

平成 29 年 4 月 24 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
平成 28 年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：国立がん研究センター研究所

職名：ユニット長

氏名：大木 理恵子

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能抑制を利用した膵島移植効率向上法の確立
2. 再生医科学研究所共同研究者： 角 昭一郎 准教授
3. 研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日
4. 研究経過及び研究成果：

研究代表者は PHLDA3 研究の第一人者である（**Cell**, Vol. 136, pp. 535-550, 2009 など）。また、一方で角昭一郎准教授は膵島研究の第一人者であり、本共同研究を行うことで分野の垣根を越えた融合領域の研究が推進可能となる。また、膵島移植の専門家である坂田直昭助教も研究チームに加え、**膵島を用いた膵島移植実験を行う**。お互いの得意分野を生かす事で、必ず糖尿病治療に結びつく、実り多い研究成果が得られると考えており、これまでに京都大学再生研共同研究として支援されている研究を PNAS に投稿し受理された（PNAS, 111 (23), E2404-E2413, 2014）。また、本研究課題に関わる特許を出願した（移植材料及びその調製方法、特願 2014-107529、PCT/JP2015/064792）。

膵島移植の際の最大の課題は、未だ低率の移植成績を向上させる事にあるが、現行の膵島分離法では、膵臓の消化による膵島への障害などにより、100%の膵島を確保する事は不可能である。加えて、分離された膵島は膵臓消化の影響で無血管状態となり虚血にされされる事、膵島分離行程により酸化ストレスが惹起され膵島を障害する事などの

理由から膵島のアポトーシスが誘導され、分離後よりその数は減少し、インスリン分泌能は著しく低下する。さらに、移植後（現行の方法では門脈内に直接投与する）には、血液凝固反応などによって惹起される炎症反応物質・細胞の影響や膵島自身が末梢門脈を塞栓する事で移植部位の虚血が助長される事により、移植した膵島の大部分が早期に失われる。われわれは門脈内移植された膵島の約 60%が失われる事を既報にて確認しており ([Islets, 1\(1\), 26-33, 2009](#))、このような膵島の脆弱性に PHLDA3 促進的に関与することも解明している ([PNAS, 111 \(23\), E2404-E2413, 2014](#)、[Sakata N, et al, submitted](#))。

我々は、これまで機能未知であった PHLDA3 遺伝子が、p53 によって誘導される遺伝子である事を見だし、PHLDA3 が p53 による Akt 抑制を担う重要な遺伝子である事を世界で初めて明らかにした ([Cell, Vol. 136, pp. 535-550, 2009](#))。PHLDA3 遺伝子は、細胞膜に存在するイノシトールリン脂質 (PIPs) との結合に働く PH ドメインのみから構成されるタンパク質をコードしている。一方、Akt も PH ドメインを持つタンパク質であり、活性化には PH ドメインを介して細胞膜に局在する事が必須である。PHLDA3 は、Akt のいわば内在的に発現する dominant negative 体として機能し、Akt と PIPs との結合を直接阻害する。その結果、Akt の細胞膜局在は阻害され、下流の生存シグナルは伝達されない (Fig. 1)。

