギ抗GFP抗体 (Cat #598, MBL社、日本、名古屋)、ウサギ抗Pdx1抗体 (Cat #KAL-KR059, 株式会社トランスジェニック社、日本、熊本)、ヤギ抗アミラーゼ抗体 (Cat #sc-12821, Santa Cruz Biotechnology社、カリフォルニア州、サンタクルーズ) である。フルオレセイン標識DBAレクチン (Vector Laboratories社、カリフォルニア州パーリングゲーム) も使用した。

40

## 【0036】

## (3) 組織学的分析

50

凍結標本のパラフィン包埋とO.C.T. (Tissue Tek, Miles社、インディアナ州エルクハート) 包埋を行う前に、4%パラホルムアルデヒドで組織を固定した。パラフィン包埋標本から厚さ6 $\mu$ mの切片を調製し、HE染色した。凍結標本の免疫組織化学は、基本的に既報 (Yoshida T, Tokunaga A, Nakao K, Okano H: Distinct expression patterns of splicing isoforms of mNumb in the endocrine lineage of developing pancreas. *Differentiation* 71:486-95, 2003) に従って行った。簡単に説明すると、まず抗原を賦活化させるために、抗原賦活化溶液 (Dako Cytomation社、デンマーク、グロストルupp) 中、105 で標本を10分間加熱した。次に、0.1% Triton X-100を含むPBSで試料を可溶化し、M.O.M. Immunodetection Kit (Vector社) でブロッキングした後、一次抗体を加えて4で一晩インキュベートした。Alexa488または568標識した適当な二次抗体 (Invitrogen社、カリフォルニア州カールズバッド) で、結合した抗体を発色させた。核はDAPIで対比染色した。顕微鏡観察用標本は共焦点レーザー走査イメージング装置 (TCSSP2 AOBs、ライカ社) を用いて観察した。非共焦点画像はオリンパスIX-71型顕微鏡 (Olympus Optical社、日本、東京) にニコン digital sight DS-5M (日本、東京) を接続して撮影した。画像はAdobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems社、カリフォルニア州、サンノゼ) を用いて処理した。

10

## 【0037】

(4) 膵切除、およびin vivoでのBrdUパルス標識または長時間標識

図5Aに示した方法で、野生型ICRマウスまたはPdx1/GFPマウスから膵臓の一部(20%)を切除した。膵切除は既報の外科的手法に従って行った。擬似手術は、膵切除する代わりに膵臓の組織を指先ではさんで1分間ごく軽くこする以外は同じ手順で行った (Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE: A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42:1715-20, 1993)。

20

## 【0038】

in vivoパルス標識は、マウスを屠殺する3時間前に100 $\mu$ g/kg体重の5-プロモデオキシウリジン (BrdU, Sigma社) 水溶液を腹腔内投与して行った。長時間標識は、給水ボトルを1mg/ml BrdUを含むボトルと交換することにより行った。給水ボトルはアルミホイルで完全に覆って遮光し、BrdU水溶液は新しく調製した溶液に週1回以上交換した (Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA: Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* 54:2557-67, 2005)。

30

## 【0039】

BrdU陽性細胞数の計測は以下の手順で行った。膵切除または擬似手術したPdx1/GFPマウスをBrdU取り込みから2週間後に屠殺した。膵尾部および膵頭部の切片を作製し、25枚ごとに1枚の切片を抗BrdU抗体と抗GFP抗体で各1枚ずつ染色した。5枚ごとに1枚で計測した結果と25枚ごとに1枚で計測した結果で、統計学的な差はみられなかった。膵島のBrdU陽性細胞の計測は、免疫染色撮影後にBrdU/GFPダブル陽性細胞を計測することにより行った。全領域のBrdU陽性細胞を蛍光顕微鏡下で計測し、総細胞数はLumina Vision software (三谷商事、日本、東京) で区切った区画の面積に係数1777を乗じて算出した。係数1777は、一定枚数の凍結切片1mm<sup>2</sup>中の細胞数を計測して推定した。

40

## 【0040】

(B) 結果

(1) 胎児および成体の膵臓におけるエピブラキン1 (EPPK1) 発現の解析

本実施例では、膵幹/前駆細胞マーカー分子の候補として、発生段階でのエピブラキン1 (EPPK1) の発現パターンを免疫組織化学的分析により詳細に検討した。Pdx1/GFPマウスの免疫組織化学的分析から、E10.5の膵上皮のPdx1陽性膵前駆細胞でEPPK1が検出されることが示された (図1A~C)。Pdx1発現細胞でのEPPK1の発現は、EPPK1の発現とPdx1の発現に相違がみられ始めるE15.5の二次転換の時点まで継続した (図1D~F)。EPPK1はそれ以後は成体膵では検出されなかったが、Pdx1は成体膵の細胞で発現していることが知られている (図1G~I)。次いで、EPPK1が検出される細胞の種類について検討した

50

。内分泌前駆細胞および外分泌前駆細胞は、E15.5でPdx1陽性の共通の膵前駆細胞から生じ、それぞれNgn3とアミラーゼを発現していた。次に、これらの内分泌前駆細胞（図2 A～C）および外分泌前駆細胞（図2 D～F）でEPPK1が発現しているかを検討した。その結果、Pdx1を発現していない両方の前駆細胞でもEPPK1は発現していたが、E10.5よりもその発現量は少なかった。次に、成体膵のEPPK1発現細胞の種類の設定を試みた。成体マウスの膵島以外のEPPK1発現細胞の種類を設定するため、抗EPPK1抗体および膵管細胞に結合するDolichos biflorus由来凝集素（DBA）を用いて免疫組織化学的分析を行った。膵管は形状と性質によって、主膵管、副膵管、分岐膵管の3種類に分類されるが、これらの膵管全てがEPPK1を発現していることが明らかになった。EPPK1は主膵管および分岐膵管（図3 A～C、三角印）では強く発現しており、副膵管では弱く発現していた（図3 A～C、矢印）。分岐膵管はDBAで弱く染色され、副膵管がDBAで強く染色されたのと対照的であった（図3 A～C）。分岐膵管のEPPK1陽性細胞のほとんどがbHLH転写因子Hes1も発現していた（図3 D～G）。これは、腺房細胞の幹/前駆細胞であると以前に報告された腺房中心細胞（Gasslander T, Ihse I, Smeds S: The importance of the centroacinar region in cerulein-induced mouse pancreatic growth. *Scand J Gastroenterol* 27:564-70, 1992）でもEPPK1の発現が確認されたことを意味する。DBAに親和性を示すという点で、腺房中心細胞は膵管細胞と性質が類似している（Miyamoto Y, Maitra A, Ghosh B, Zechner U, Argani P, Iacobuzio-Donahue CA, Sriuranpong V, Iso T, Meszoely IM, Wolfe M S, Hruban RH, Ball DW, Schmid RM, Leach SD: Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 3:565-76, 2003）。

10

20

## 【0041】

(2) 20%膵切除モデルでは、生理的条件下で膵再生が起こる

膵幹/前駆細胞は、げっ歯類の膵切除した膵臓および急性膵炎を発症している膵臓などのような再生中の膵臓中で他の種類の細胞に分化する増殖細胞と定義されている。本実施例では、再生中の膵臓中にEPPK1陽性増殖細胞が存在することを実証することを試みた。

## 【0042】

一般的にはラット膵臓の90%またはマウス膵臓の70%を切除して膵再生を誘導する方法が採用される（Bonner-Weir S, Baxter LA, Schupp GT, Smith FE: A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42:1715-20, 1993; 及びDor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA: Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429:41-6, 2004）。しかしこの場合、残存領域の大部分は「病巣領域（focal region）」となる。この領域では、大半の細胞が化生を起こし、二次経路による再生が起こる。化学物質の投与で誘発される急性膵炎も生理的条件下とみなすことはできない。本発明者らは、膵細胞の生理的代謝によるターンオーバーを反映した代替の実験動物モデルが確立できれば膵再生の分析に有用であると考えた。そこで、より小規模に膵臓を切除する膵切除を行った。BrdUの取り込みで評価したところ、結果として20%膵切除（図4 A、切除した領域を四角で示す）を行えば、「病巣領域（focal region）」に相当する病変部（図4 B、三角印）だけでなく、病巣領域よりもはるかに大きな残りの正常領域（図4 B）でも増殖率の増加を誘発するのに十分であることが明らかになった。さらに、切除近位部（膵尾部）だけでなく遠位部（膵頭部）でも、正常領域での細胞増殖が促進された。本実施例の20%膵切除モデルでは、2週間連続のBrdU投与後では、BrdUを取り込んだ細胞の全細胞に対する割合は、膵尾部では2.52%（n=387,730）、膵頭部では1.61%（n=656,296）であった。擬似手術した膵臓では、BrdUの取り込みは膵尾部では0.27%（n=598,877）、膵頭部では0.61%（n=442,959）であった。BrdUを取り込んだ細胞の割合は、膵尾部（近位部）と膵頭部（遠位部）でそれぞれ9.33倍および2.64倍に増加した。切除膵尾部の方が取り込んだ細胞の割合が高かったため、以下の組織化学的分析は膵尾部（近位部）で行った。

