

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22946

研究課題名(和文) 組織幹細胞由来の胚子様構造体から得た各種原基の採取・保存法

研究課題名(英文) Method for collecting and preserving various organs / viscera obtained from embryo-like structures derived from tissue stem cells

研究代表者

沖 明典 (Oki, Akinori)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60334067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：各種器官臓器の機能不全を再生医療による移植で治療する方法を開発することを目的に、万能細胞の存在が示唆される歯髄幹細胞に着目した。ヒトの歯髄幹細胞を天蓋培養し胚様体を作製した。この胚様体を胚子成長因子(EmbGF)を添加した培養液で還流培養し、心拍動を認める胚子様構造体を作製した。胚子様構造体内に確認された器官・臓器の原基は、心臓、肝臓、消化管、神経管(脈絡叢を含む)、網膜、腎臓、消化管、呼吸器、皮膚、骨格筋、動静脈、骨・軟骨、歯胚等であった。肝臓中には原始血球集団が認められた。各種器官・臓器の原基はDMSOフリーのクライオスカーレスで液体窒素中に保存できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植後の腫瘍形成がない組織幹細胞であるヒト歯髄幹細胞から、EmbGFを用いて胚子様構造体を作製し、この中に存在する各種器官・臓器の原基を採取することに成功した。これらの原基はそれらを構成する細胞をone set含有している。そこで、これら原基を機能不全に陥っている器官・臓器に移植すれば、長期にわたって高い機能の回復が期待できる。ここに本研究の学術的意義がある。また、本研究から得られたノウハウを用いて、HLAホモドナーの歯髄細胞から胚子様構造体を作製し、各種器官・臓器の原基が得られれば、他家移植可能な再生医療を提供でき、その社会的意義は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of developing a method for treating dysfunction of various organs by regenerative transplantation therapy, we focused on dental pulp stem cells, which suggest the existence of totipotential cells. Human dental pulp stem cells were cultured with hanging-drop method to prepare embryoid bodies. This embryoid body was cultured using circumfusion apparatus in a culture medium containing embryo growth factor (EmbGF) to prepare an embryoid-like structure in which heartbeat was observed. The primordia of various organs/ viscera were found in embryonic structures. The primordia of organs/viscera are as follows : heart, liver, gastrointestinal tract, neural tube, retina, kidney, gastrointestinal tract, respiratory organs, skin, skeletal muscle, arteries and veins, bone / cartilage, tooth germ, etc. A primordial blood cell population was found in the liver. The primordia of various organs/viscera were DMSO-free CryoScarless and could be stored in liquid nitrogen.

研究分野：産婦人科学

キーワード：歯髄幹細胞 胚様体 胚子様構造体 胚子成長因子 器官・臓器の原基

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 従来、再生医療の細胞源として iPS 細胞、ES 細胞が使用されてきた。しかし、これらの細胞には、移植後の腫瘍形成の問題や、倫理の問題がある。そこで腫瘍化の問題のないかつ倫理の問題の少ない組織幹細胞を用いた研究が広く行われてきた。

(2) しかし、分化誘導した細胞のフェノタイプの安定性や移植後の機能の継続性に問題がでてきた。

### 2. 研究の目的

分化誘導した細胞を移植した後も腫瘍形成の心配のないフェノタイプが長期間安定した細胞を得ることを目的とする。そのためには、

(1) 腫瘍化の問題を解決するため、我々は組織幹細胞を使うことにした。また、組織幹細胞のうち万能細胞(ミューズ細胞)の存在が示唆されているヒト歯髄細胞を使用することにした。

(2) フェノタイプの不安定性また移植後の機能の消失の原因は、目的の細胞に分化誘導した 1 種類の細胞だけを移植することに起因するのではないかと考えた。機能不全に陥っている器官・臓器は血管網を含む多種の細胞から構成されている。そこで器官・臓器を構成する多種の細胞を one set 分化誘導する方法を考えた。それらの問題を解決するために、本研究では腫瘍形成の全くない、歯髄幹細胞から各種の器官・臓器の構成細胞を one set 含有している原基を得ようと考えた。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトの歯髄初代培養細胞から薄撒き法で歯髄幹細胞を得た。この幹細胞を天蓋培養して胚盤胞に似た胚様体を作製した。

(2) この胚様体を我々が開発した胚子成長因子(EmbGF)を添加した培養液で 30 日間還流培養して、心拍動を認める胚子様構造体の成育に成功した(特許準備中)。