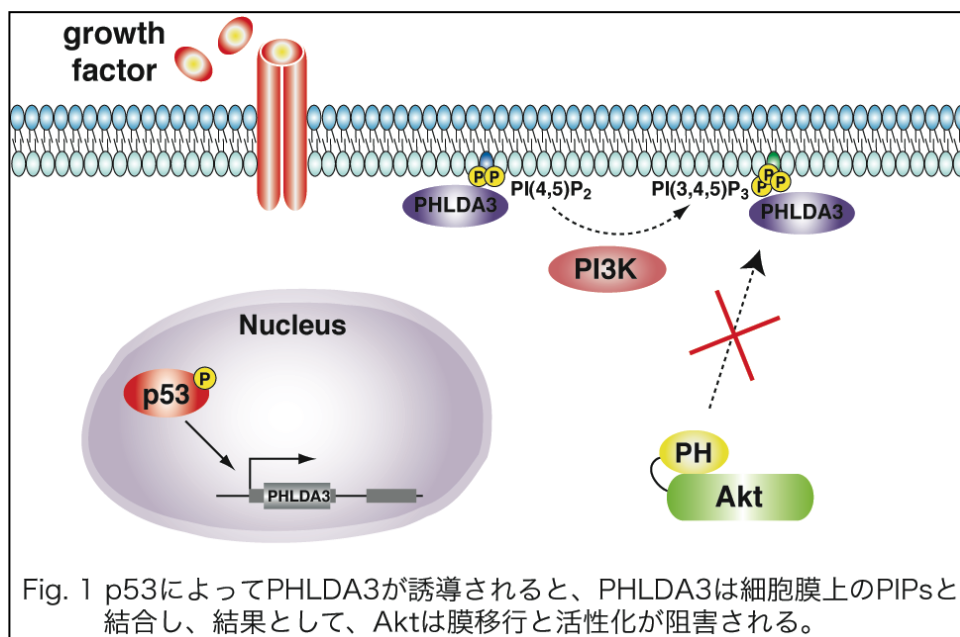


Fig. 1 p53によってPHLDA3が誘導されると、PHLDA3は細胞膜上のPIPsと結合し、結果として、Aktは膜移行と活性化が阻害される。

がん抑制において、非常に強いがん化促進能を持つ Akt の活性を制御する事はとても重要である。実際に PHLDA3 の発現を抑制した細胞では Akt の異常な活性化が認められるとともに、細胞ががん化 (足場非依存性の増殖能を獲得) している事が示され、PHLDA3 はがん抑制能を有する事が示された。さらに、ヒト肺及び膵内分泌腫瘍において PHLDA3 遺伝子の高頻度な欠損が認められた。これらのがん組織では正常組織と比較して PHLDA3 の発現低下と Akt 活性の上昇が認められ、PHLDA3 が内分泌腫瘍のがん抑制遺

伝子として機能していると考えられた。

一方で、PHLDA3 が膵内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子であるという事から、PHLDA3 が膵内分泌細胞の増殖を制御するのではないかと考え研究を進めている。これまでに膵島β細胞由来の細胞株 RIN 細胞、正常膵島細胞を用いて、膵β細胞において PHLDA3 が細胞増殖と Akt 活性を抑制している事を明らかにした。

さらには PHLDA3 欠損マウスにおいて膵島の過形成が認められており、PHLDA3 は膵島細胞の増殖を抑制する事が示された (Fig. 2)

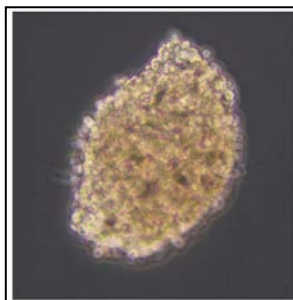
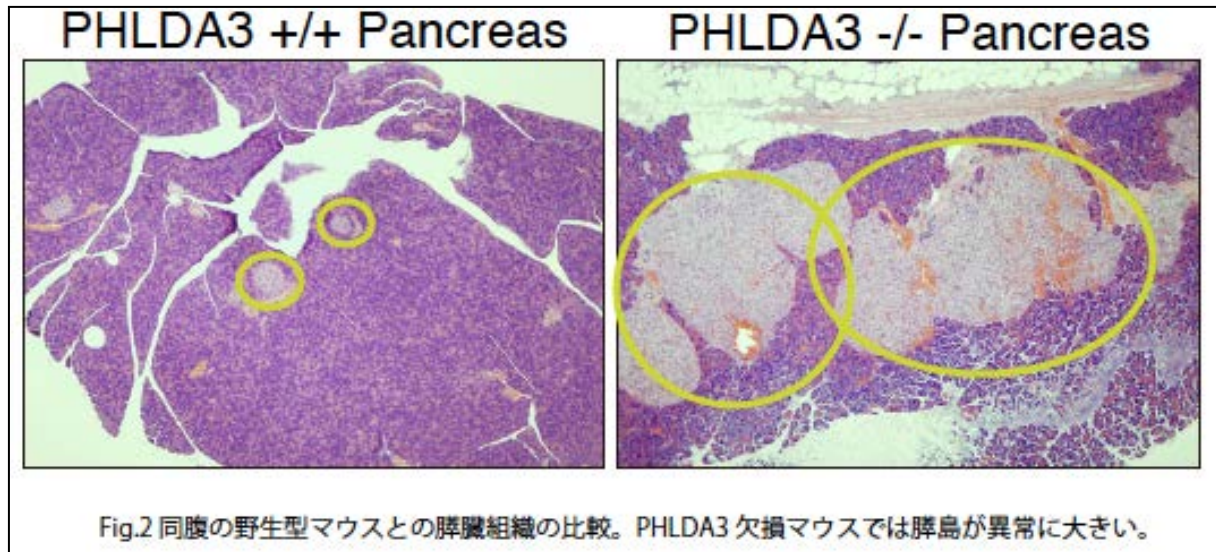
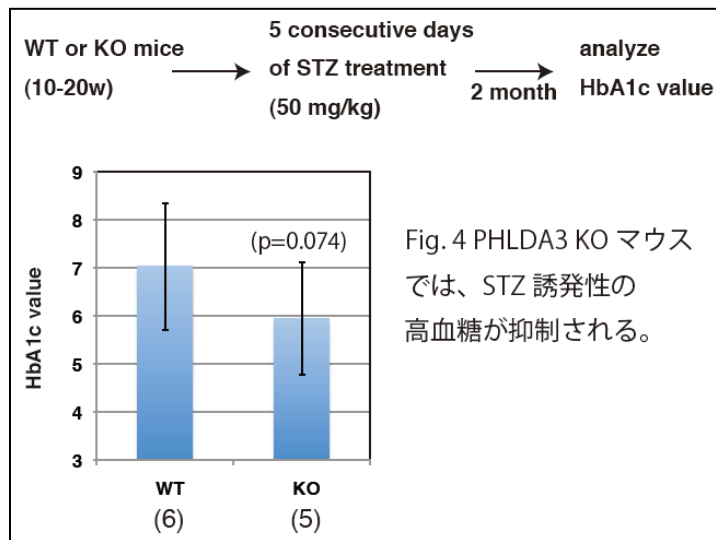