30

40

## 【0043】

50

## (3) 再生膵のEPPK1発現細胞

膵切除から4日後、膵切除した膵臓の大部分(病巣領域以外)でEPPK1陽性腺房中心細胞の数が増加し、管状構造(図5A~Fの三角印)を形成した。EPPK1陽性腺房中心細胞はDBA(図5A~C)およびHes1(図5D~F)も陽性であった。これらEPPK1陽性腺房中心細胞の一部ではアミラーゼの発現もみられたが、手術を行わなかった対照用の膵臓ではアミラーゼの染色は全くみられなかった(図5G~I、三角印)。この特徴は、これらの細胞が腺房中心細胞に由来する分化途中の細胞であることを示す。従って、腺房細胞は腺房中心細胞に由来することが強く示唆された。この仮説はBrdU取り込み実験によっても裏付けられた。BrdUパルス標識実験から、BrdUを取り込んだ細胞の約10%がEPPK1陽性腺房中心細胞であることが示された(図6A-C、三角印)。腺房中心細胞は膵細胞全体の1%以下に過ぎないことを考慮すると、この値は著しく高い。BrdUを取り込んだ残りの90%の細胞は腺房細胞であった。BrdU長時間標識実験から、BrdUを取り込んだ細胞はEPPK1陽性腺房中心細胞(図6D~F)の周辺の外分泌細胞(図6G~I)であることが示された。これらのデータはEPPK1が少なくとも成体膵の外分泌細胞の幹/前駆細胞で認められることを示している。

10

【0044】

## (4) 病巣領域におけるEPPK1の発現パターン

次に、病巣領域のEPPK1陽性細胞に注目した。膵切除から1日後には、ほぼ全ての細胞が死滅し、病巣領域に好中球が浸潤した(図4B、三角印)。膵切除から4日後には、病巣領域に多くの病巣がみられ、「duct in foci(病巣の膵管)」と呼ばれる病巣の管壁細胞でEPPK1が発現していた(図7A~C)。病巣の管壁細胞はCK20を発現していることが示され、幹/前駆細胞であることが報告されている(Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE: A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. Diabetes 42: 1715-20, 1993、及びBouwens L, Braet F, Heimberg H: Identification of rat pancreatic duct cells by their expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in vivo and after isolation and culture. J Histochem Cytochem 43:245-53, 1995)。膵切除から7日後には、病巣領域からの再生の幹/前駆細胞であると示唆されているPdx1陽性細胞のクラスターが病巣領域に数多く出現することを確認した(図7D~F)。Pdx1の発現増加に先立ってEPPK1細胞が病巣領域に早期に出現することは、化生など異常な機序による再生が起こる病巣領域におけるEPPK1の幹/前駆細胞のマーカーとしての特徴を強く示唆するものである。

20

30

【0045】

実施例2:

## (A) 方法

## (1) ナフタレン投与

ナフタレンをコーンオイルに溶解させ、マウス体重1kgあたり275 mgを腹腔内投与した。

## (2) 抗体

肺クララ細胞を染色するためにヒツジ抗CC10抗体(S20)(#SC9773, Santa Cruz Biotechnology)を用いた。大脳上衣細胞を染色するためにマウス抗S100・抗体(SB6)(#ab16959, Abcam)を用いた。

40

【0046】

## (3) 各組織凍結ブロックの作成

野生型マウスおよび膵切除などの処置を行ったマウスは、4%パラホルムアルデヒド(PFA)/PBSを用いて還流固定を行った。その後、各組織を取り出し、4度にて4% PFA/PBSに一晩つけておくことで後固定を行った。固定した組織は、4度にて15%スクロース/PBSに一晩つけ、さらに4度にて30%スクロース/PBSにつけた。スクロースに置換した組織は、OCTコンパウンド(Tissue Tek)に置換し、-80度で凍結させる事により凍結ブロックを作成した。

50

## 【 0 0 4 7 】

## ( 4 ) 免疫染色

凍結ブロックは、クライオスタット(Leica)を用いて厚さ10mmに薄切し、MASコートしたスライドガラス(Matsunami Glass)にはりつけた。凍結切片は、Target Retrieval Solution (DACO)につけ、105度5分間、熱処理を行うことにより抗原をふ活化した。その後、MOM Immunodetection Kitを用いてブロッキングを行った後、1次抗体を4度で一晩反応させた。翌日、2次抗体を反応させる事により、各タンパク質を可視化した。

## 【 0 0 4 8 】

## ( 5 ) CDE肝炎モデルマウスの作製法

動物はマウスC57BL/6, ICRの5週齢マウスを使用した。動物の管理は、熊本大学生命資源研究・支援センターで明暗12時間周期で管理している。CDE処理は、Choline Deficient Diet with DL-Ethionine (Catalog number 960214, MP Biomedicals, Inc.)を固形飼料として、通常飲料水と共に与えた。CD+E処理は、Choline Deficient Diet, Modified (Catalog number 960210, MP Biomedicals, Inc.)を固形飼料として、また飲料水にはDL-Ethionine (Sigma)を0.15%の濃度になるようにして与えた。実験に用いた肝臓は、処理し始めて2週間後にマウスを解剖し、肝臓を摘出し、実験に用いた。参考文献は (Jelenes et al., 2007) (Akhurst et al., 2003)

10

## 【 0 0 4 9 】

## ( B ) 結果

## ( 1 ) Eppk1は膵癌細胞に発現している ( 図 9 )

Eppk1は膵導管細胞癌の80%以上をしめる初期症状である、膵上皮内腫瘍性病変細胞(PanIN)に発現していた ( 図 9 )。膵上皮内腫瘍性病変は、進行状況により3段階に分けられ (PanIN1-3)、PanIN1ではDolichos biflorus agglutinin (DBA) 結合性を持つ粘液が円柱状の細胞の大部分を示すが (A-F)、細胞は分裂して多層構造を形成し (PanIN2; G-L)、徐々に湾曲する (PanIN3; M-S)。Eppk1は、すべての段階においてすべての膵上皮内腫瘍性病変細胞に発現が認められた。A, G, MはHE染色像、B, H, OはEppk1、C, I, PはDBAの免疫染色像、D, J, QはEppk1とDBAを合わせた像、E, K, RはさらにDAPIで核を染色した像を重ねたものである。F, L, Sは、E, K, Rの概略図である。膵上皮内腫瘍性病変は腺房中心細胞由来である事が報告されている (Hezel et al., Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. Genes Dev 20:1218-1249, 2006)。癌細胞は、組織幹細胞に突然変異がおこる事により発生するため、初期癌細胞で発現している遺伝子は組織幹細胞で発現している可能性がある。

20

30

## 【 0 0 5 0 】

## ( 2 ) Eppk1はマウス胎生10.5日胚の肝芽細胞に弱く発現している ( 図 1 0 )

肝臓の発生は、マウス胎生9.5日胚の腸管の予定肝領域において、出芽がおき、肝芽と呼ばれる肝芽細胞からなる細胞塊が形成される事から開始される。Eppk1は、マウス胎生10.5日胚において腸管(G)で強い発現が認められるが、肝芽(L)においても弱いながら発現が認められた ( 図 1 0 )。

40

## 【 0 0 5 1 】

## ( 3 ) Eppk1は再生肝において楕円形細胞に発現している ( 図 1 1 )

成体の肝臓において、肝細胞は通常の細胞分裂で増殖している。しかし、特殊な状況下では総胆管細胞から、幹細胞と胆管細胞の両方に分化する事ができる楕円形細胞とよばれる幹細胞が脱分化して出現する事が報告されている (Santoni-Rugiu et al., Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. APMIS. 2005 Nov-Dec;113(11-12):876-902. Review.)。その細胞は通常、成体の肝臓には見られないが (Control)、CDE食 (Choline deficient diet with ethionine) を与える事により楕円形細胞を脱分化により生じさせる事ができる。楕円細胞はA6抗体により染色されるが、A6陽性細胞

50

にEppk1が発現している事が確認された(図11)。

【0052】

(4) 肺におけるEppk1の発現パターン(図12)

成体の肺は、1型肺胞細胞、2型肺胞細胞(Surfactant protein-A (SP-A)陽性)、クララ細胞(Clara cell 10-kD protein (CC10)陽性)、肺神経内分泌細胞(Calcitonin gene related protein (CGRP)陽性)、絨毛細胞などからなる。これらの細胞はすべて、SP-A, CC10, CGRP三重陽性の内胚葉上皮細胞から分化することが報告されている(Wuensche et al., Embryonic mouse lung epithelial progenitor cells co-express immunohistochemical markers of diverse mature cell lineages. *J Histochem Cytochem.* 1996 Feb;44(2):113-23)。胎生14.5日胚の肺(E14.5)において、CC10陽性内胚葉上皮細胞にEppk1は発現していた。一方、成体の肺においてはEppk1はCC10陽性クララ細胞に発現していなかった(図12)。

10

【0053】

(5) 成体の肺におけるEppk1陽性細胞は絨毛細胞である(図13)

マウスにナフタレンを投与すると、1部を除いて大部分のクララ細胞が死に、生き残ったクララ細胞からクララ細胞が再生する事が報告されている(Rawlins and Hogan, Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development.* 2006 Jul;133(13):2455-65. Epub 2006 May 30. Review.)。その際、絨毛細胞が扁平細胞に変形し、気管から空気を漏れないようにする事が報告されている(Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Feb;34(2):151-7. Epub 2005 Oct 20.)。ナフタレン投与後1日目(d1)において、Eppk1陽性細胞は扁平状になっていた事から、成体の肺においてEppk1は絨毛細胞に発現している事が示唆された(図13)。絨毛細胞は、この再生に関与していない事が報告されている(Rawlins et al., Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 9;104(2):410-7. Epub 2006 Dec 28)。

20

【0054】

(6) Eppk1は神経系において上衣細胞に発現している(図14)

胎生16.5日胚(E16.5)と成体(Adult)の脳を抗Eppk1抗体で染色した(図14のA)。それぞれの右側の写真は、左側の写真内部の四角で囲んだ部分を拡大したものである。胎生16.5日胚の脳にEppk1は発現していないが、成体脳の脳室周辺部にEppk1の発現が認められた。上衣細胞は、以前神経幹細胞であると報告された(Johansson et al., Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell.* 1999 Jan 8;96(1):25-34)が、その直後に神経幹細胞はアストロサイトであるという報告(Doetsch et al., Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999 Jun 11;97(6):703-16)がなされ、現在は後者の説が趨勢である。