### 4. 研究成果

(1) この胚子様構造体内には、各種の器官・臓器の原基が存在していた。しかし、各種器官・臓器の原基の数や存在(様式)部位は様々であった。心拍動を認めない胚子様構造体の発育は心拍動のあるものに比べ未熟のものが多かった。胚子様構造体内に確認された器官・臓器の原基は、心臓、肝臓、消化管、神経管(脈絡叢を含む)、網膜、腎臓(中腎)、消化管(杯細胞)、呼吸器(線毛上皮と杯細胞)、皮膚(毛根を含む)、骨格筋(一方向に配列する筋芽細胞を含む)、動静脈、骨・軟骨、歯胚等であった(主な器官・臓器の原基を図に示す)。

(2) 網膜原基は神経管の近くに存在し、そこには神経細胞層と色素上皮層が存在した。これらの器官・臓器の原基は、本来それらを構成する細胞を one set 有しており、しかも血管網も有しているので、機能不全に陥っている器官・臓器に移植すれば、高い機能回復が長期間望めるはずである。

(3) 消化管原基を生理活性物質 X 添加培養液(特許準備中)で培養すると、ここから芽出する形で膵臓を得ることができた。

(4) 肝臓原基中には原始血球集団(造血組織)が認められた。この造血組織から骨髄様組織を再生することが可能と思われる。また肝臓原基には肝臓を構成する少なくとも 7 種類の細胞が存在していると思われる。

(5) 心拍動する心臓原基からは心筋細胞、毛細血管網、刺激伝導系や弁膜も採取できる。

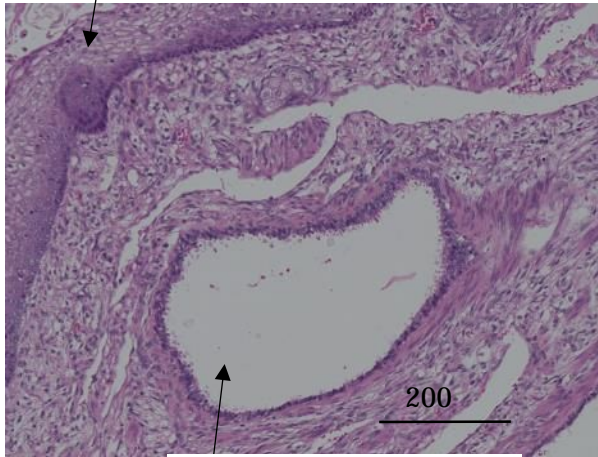
(6) 各種器官・臓器の原基を分散培養し DMSO フリーのクライオスカーレスを用いて液体窒素中に保存することが可能であった。

(7) 今後、筑波大学内の細胞バンクに寄託することを検討する。

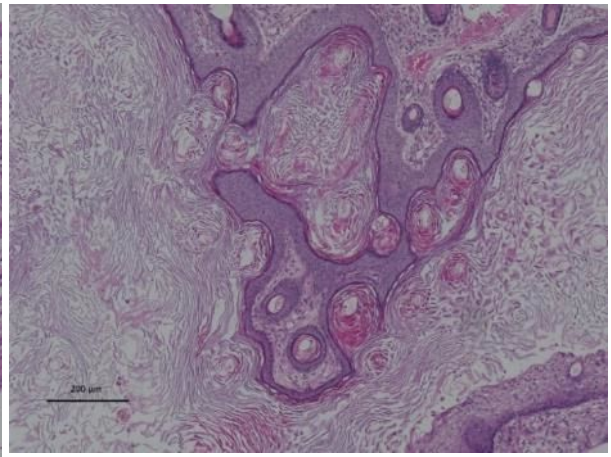
EmbGF ならびに各種器官・臓器採取法に関しては、「器官原基含有移植材料を製造する方法」で特許準備中である。