Fig.3 分離した rat 膵島

これまでに角昭一郎准教授との共同研究によって、分離膵島から得た膵島細胞を用い (Fig. 3)、PHLDA3 が膵島細胞において細胞増殖の抑制、アポトーシス誘導に機能する事を明らかにした。

また、PHLDA3 欠損マウスを用いて実験的に一型糖尿病を引き起こすと、PHLDA3 欠損マウスでは野生型マウスに比べ、顕著に血糖値の上昇が抑えられている事が示され (Fig. 4)、マウス生体内においても PHLDA3 が膵島細胞の増殖、アポトーシスを制御する事が示された。

今後さらに膵島機能に PHLDA3 がどのように関わるのか解析を進める事で、糖尿病研究、膵島移植に役立つ成果を得る事が可能である。さらには PHLDA3 機能を抑制した膵島を作り出し、再生医療の分野に役立てたいと考えている。



5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表、特許取得等

1. Sakata N, Yamaguchi Y, Yoshimatsu G, Unno M, Sumi S, Ohki R. PHLDA3 Deficiency Improves Islets Engraftment through the Suppression of Hypoxic Damage. submitted.

2. Ezawa I, Sawai Y, Kawase T, Okabe A, Tsutsumi S, Ichikawa H, Kobayashi Y, Tashiro F, Namiki H, Kondo T, Semba K, Aburatani H, Taya Y, Nakagama H, Ohki R. Novel p53 target gene FUCA1 encodes a fucosidase and regulates growth and survival of cancer cells. *Cancer Sci.* 2016;107:734-745. 査読あり

3. Asano Y, Kawase T, Okabe A, Tsutsumi S, Ichikawa H, Tatebe S, Kitabayashi I, Tashiro F, Namiki H, Kondo T, Semba K, Aburatani H, Taya Y, Nakagama H, Ohki R. IER5 generates a novel hypo-phosphorylated active form of HSF1 and contributes to tumorigenesis. *Sci Rep.* 2016;6:19174. 査読あり

4. Shirouzu Y, Yanai G, Yang KC, Sumi S. Effects of Activin in Embryoid Bodies Expressing Fibroblast Growth Factor 5. *Cell Reprogram.* 2016;18:171-186. 査読あり

5. Tsuchiya H, Sakata N, Yoshimatsu G, Fukase M, Aoki T, Ishida M, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Extracellular Matrix and Growth Factors Improve the Efficacy of Intramuscular Islet Transplantation. *PLoS One.* 2015;10:e0140910. 査読あり

6. Hata T, Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Fukase M, Ishida M, Aoki T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Cholestatic Liver Injury After Biliary Reconstruction Impairs Transplanted Islet Viability and Function. *Am J Transplant.* 2015;15:2085-2095. 査読あり