30

【0055】

成体脳について、Eppk1と上衣細胞マーカーであるS100の発現を調べたところ、両者は同じ細胞に発現していた事から、Eppk1は上衣細胞に発現している事が示唆された(図14のB)。アスタリスクは脳室を示している。

40

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】図1は、膵臓におけるEPPK1の発現パターンを示す。EPPK1の免疫組織学的分析をPdx1/GFP発現マウスの膵臓で行った。(A~C)E10.5、(D~F)E15.5、(G~I)成体。挿入した写真は四角で囲んだ領域の高倍率像である。C、F、Iは合成画像であり、青く染色された部分はDAPI染色した核である。スケールバー、200µm(A~C、G~I)、100µm(D~F)、25µm(D~Fに挿入した写真)。

【図2】図2は、EPPK1の内分泌前駆細胞および外分泌前駆細胞での発現を示す。E15.5の胎児で二重免疫染色による分析を行った。EPPK1(A、D)、Ngn3(B)およびアミラーゼ(C、E)の発現を示す。スケールバー、200µm(A、D)、100µm(B、C、E)。

50

E)の発現を示す。CとFは合成画像であり、青く染色された部分はDAPI染色した核である。挿入した写真は四角の領域の高倍率像である。スケールバー、100  $\mu\text{m}$ 、25  $\mu\text{m}$ (挿入した写真)。

【図3】図3は、EPPK1の成体膵の腺房中心細胞などの膵管細胞での発現を示す。(A~C)EPPK1の発現(A)。副膵管(矢印)および分岐膵管(三角印)のDBA染色(B)。(D~G)EPPK1(D)およびHes1(E)の二重免疫染色。Gは三次元画像である。CとFは合成画像であり、青い点はDAPI染色した核である。スケールバー、100  $\mu\text{m}$ 。

【図4】図4は、膵臓のごく一部のみを切除する20%膵切除法の確立を示す。(A)擬似手術後の膵臓(左)、および膵臓摘出後の膵臓(右)。(B)膵切除した膵臓のHE染色標本の写真。Aの四角で囲まれた領域。病巣領域を三角印で示す。スケールバー：2cm(A)、2  $\mu\text{m}$ (B)。

10

【図5】図5は、膵切除から4日後、EPPK1陽性腺房中心細胞から、膵切除した膵臓の外分泌細胞が分化したことを示す。(A~C)EPPK1の発現(A)。膵管細胞のDBA染色(B)。(D~F)EPPK1(D)およびHes1(E)の二重免疫染色。A~Fの三角印は管状構造を示す。(G~I)EPPK1(G)およびアミラーゼ(H)の二重免疫染色。一部の領域はEPPK1とアミラーゼ両方の抗体と反応する(三角印)。スケールバー：100  $\mu\text{m}$ (A~I)。

【図6】図6は、膵切除した膵臓によるBrdUの取り込みを示す。膵切除から4日後の膵臓から標本を作製した。パルス標識した膵臓(A~C)および長時間標識した膵臓(D~I)のEPPK1(A、D)、アミラーゼ(G)およびBrdU(B、E、H)の免疫染色。A~Cの三角印および矢印はそれぞれ、EPPK、BrdUダブル陽性細胞、BrdUシングル陽性細胞を示す。C、F、Iは合成画像であり、青い点はDAPI染色した核である。スケールバー、100  $\mu\text{m}$ 。

20

【図7】図7は、膵切除した膵臓の再生病巣領域でのEPPK1発現を示す。EPPK1(A、D)、Pdx1/GFP(B、E)の発現パターン。(A~C)膵切除から4日後には「duct in foci(病巣の膵管)」はEPPK1陽性でPdx1陰性である。(D~F)膵切除から7日後には「duct in foci(病巣の膵管)」はEPPK1、Pdx1ダブル陽性である。CとFは合成画像であり、青い点はDAPI染色した核である。スケールバー、200  $\mu\text{m}$ 。

【図8】図8は、EPPK1およびPdx1の発現の概要を示す。黒い矢印は胚発生、赤い矢印は出生後のプロセスを示す。実線は分化、点線は化生を示す。

【図9】図9は、Eppk1は膵癌細胞に発現していることを示す実験結果である。

【図10】図10は、Eppk1はマウス胎生10.5日胚の肝芽細胞に弱く発現していることを示す実験結果である。

30

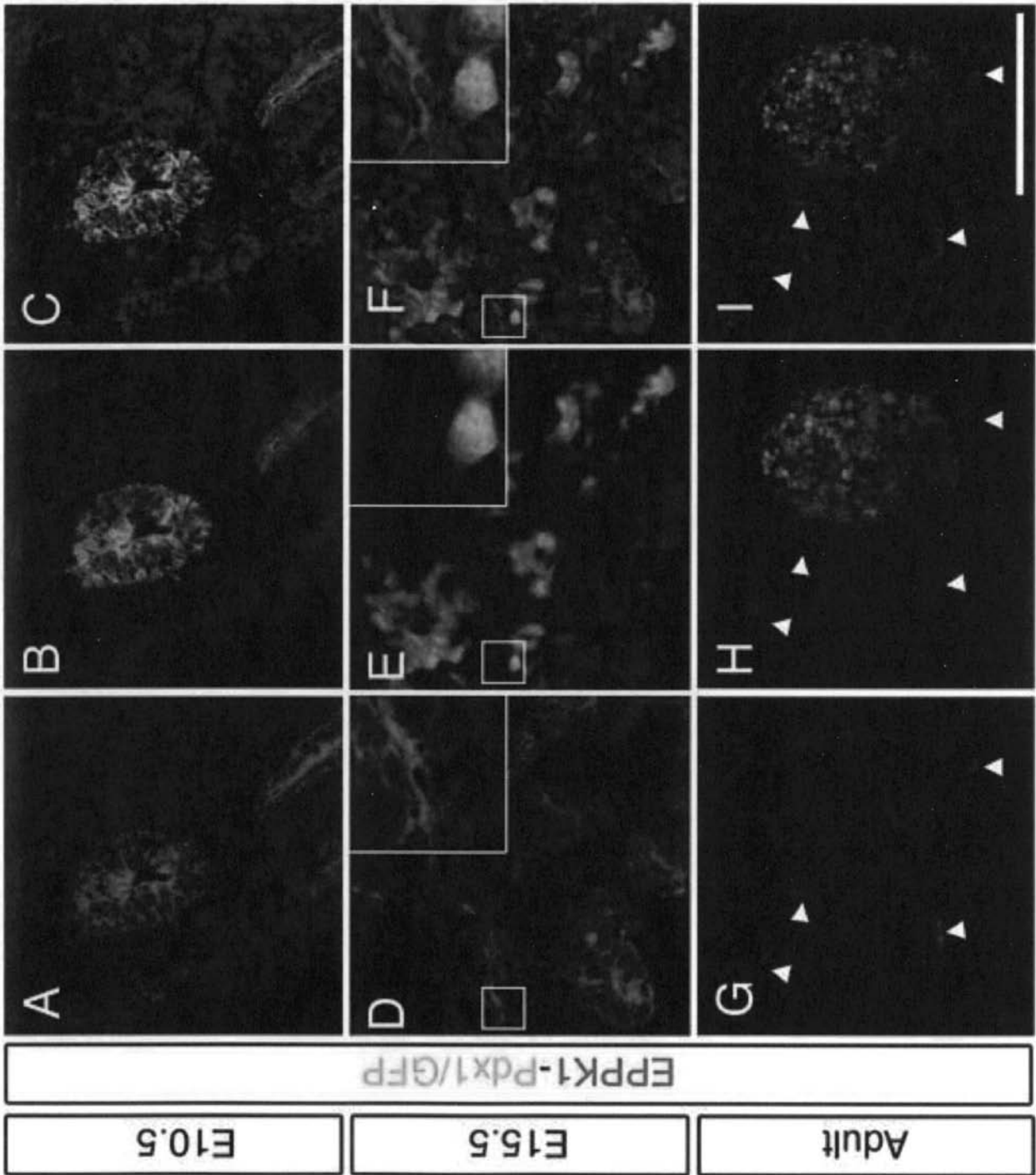
【図11】図11は、Eppk1は再生肝において楕円形細胞に発現していることを示す実験結果である。

