

平成 21 年 4 月 30 日 現 在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590173

研究課題名（和文） 培養系を用いた中胚葉組織（平滑筋、骨格筋）分化機構の解明

研究課題名（英文） Investigation of the differentiation mechanism of mesodermal tissues (smooth muscles and skeletal muscles) using in vitro culture system.

研究代表者

鳥橋 茂子 (TORIHASHI SHIGEKO)

名古屋大学・医学部（保健学科）・教授

研究者番号：90112961

## 研究成果の概要：

平滑筋と骨格筋の分化シグナルについて研究した。消化管の平滑筋の分化には骨形成蛋白質（BMP2）と、血小板由来成長因子（PDGF）が関わることがわかった。外縦走筋になる細胞が BMP2 を産生して、内輪走筋の分化を誘導する。次に内輪走筋は PDGF を産生放出して逆に外縦走筋細胞への分化を誘導するという相互作用が生じることを初めて明らかにした。マウス ES 細胞から間葉系幹細胞を作成し、この細胞から骨格筋細胞を分化する方法を確立した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：分化、平滑筋、骨格筋、間葉系幹細胞、ES細胞、PDGF、BMP、ICC

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで消化管平滑筋層の形態学、生理学、発生学の研究を行ってきた。そして消化管平滑筋層には特殊平滑筋である自動運動のペースメーカー細胞（カハールの介在細胞）が存在し、その分化は平滑筋の発生と密接な関係があることを明らかにした。さらにマウス胚性幹細胞（ES細胞）

を用いて in vitro の発生モデルとしての腸管様構造、平滑筋組織の形成法を確立した。

本研究ではこれらの成果や実験系を発展させ、培養系を用いて中胚葉組織、特に「腸管平滑筋」および、「骨格筋」の発生機構を解析する。

## 2. 研究の目的

(1) 消化管平滑筋層の発生を明らかにする

申請者は消化管の平滑筋細胞とペースメーカー細胞 (ICC) が共に中胚葉性の細胞に由来し、さらに両細胞系は癌原遺伝子 *c-kit* を発現する共通の前駆細胞から胎生後期に分化することを明らかにした。しかし前駆細胞から ICC と平滑筋細胞が分化する段階で、ICC は *c-KIT* シグナル依存性に分化するが、平滑筋細胞はこれを必要としない。そこで、*c-KIT* 以外の平滑筋分化誘導シグナルを明らかにする。

#### (2) 骨格筋細胞の分化シグナルの解明

申請者はマウス ES 細胞を用いた *in vitro* の培養系で、平滑筋細胞へと分化する細胞群の一部に、しばしば骨格筋細胞が分化してくることを観察している。従って、両細胞の発生メカニズムはその初期で共通していることが想像される。また骨格筋の筋芽細胞は分裂停止とともに、細胞融合を生じる。従って増殖停止を誘導する因子は筋芽細胞から骨格筋細胞への分化を決定する事が推測される。これについて明らかにする。

### 3. 研究の方法

目的達成のために異なった2つの培養系を用いる。

#### (1) 平滑筋の分化シグナル解析

マウス胎児の腸管を用いた器官培養および、マウス ES 細胞から形成する「腸管様構造」を使用する。ICC の発生に必須の *c-KIT* に類似した構造をもつ PDGF シグナル系の発現パターンを解析し、胎児腸管の器官培養系を利用して、PDGF の阻害実験を試みる。さらに血管の分化、増殖に関わる BMP シグナル系の発現パターンを解析した上で、ローカルシグナルである BMP を吸着したアガロースビーズを用いて、マウス ES 細胞由来の「腸慣用構造」における、平滑筋と ICC に対する効果を検定する。

(2) マウス ES 細胞から骨格筋を分化誘導する ES 細胞から、間葉系幹細胞を作成し、これを用いてさらに平滑筋と骨格筋への分化誘導法を確立する。さらに、*in vitro* の系でよく使われる、マウス筋芽細胞株、C2C12 と ES 細胞由来の骨格筋細胞との骨格筋分化の相違点を明確にする。