7. Sakata N, Sax N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Kato S, Aoki T, Ishida M,

Katayose Y, Egawa S, Kodama T, Unno M. Enhanced ultrasonography using a nano/microbubble contrast agent for islet transplantation. *Am J Transplant.* 2015;15:1531-1542.査読あり

8. Hata T, Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Fukase M, Ishida M, Aoki T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Nerve Growth Factor Improves Survival and Function of Transplanted Islets Via TrkA - mediated β Cell Proliferation and Revascularization. *Transplantation.* 2015;99:1132-1143.査読あり

9. 特許：明石 満、松崎典弥、海野倫明、坂田直昭、吉松軍平 人工組織及びその製造方法：PCT/JP2015/064792

10. Wang X, Li G, Koul S, Ohki R, Maurer M, Borczuk A, Halmos B. PHLDA2 is a key oncogene-induced negative feedback inhibitor of EGFR/ErbB2 signaling via interference with AKT signaling. *Oncotarget.* 2015. [Epub ahead of print]査読あり

11. Fujita T, Yuno M, Okuzaki D, Ohki R, Fujii H. Identification of non-coding RNAs associated with telomeres using a combination of enChIP and RNA sequencing. *PLoS One.* 2015;10:e0123387.査読あり

12. Kanamune J, Kim C-M, Iwanaga Y, Rivas-Carrillo JD, Sumi S, Uemoto S, Yokokawa K. Tissue complex of adult pancreatic duct and vascular endothelial cells promotes in vitro differentiation into insulin-producing cells. *Stem Cells Res. Devel. Ther.*2015;2:5-14.査読あり

13. 特許：角昭一郎、大木理恵子、坂田直昭 移植材料およびその調整法:PCT/JP2015/064792

14. Aoki T, Motoi F, Sakata N, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Miyazaki J, Unno M. Somatostatin analog inhibits the growth of insulinoma cells by p27-mediated G1 cell cycle arrest. *Pancreas.* 2014;43:720-729.査読あり

15. Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hata T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Strategy for clinical setting in intramuscular and subcutaneous islet transplantation. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014;30:1-10.査読あり

16. 特許：明石 満、松崎典弥、海野倫明、坂田直昭、吉松軍平 人工組織及びその製造方法：特願 2014-248292

17. Ohki R, Saito K, Chen Y, Kawase T, Hiraoka N, Saigawa R, Minegishi M, Aita Y, Yanai G, Shimizu H, Yachida S, Sakata N, Doi R, Kosuge T, Shimada K, Tycko B, Tsukada T, Kanai Y, Sumi S, Namiki H, Taya Y, Shibata T, Nakagama H. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:E2404-13.査読あり

18. Noguchi CCY, Furutani E, Sumi S. Mathematical model of glucose-insulin metabolism in type 1 diabetes including digestion and absorption of carbohydrates. *SICE Journal of Control, Measurement, and System Integration.* 2014;7:314-320.査読あり

19. Sumi S, Yanai G, Qi M, Sakata N, Qi Z, Yang KC, Shirouzu Y, Hiura A, Gu YJ, Inoue K. Review: Macro-encapsulation of islets in polyvinyl alcohol hydrogel. *J Med Biol Eng.* 2014;34:204-210. 査読あり

20. 特許：角昭一郎、大木理恵子、坂田直昭 移植材料およびその調整法: 特願 2014-107529

21. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Aoki T, Mizuma M, Motoi F, Katayose Y, Kodama T, Egawa S, Unno M. Imaging of transplanted islets by positron emission tomography, magnetic resonance imaging, and ultrasonography. *Islets.* 2013;5:179-187. 査読あり

22. Hata T, Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hayashi H, Motoi F, Goto M, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Postoperative cholestasis and cholangitis after total pancreatectomy with biliary reconstruction impair the function of autotransplanted islets. *Transplantation.* 2013;96:e40-43.