【図12】図12は、肺におけるEppk1の発現パターンを示す。

【図13】図13は、成体の肺におけるEppk1陽性細胞は絨毛細胞であることを示す実験結果である。

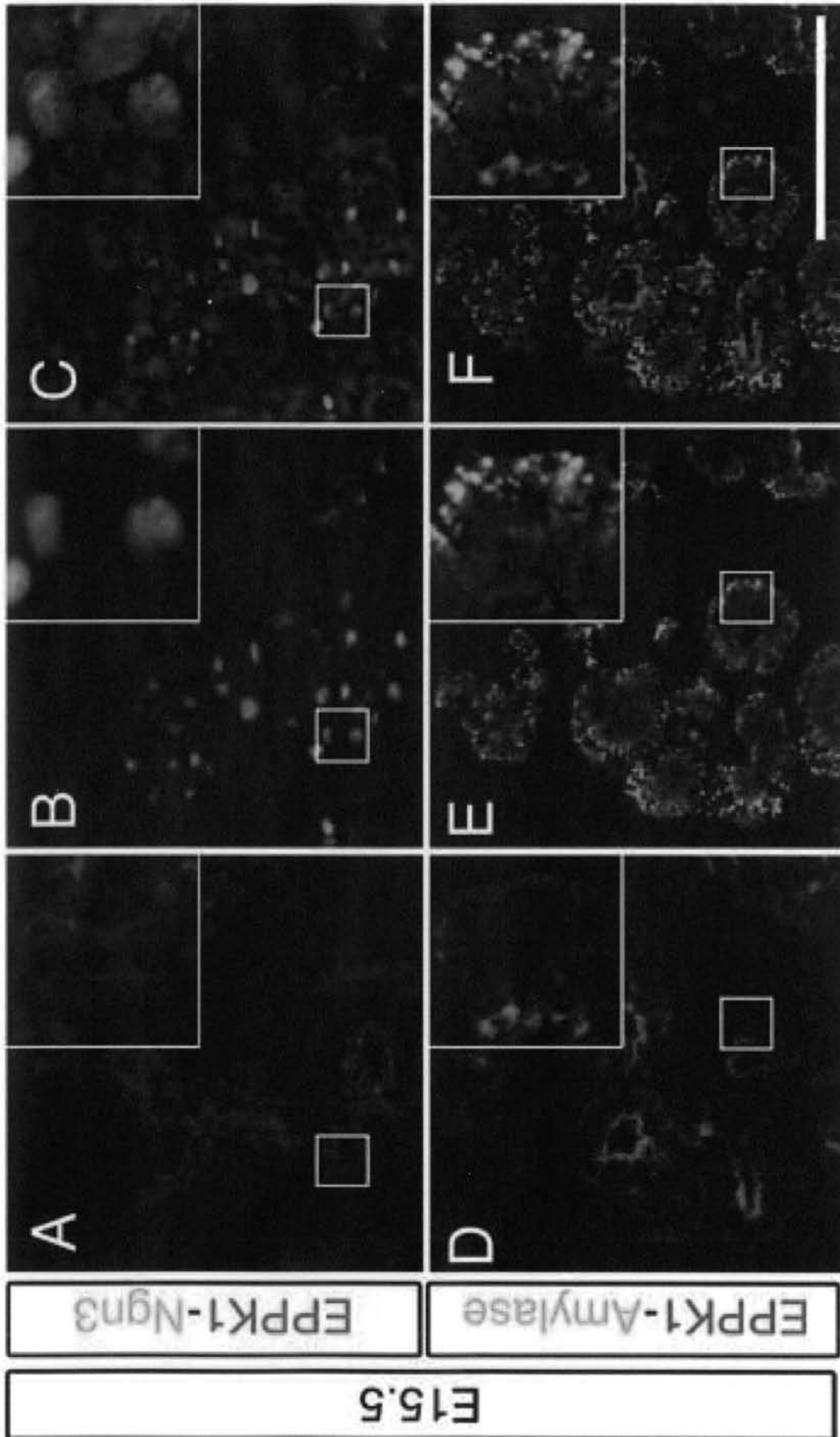
【図14】図14は、Eppk1は神経系において上衣細胞に発現していることを示す実験結果である。