<引用文献> なし

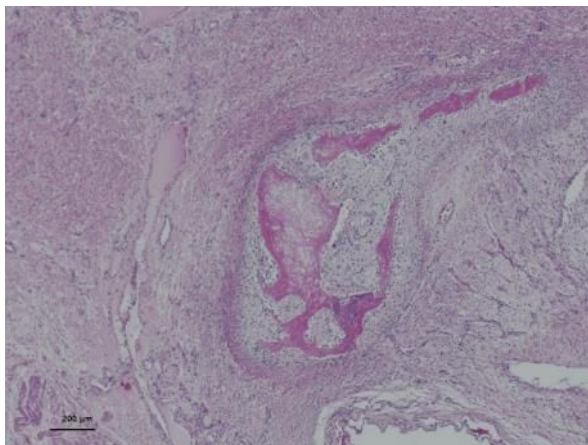
重層扁平上皮



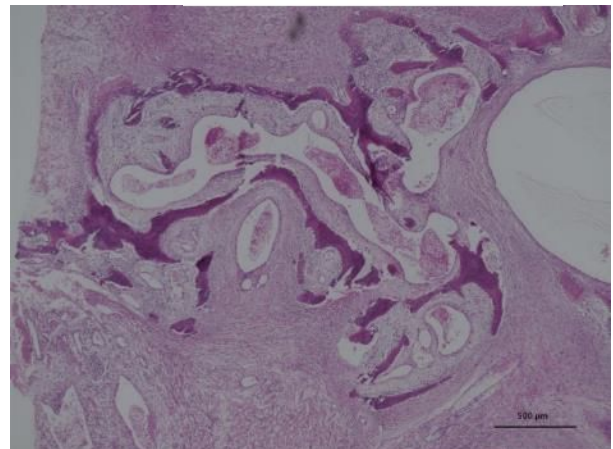
アポクリン腺



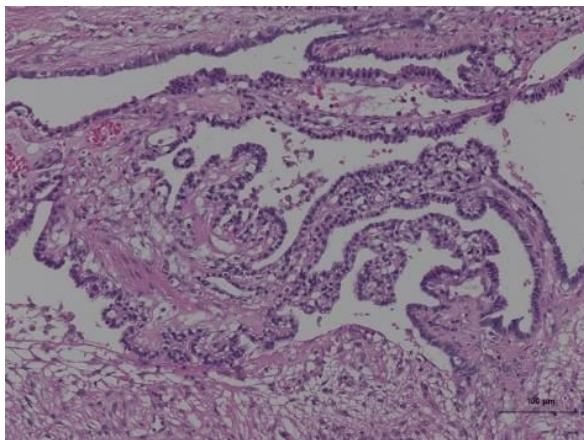
重層扁平上皮と毛包



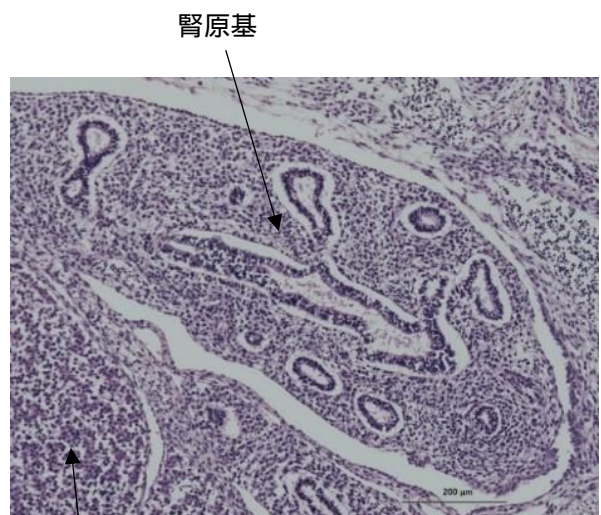
軟骨内骨化



骨(膜性骨化)