23. Sakata N, Goto M, Motoi F, Hayashi H, Nakagawa K, Mizuma M, Yamaya H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Sawada S, Ottomo S, Okada T, Fukase K, Yoshida H, Ito T, Hirota M, Ishigaki Y, Sekiguchi S, Rikiyama T, Katayose Y, Fujimori K, Egawa S, Shimosegawa T, Katagiri H, Satomi S, Unno M. Clinical experiences in the treatment of pancreatic arteriovenous malformation by total pancreatectomy with islet autotransplantation. *Transplantation.* 2013;96(5):e38-40. 査読あり

24. Yoshimatsu G, Sakata N, Tsuchiya H, Ishida M, Motoi F, Egawa S, Sumi S, Goto M, Unno M. Development of polyvinyl alcohol bioartificial pancreas with rat islets and mesenchymal stem cells. *Transplant Proc.* 2013;45:1875-1880. 査読あり

25. Fujita T, Asano Y, Ohtsuka J, Takada Y, Saito K, Ohki R, Fujii H. Identification of telomere-associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). *Sci Rep.* 2013;3:3171. 査読あり

26. Yanai G, Hayashi T, Qi Z, Yang KC, Shirouzu Y, Shimabukuro T, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Electrofusion of mesenchymal stem cells and islet cells for diabetes therapy: a rat model. *PLoS One.* 2013;8:e64499. 査読あり

27. Yang KC, Wu CC, Yang SH, Chiu CC, Sumi S, Lee HS. Investigating the suspension culture on aggregation and function of mouse pancreatic β -cells. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101: 2273-2282. 査読あり

28. Chen PY, Wu CC, Lu DH, Sumi S, Lin FH, Yang KC. Microenvironment-regulated gene expression, morphology, and in vivo performance of mouse pancreatic β -cells. *Process Biochemistry.* 2013;48: 58-67. 査読あり

29. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Egawa S, Unno M. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:256707. 査読あり

30. Sakata N, Goto M, Gumpei Y, Mizuma M, Motoi F, Satomi S, Unno M. Intraoperative ultrasound examination is useful for monitoring transplanted islets: a case report. *Islets*. 2012;4:339-342. 査読あり

31. Sakata N, Sumi S, Yoshimatsu G, Goto M, Egawa S, Unno M. Encapsulated islets transplantation: Past, present and future. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2012;3:19-26. 査読あり

32. Saito Y, Chan NK, Sakata N, Hathout E. Nerve growth factor is associated with islet graft failure following intraportal transplantation. *Islets*. 2012;4:24-31. 査読あり

33. Qi Z, Yamamoto C, Imori N, Kinukawa A, Yang KC, Yanai G, Ikenoue E, Shen Y, Shirouzu Y, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Immunoisolation effect of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes therapy. *Cell Transplant*. 2012;21:525-534. 査読あり

34. Sakata N, Chan NK, Chrisler J, Obenaus A, Hathout E. Bone marrow cell cotransplantation with islets improves their vascularization and function. *Transplantation*. 2010;89:686-693. 査読あり

35. Sakata N, Hayes P, Tan A, Chan NK, Mace J, Peverini R, Sowers L, Pearce WJ, Chinnock R, Obenaus A, Hathout E. MRI assessment of ischemic liver after intraportal islet transplantation. *Transplantation*. 2009;87:825-830. 査読あり

36. Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma S, Sakai R, Kawase T, Kitabayashi I, Taya Y, Ohki R. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *J Biol Chem*. 2011;286:18251-18260. 査読あり

37. Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura N, Inazawa J, Ohta T, Ichikawa H, Aburatani H, Tashiro F, Taya Y. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. *Cell*. 2009;136:535-550. 査読あり

38. Ohki R, Kawase T, Ohta T, Ichikawa H, Taya Y. Dissecting functional roles of p53 N-terminal transactivation domains by microarray expression analysis. *Cancer Sci*. 2007;98:189-200. 査読あり

39. Yang KC, Qi Z, Wu CC, Shirouzu Y, Lin FH, Yanai G, Sumi S. The cytoprotection of chitosan based hydrogels in xenogeneic islet transplantation: An in vivo study in streptozotocin-induced diabetic mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393: 818-823. 査読あり

40. Qi Z, Shen Y, Yanai G, Yang K, Shirouzu Y, Hiura A, Sumi S. The in vivo performance of polyvinyl alcohol macro-encapsulated islets. *Biomaterials*. 2010;31: 4026-4031. 査読あり

41. Sakata N, Gu Y, Qi M, Yamamoto C, Hiura A, Sumi S, Sunamura M, Matsuno S, Inoue K. Effect of rat-to-mouse bioartificial pancreas xenotransplantation on

diabetic renal damage and survival. *Pancreas*. 2006;32:249-57.査読あり

42. Qi M, Gu Y, Sakata N, Kim D, Shirouzu Y, Yamamoto C, Hiura A, Sumi S, Inoue K. PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas. *Biomaterials*. 2004;25:5885-5892.査読あり