【 図 1 】

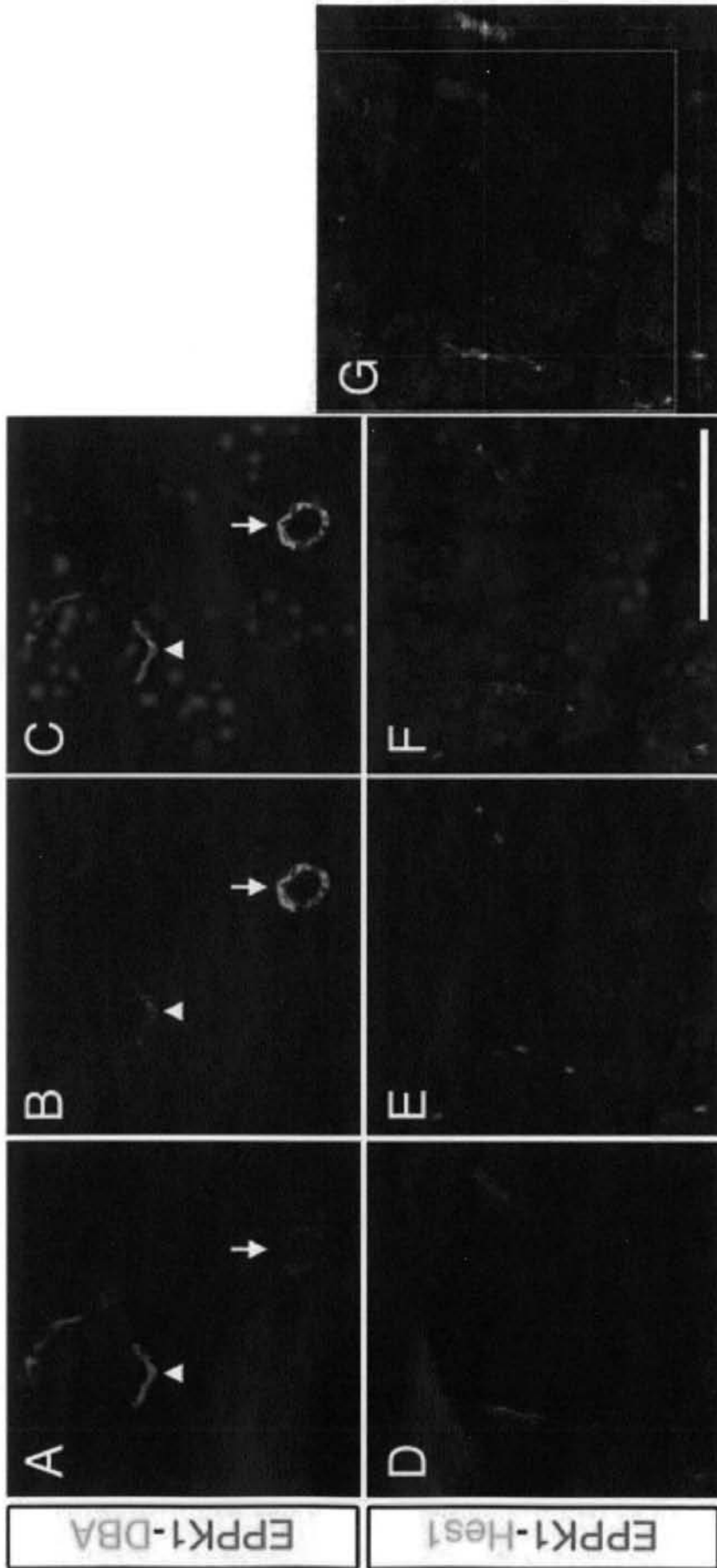




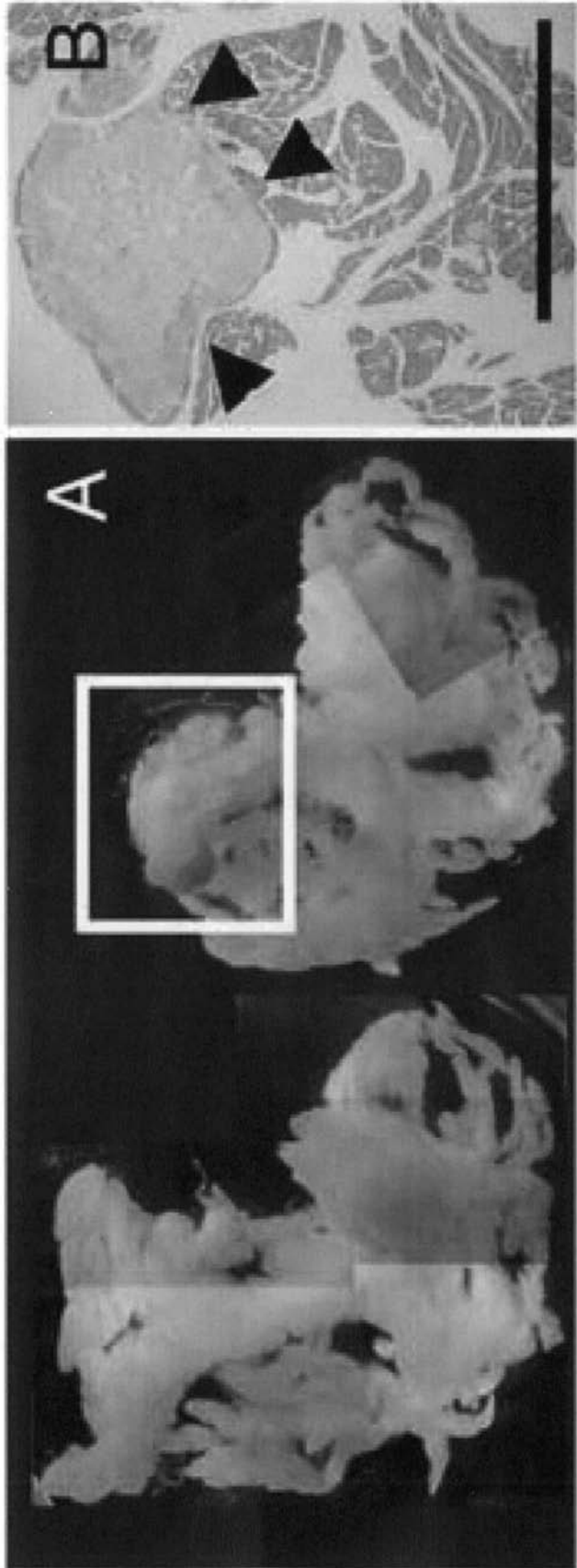
【 図 2 】



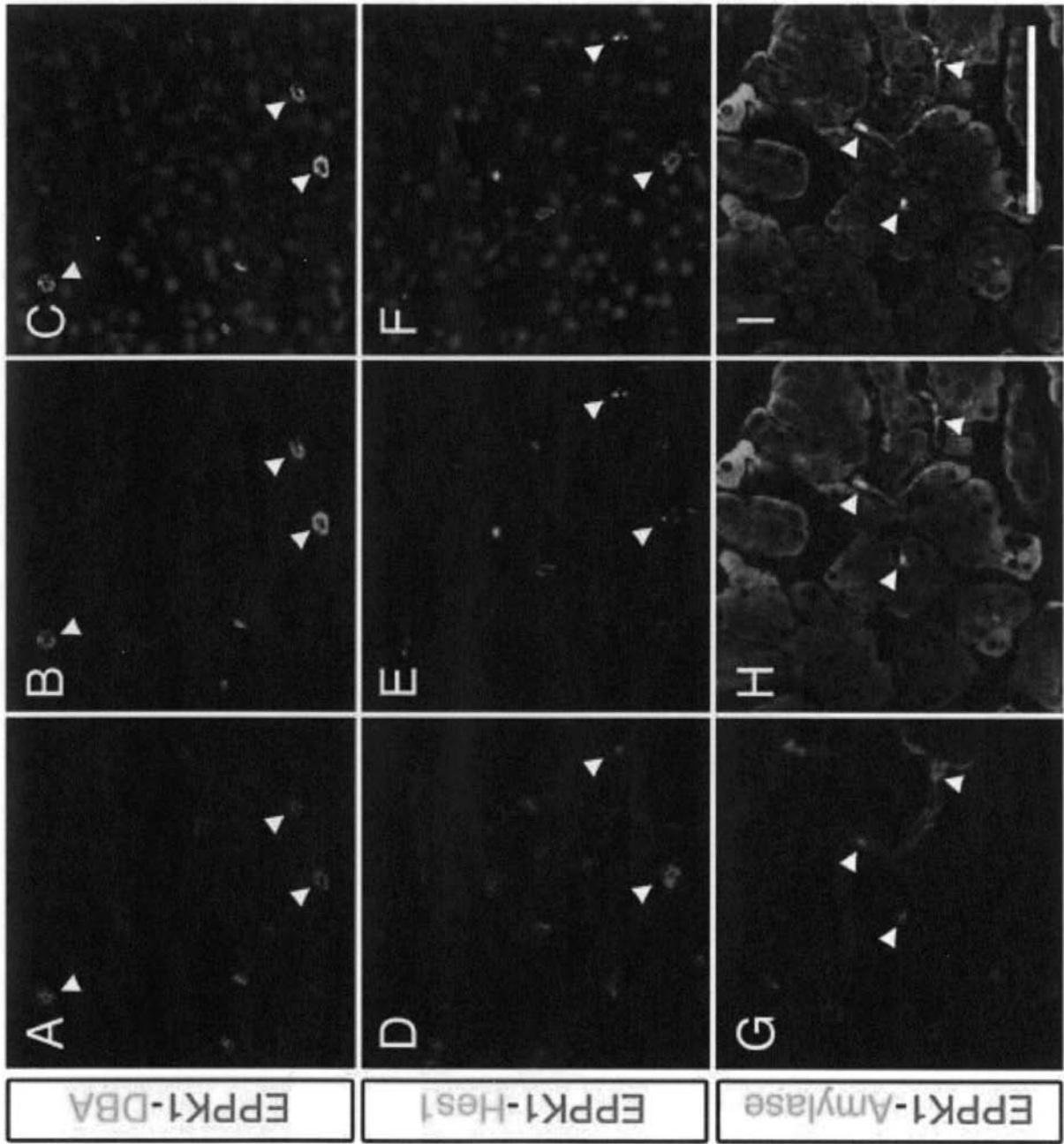
【 図 3 】



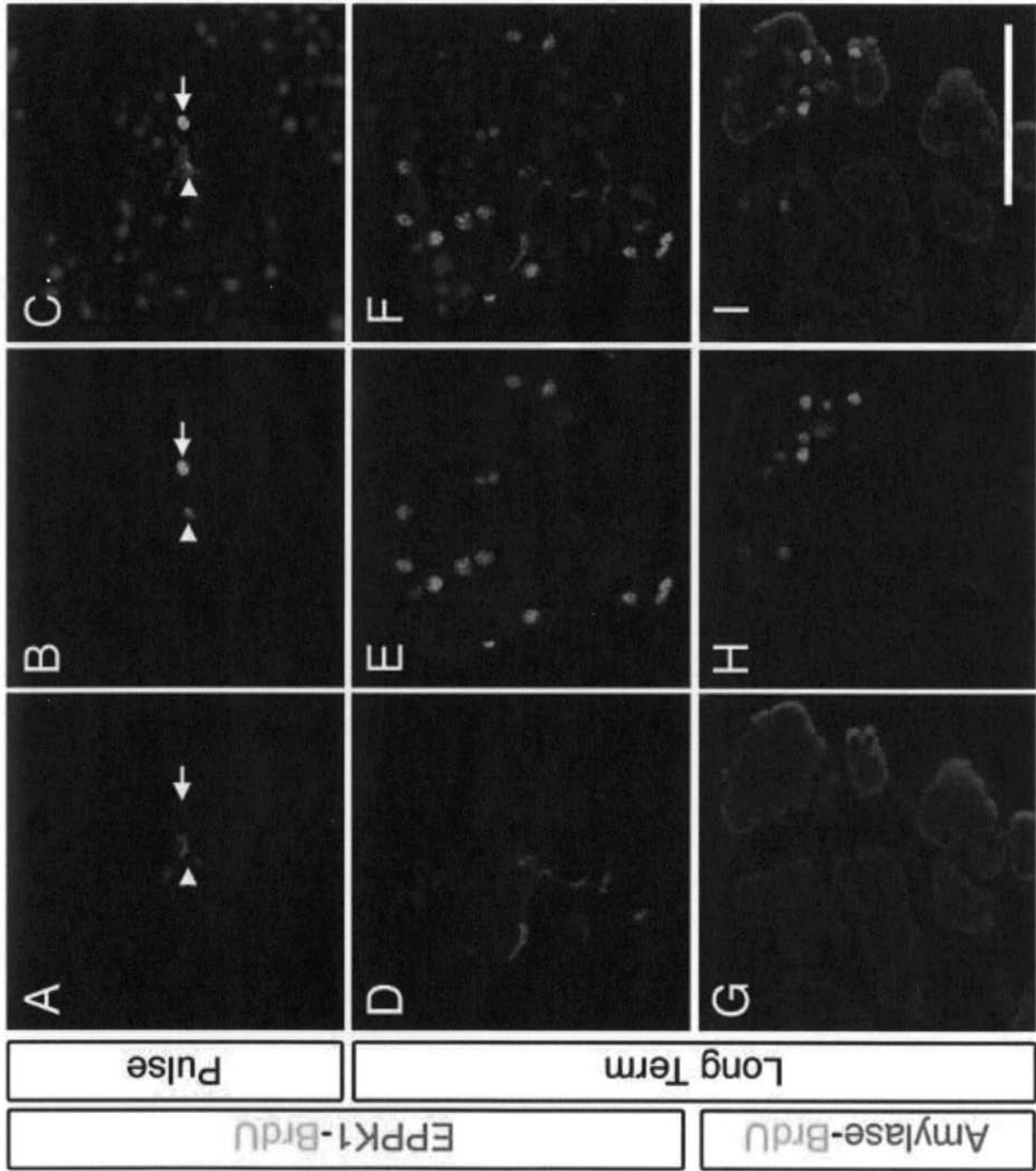
【 図 4 】