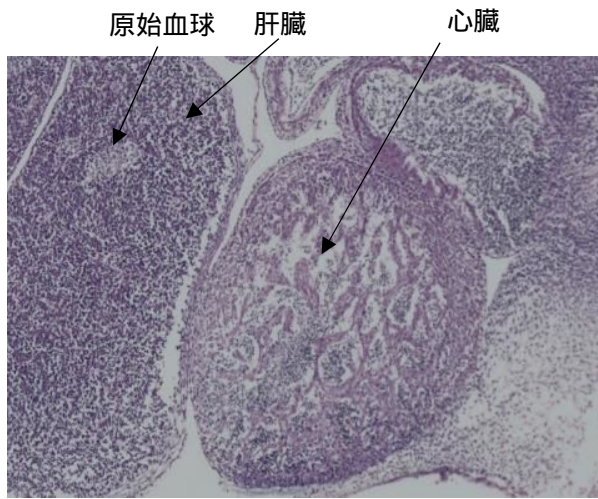
肺原基



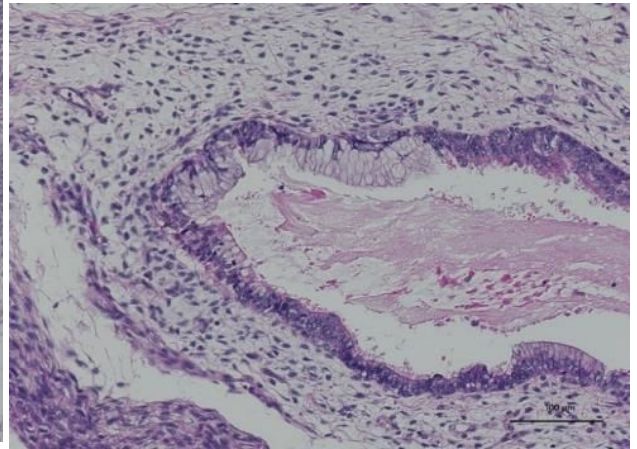
肝細胞索

腎原基と肝臓

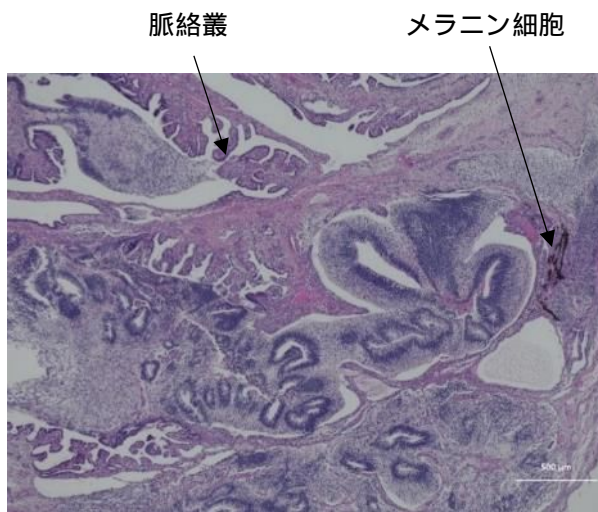




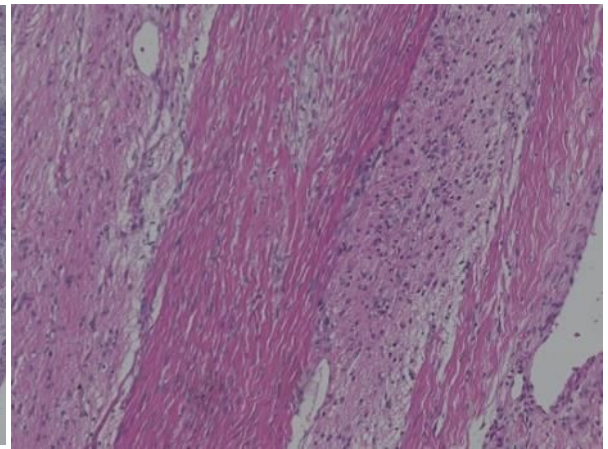
肝臓と心臓



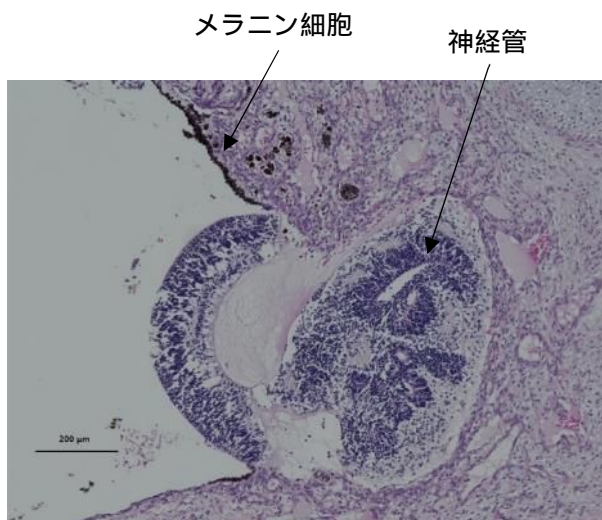
消化管



神経管と脈絡叢



骨格筋(縦断)



網膜と神経管

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 博  (Ishikawa Hiroshi)  (30089784)	筑波大学・医学医療系・研究員   (12102)	
研究分担者	丸島 愛樹  (Marushima Aiki)  (40722525)	筑波大学・医学医療系・講師   (12102)	
研究分担者	松丸 祐司  (Matsumaru Yuji)  (70323300)	筑波大学・医学医療系・教授   (12102)	
研究分担者	豊村 順子  (Toyomura Junko)  (80645630)	筑波大学・医学医療系・研究員   (12102)	
研究分担者	松村 明  (Matsumura Akira)  (90241819)	筑波大学・医学医療系・客員教授   (12102)	
研究分担者	大山 晃弘  (Ohyama Akihiro)  (90538232)	筑波大学・医学医療系・研究員   (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------