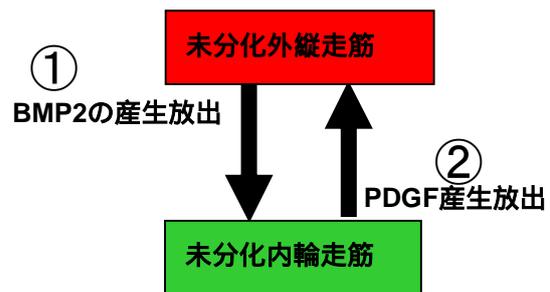
### 4. 研究成果

#### (1) 消化管平滑筋分化に PDGF 系が関与する

胎児期の腸管には PDGF が豊富に存在する。そして、そのレセプターは将来の外縦走筋部位で一過性に発現する。その時期に PDGF シグナルを阻害すると、平滑筋への分化が阻害されて、ICC 類似の細胞が出現した。

#### (2) BMP2 シグナルが平滑筋細胞と ICC の共通前駆細胞を増殖させる

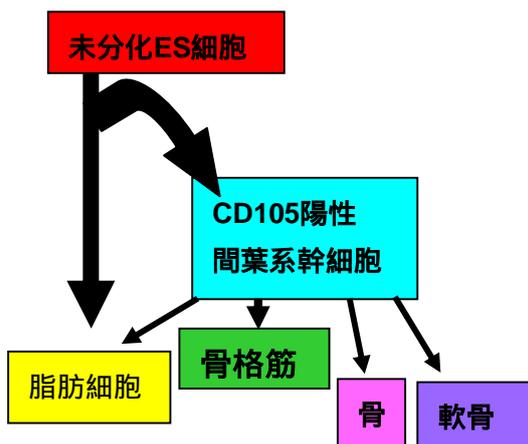
BMP シグナルやそのレセプターも胎児期の消化管に豊富に存在する。BMP2 を添加したところ、ES 細胞由来の腸管様構造における平滑筋や ICC を増加させ、自動運動が亢進した。逆に BMP2 シグナルを抑制すると、平滑筋や ICC の出現は減少した。消化管筋層の分化機構に BMP シグナルが関与することはこれまでに無い全く新しい知見である。さらに、この BMP2 のシグナルの活性化は PDGF シグナルの量を増大させた。これらをまとめて、下図に示されるような消化管壁におけるシグナルカスケードの存在が示唆された。



### (3) マウス ES 細胞由来 間葉系幹細胞の形成

平滑筋や骨格筋を含む、様々の間葉系細胞に分化する能力を有する間葉系幹細胞は骨髄に少数存在する。しかし、同様の性質を示す幹細胞が脂肪組織に大量に存在することがわかり、再生医療の材料として注目されている。しかし、これを高純度に採集するのは難しい。そこで、マウス ES 細胞から脂肪細胞を分化誘導する課程で細胞マーカーとして CD105 を指標として間葉系幹細胞を採集する方法を確立した。

さらに、この細胞を下図のように骨格筋細胞へと分化誘導することができた。この間葉系幹細胞を骨格筋細胞以外の間葉系細胞、すなわち、軟骨、骨、脂肪細胞へと分化誘導できたことからこれが、脂肪細胞由来の間葉系幹細胞と同等の細胞であると考えた。今後この幹細胞から骨格筋細胞への分化シグナルを明らかにする。



### (4) ES 細胞由来の骨格筋細胞は C2C12 よりも成熟した骨格筋細胞まで分化する

ES 細胞から作成した骨格筋細胞は長期間の培養が可能であった。骨格筋細胞の分化過程で、タイプアクチンの構成が心筋型から骨格筋型へと入れ替わることが知られて

いるが、これを免疫蛍光染色法で明瞭に示すことができた。さらにマウスの骨格筋芽細胞 C2C12 と比較したところ、ES 細胞由来の骨格筋細胞のほうが、より成熟した骨格筋細胞まで分化した。その結果、タイプアクチンの構成が完全に骨格筋型に移行し、C2C12 では見られない収縮運動が観察された。従って、これまで骨格筋分化の研究に多く用いられてきた C2C12 細胞株よりも ES 細胞由来の骨格筋細胞のほうがより骨格筋分化の研究に適していることがわかった。今後これを踏まえて、骨格筋細胞の分化機構の研究をこの ES 細胞の分化誘導系を用いて発展させていく予定である。

### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Torihashi S, Hattori T., Hasegawa H., Kurahashi M., Ogaeri T., Fujimoto T.: The expression and crucial roles of BMP signaling in development of smooth muscle progenitor cells in mouse embryonic gut. *Differentiation* 77(3):277-289 (2009) 査読あり

鈴木麻友、水野陽太、蜷川菜々、八木保、鳥橋茂子 マウスES細胞を用いた骨格筋細胞の発生モデル 理学療法医学的基礎 12 (2) (2009 )印刷中 査読あり

Kurahashi M, Niwa Y, Cheng J, Ohsaki Y, Fujita A, Goto H, Fujimoto T, Torihashi S, PDGF signals play crucial roles in differentiation of longitudinal smooth muscle cells in mouse embryonic gut. *Neurogastroenterol Motil* (2008) 20:521-531 査読あり

Yates C, Charlesworth A, ReeseN, Ishida K, Skinner R, Garcia-Rill E.: Modafinil normalized hyperreflexia after spinal transection in

adult rats. *Spinal Cord* (2008) 1-5 on line  
査読あり

Torihashi S, Masaki Kuwahara & Masaaki  
Kurahashi : In vitro developmental model of  
the gastrointestinal tract from mouse embryonic  
stem cells. *Nagoya J Med Sci* (2007) 69  
(3-4) :133-137 査読あり

Sato K, Torihashi S, Hori M, Nasu T, Ozaki  
Phagocytotic Activation of Muscularis Resident  
Macrophages Inhibits Smooth Muscle  
Contraction in Rat Ileum. *J Vet Med Sci* (2007)  
69(10):1053-1060 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

鳥橋茂子、他 4 名 ; ES細胞から分化した骨格  
筋細胞とactin isoformの発現. 第114回日  
本解剖学会総会 岡山 2009年3月28日

鳥橋茂子、他 4 名 ; Expression pattern of  
BMP signaling in the mouse embryonic gut and  
their roles in the smooth muscle differentiation.  
第41回日本発生生物学会総会 徳島  
2008年5月28日

石田和人; 脊髄損傷モデルラットにおける  
自転車式他動運動の後肢過反射抑制効果.  
第43回日本理学療法学会大会 福岡 2008  
年5月15日

Torihashi S.; In vitro gut formation from  
mouse ES cells as a useful tool for  
developmental study. The 21<sup>st</sup> International  
Symposium in Neurogastroenterology and Motility.  
Jeju, Korea 2007年9月4日

鳥橋 茂子; 消化管平滑筋層の発生に関わる  
PDGFシグナル 日本解剖学会第112回全国  
学術集会 シンポジウム 大阪 2007年3月27日

〔図書〕(計 2 件)

石田和人 理学療法MOOK 第16巻 脳  
科学と理学療法,三輪書店 243 (内41-49)  
2009年

天野修、千田隆夫、鳥橋茂子 監訳

人体解剖カラーリングブック 丸善株  
式会社 2008年 総ページ 219

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1 件)

名称:多能性幹細胞から分化した間葉系幹細胞  
およびその産生方法

発明者:鳥橋 茂子、蜷川 菜々

権利者:名古屋大学

種類:特願

番号:2008-109002

出願年月日:平成20年4月18日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ:

<http://plaza.umin.ac.jp/~st-home/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鳥橋 茂子 (TORIHASHI SHIGEKO)

名古屋大学・医学部(保健学科)・教授

研究者番号:90112961

### (2)研究分担者

石田 和人 (ISHIDA KAZUTO)

名古屋大学・医学部(保健学科)・講師

研究者番号:10303653

肥田 朋子 (KOEDA TOMOKO)

名古屋学院大学・人間健康学部・准教授

研究者番号:20223050