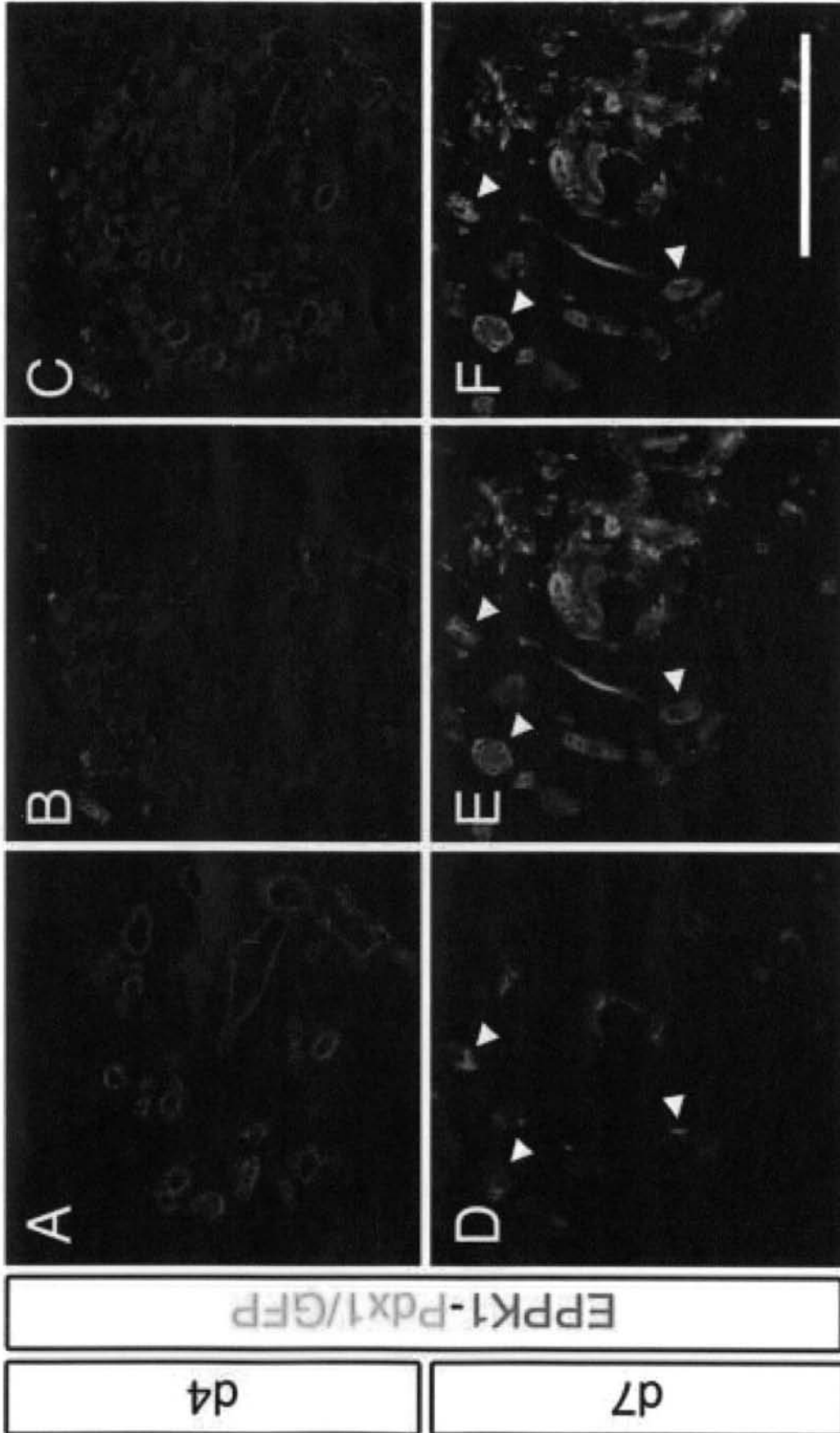
【 図 5 】



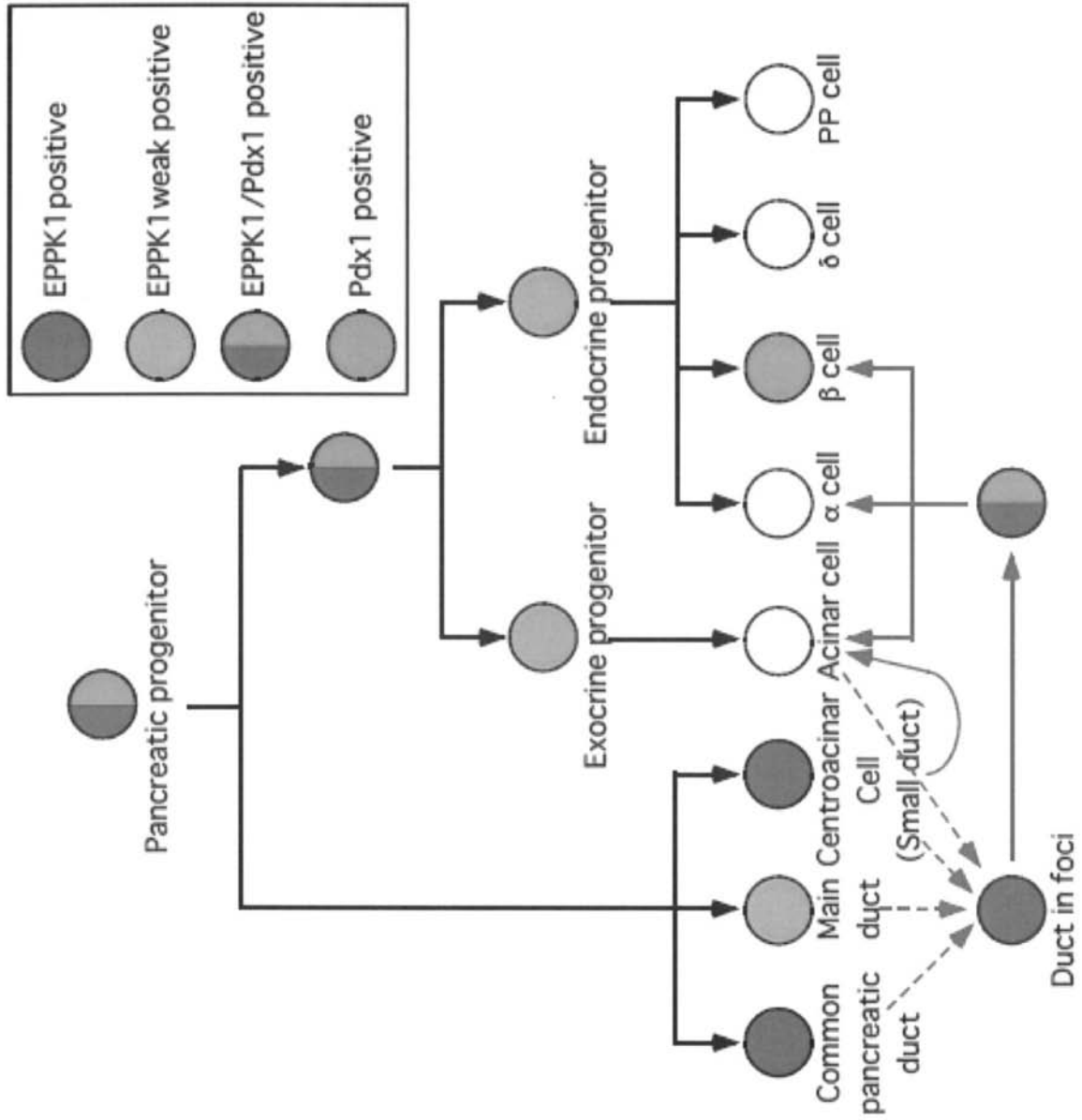
【 図 6 】



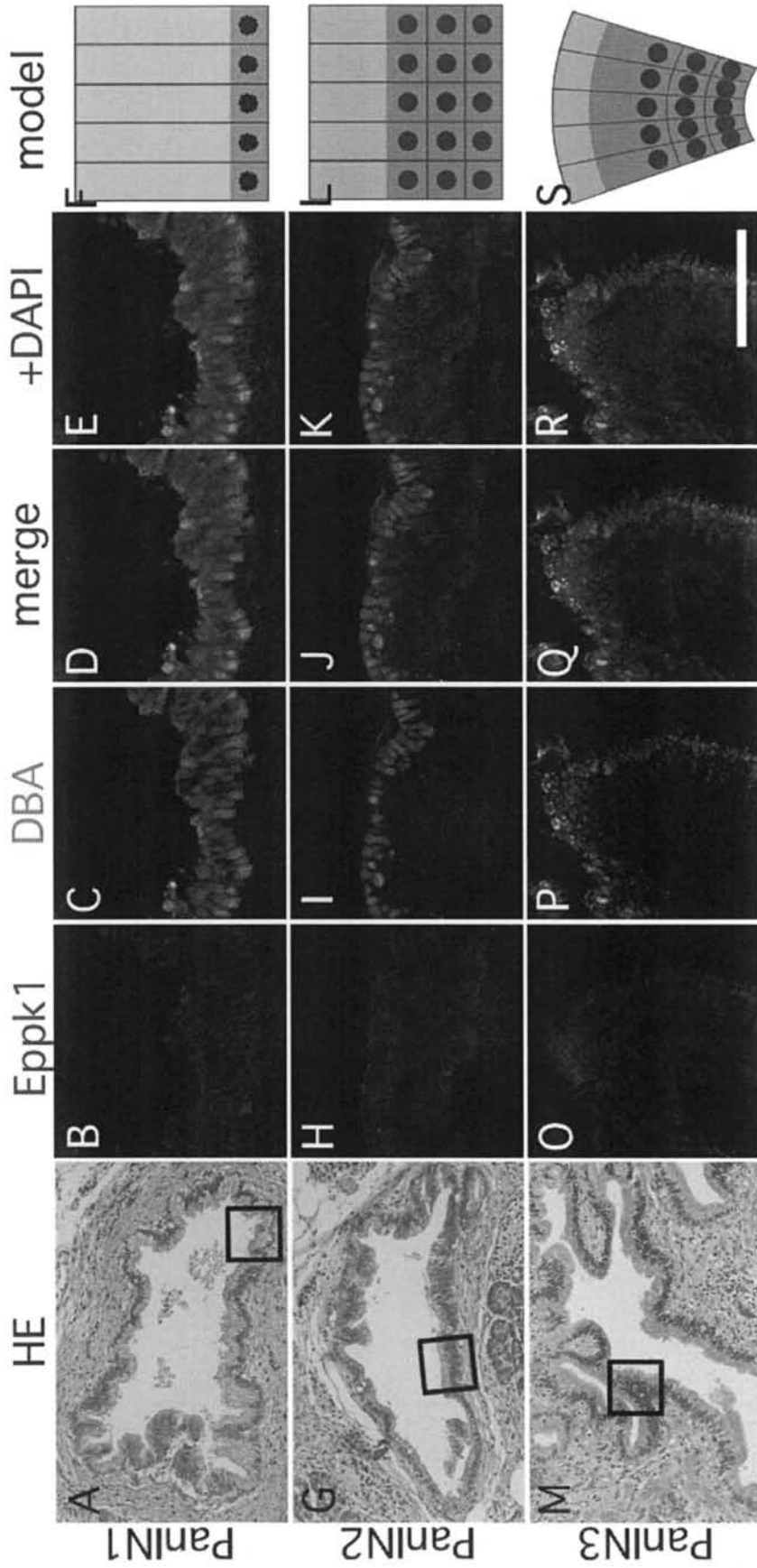
【 図 7 】



【 図 8 】

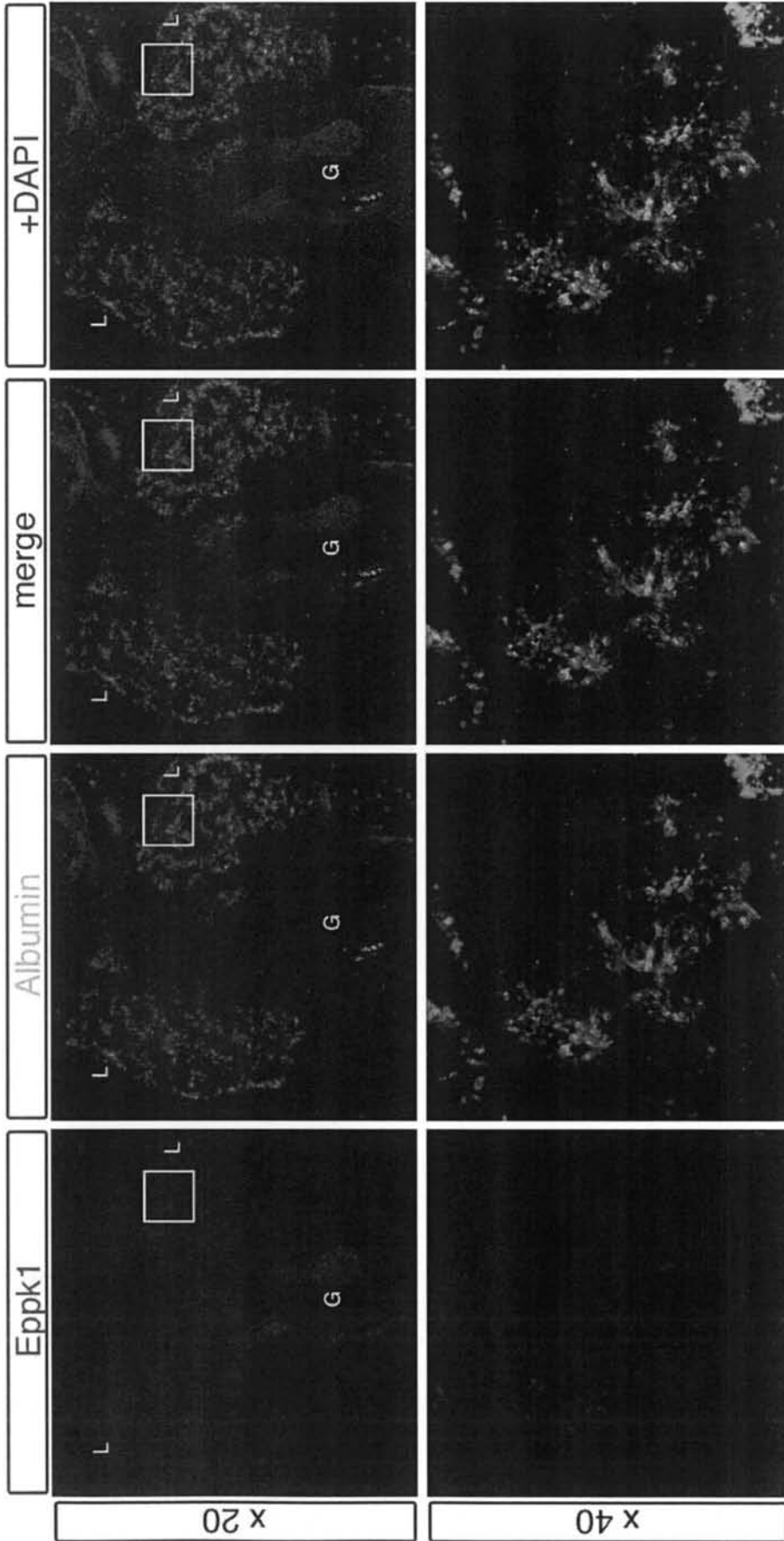


【 図 9 】

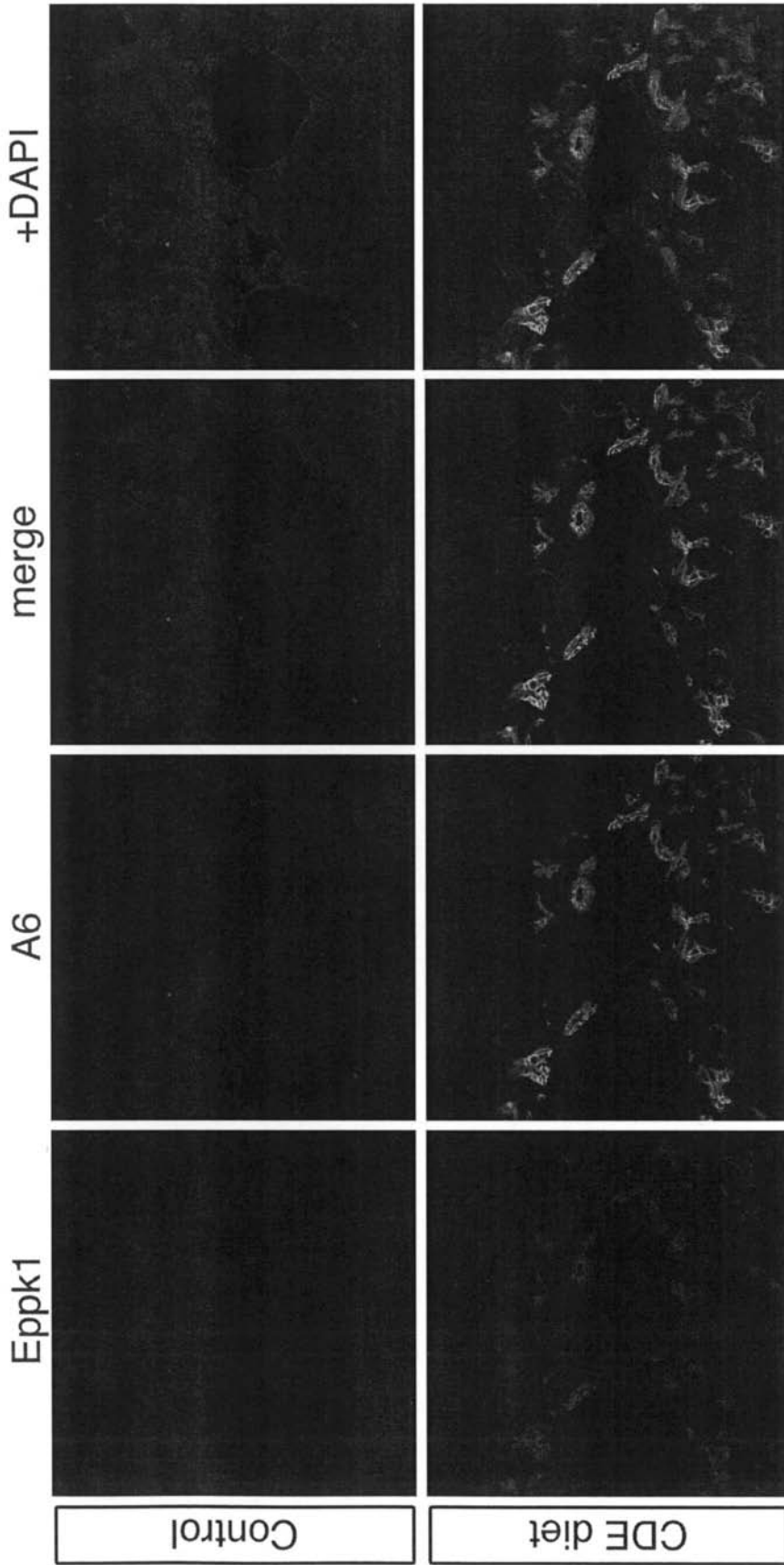




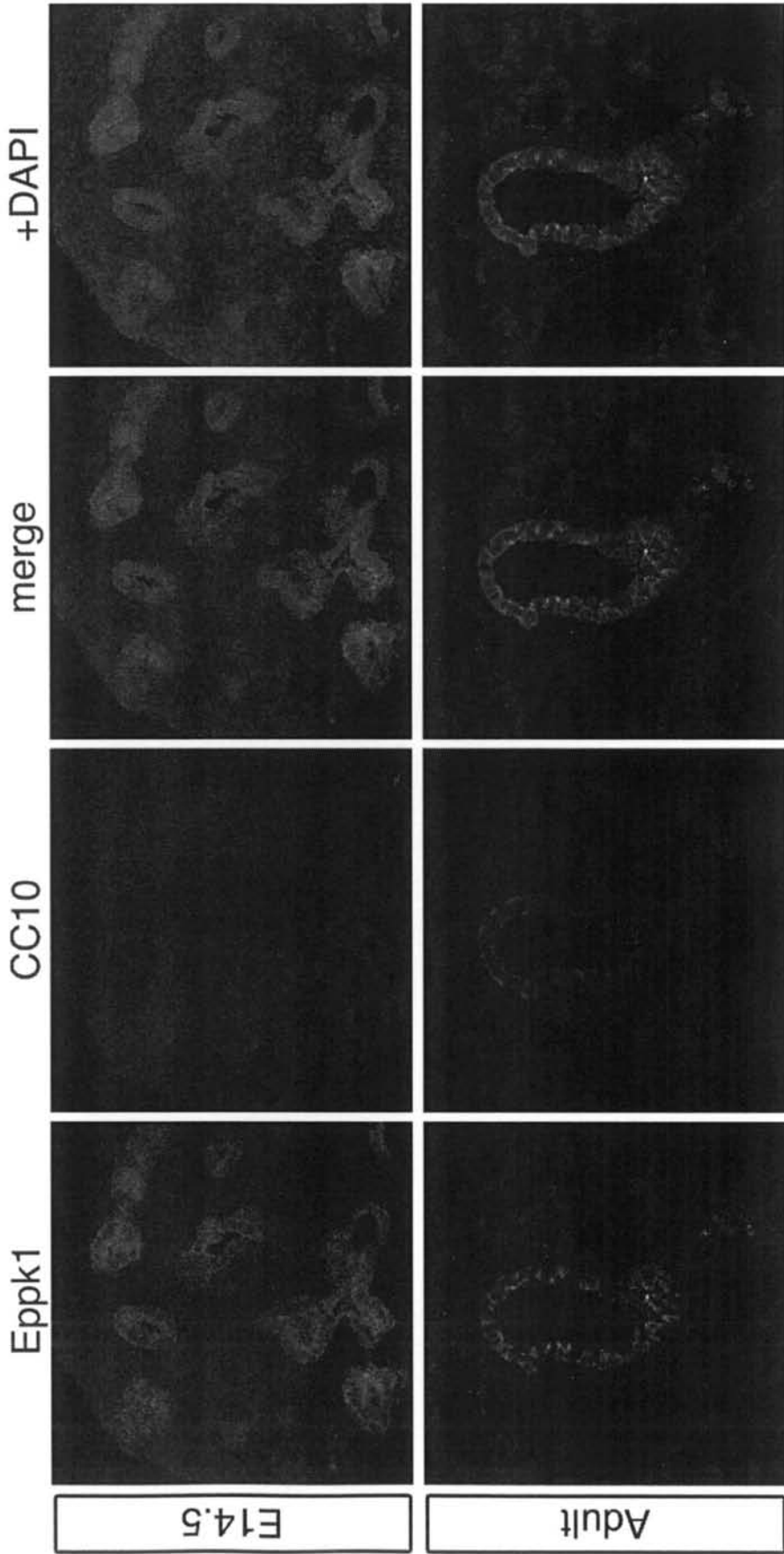
【 図 1 0 】



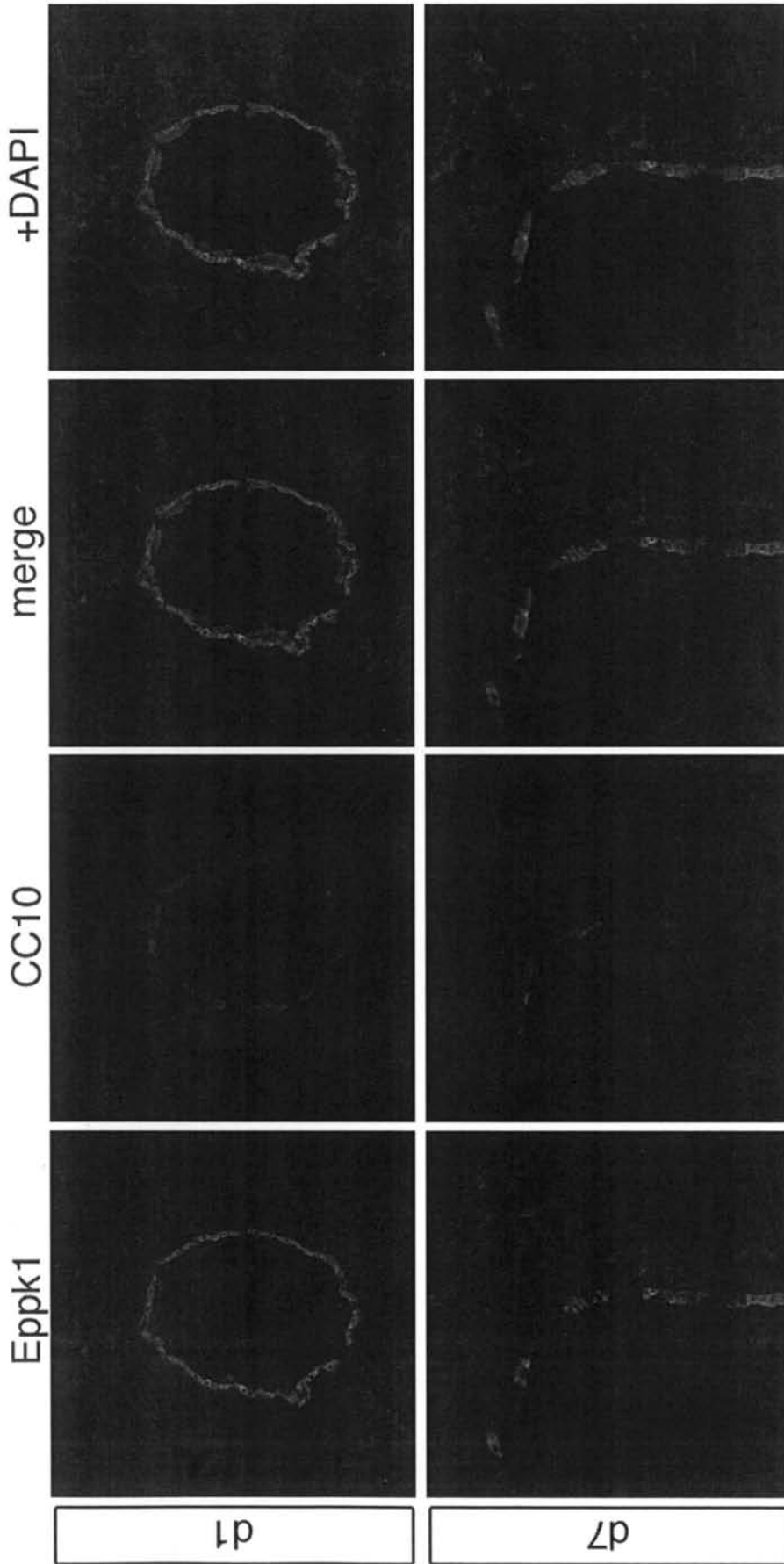
【 1 1 】



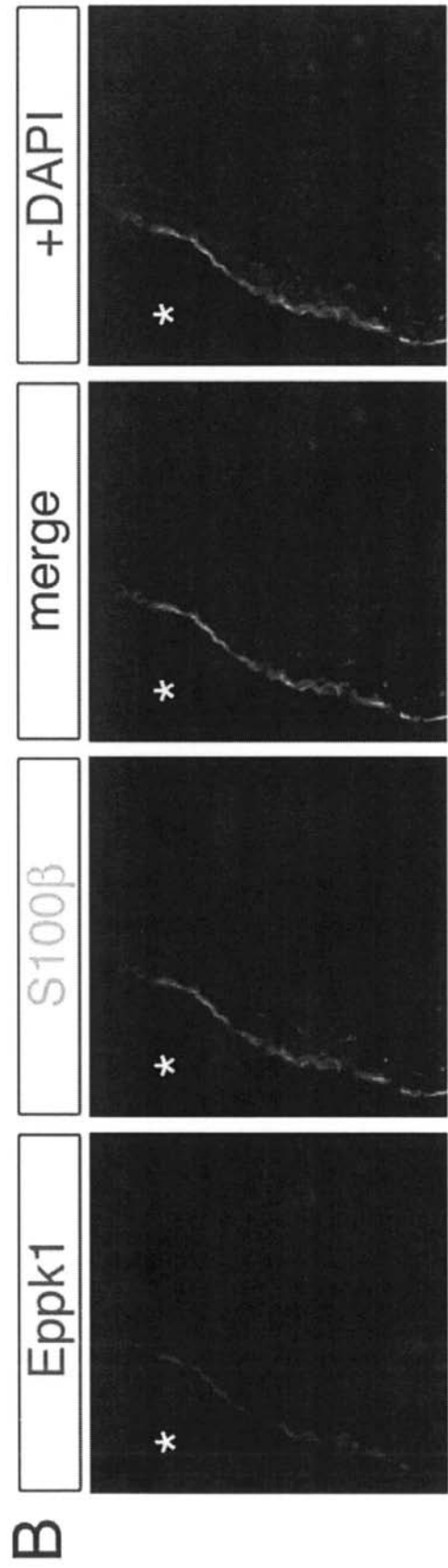
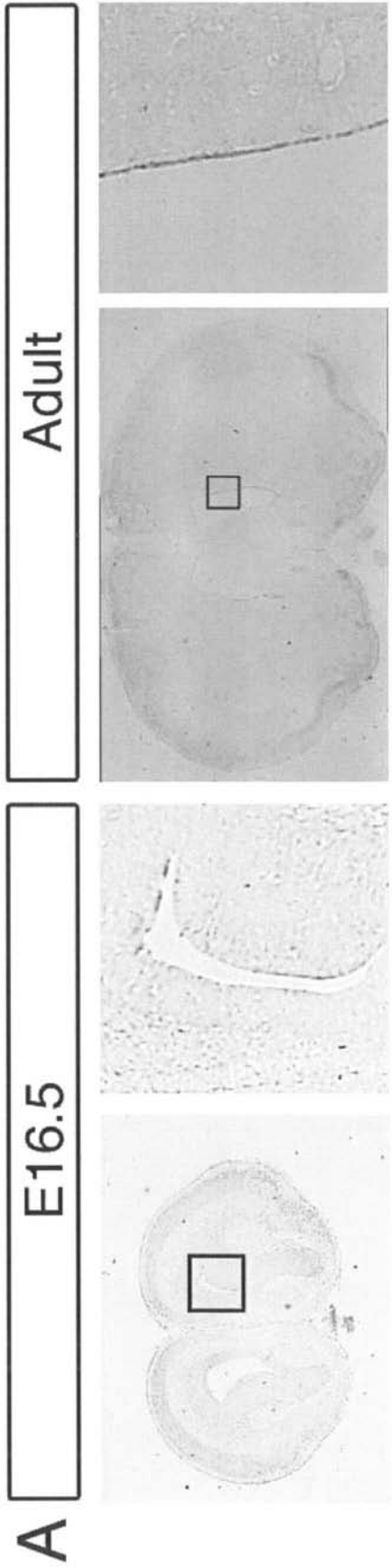
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 条 和彦

熊本県熊本市本荘2丁目2番1号 国立大学法人熊本大学内

(72)発明者 松尾 顕

熊本県熊本市本荘2丁目2番1号 国立大学法人熊本大学内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ08 QR48 QS33 QX01

4B065 AA90X AC20 BA25 BA30 CA44 CA46