

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～2008

課題番号：19591492

研究課題名（和文）

脂肪由来幹細胞の肝細胞特異的分化誘導における微小重力環境の影響

研究課題名（英文） Effect of microgravity on hepatic differentiation from mouse adipose-derived stem cells (ADSC)

研究代表者

山田高嗣（Takatsugu Yamada）

奈良県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：20316061

研究成果の概要：

脂肪由来幹細胞から微小重力環境下に肝細胞を分化誘導するための準備実験として、懸垂培養を用いた ES 細胞の分化誘導研究を行った。培養 21 日目に蠕動運動能を有する腸管とその周囲に腸管神経および三次元構築をもつ肝細胞群を認めた。さらに、無血清培養を行うと、神経堤幹細胞の出現を認め、GDNF 下で培養すると腸管神経を分化誘導することができた。本研究は、発生学的に肝臓が原腸から分化することを考えると、脂肪由来幹細胞から微小重力下に肝細胞つくるといふ命題にとって重要かつ画期的な発見であると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
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：外科系臨床医学・外科系一般

キーワード：脂肪由来幹細胞、肝細胞、腸管、微小重力環境、分化誘導

1. 研究開始当初の背景

宇宙医学研究の進歩により、生体の臓器の分化や発育には地球上の『重力』が重要な役割を果たしていることがわかってきた。また近年、脂肪組織にも骨髄由来の間葉系幹細胞と同様に多分化能を有する脂肪由来幹細胞が存在することが報告され、ES 細胞や骨髄幹細胞に代わる再生医療の全く新しい細胞供給源であると期待されつつある。そこで、安全かつ簡単に採取できる脂肪細胞に着目し、脂肪由来幹細胞からの肝細胞特異的分化誘導の研究を計画した。

2. 研究の目的

我々は脂肪由来幹細胞から微小重力環境下に肝細胞を分化誘導するための準備実験として、in vitro での臓器分化誘導において、『重力』の影響を評価するための対象モデル培養系として、重力環境を必要とする hanging drop culture（懸垂培養系）での embryoid body (EB) を用いて、多能性を有する ES 細胞から肝細胞および蠕動運動能を有する腸管、さらには腸管神経系・神経堤幹細胞への分化誘導に関する研究を行うことが必要であるものと考えられた。

3. 研究の方法

ES細胞を含む培養液をdishの蓋に吊り下げて行う三次元懸垂培養 hanging drop culture で、ES細胞は重力の影響で、滴状培養液の先端に凝集し、EBを形成する。このEBを二次元平面付着培養 outgrowth culture を行い、肝細胞および蠕動運動する腸管の分化誘導を行った。また、腸管神経系の起源である神経堤幹細胞の分化誘導を行うために、神経栄養因子であるGDNFやBDNFを添加する。さらに、一定の条件下に無血清培養を行うことにより、神経堤幹細胞の特異的分化誘導を行った。

4. 研究成果

ES細胞は重力の影響を受けて、滴状培養液の先端に凝集し、胚様体を形成する。hanging dropにて6日間培養してEBを作製した後、outgrowth culture 21日目にES細胞から蠕動運動能を有する腸管(ES-Gut)の分化誘導を確認した。また、ES-Gutの周囲に、肝細胞特異的に取り込まれるICG陽性の三次元構築をもつ細胞群を認めたため、RT-PCRで解析したところ、肝細胞 marker (albumin, α -fetoprotein, transthyretin, α -1-antitrypsin, glucose-6-phosphatase および内胚葉マーカー(HNF-3 β)の発現を示した。また、神経栄養因子であるGDNFやBDNFを添加することにより、腸管神経系の起源である神経堤幹細胞をES腸管壁内に分化誘導することも確認した。さらに、一定の条件下に無血清培養を行うことにより、神経堤幹細胞に特異的な遺伝子群(*Slug*, *Snail*, *Pax3*, *Phox2b*, *Sox9*, *Sox10*, *Ret*, *GFRa1*, *p75NTR*)を発現する細胞を認め、GDNF添加下で培養すると、突起をもつ腸管神経(Ret⁺/Sox10⁺/p75^{low})を分化誘導することができた。本研究結果は、発生学的に肝臓が原腸から分化することを考えると、脂肪由来幹細胞から微小重力環境下に肝細胞つくるという命題にとって大変重要かつ画期的な発見であると考えられる。現在、微小重力環境下に肝細胞の分化誘導を行い、重力が臓器分化誘導に及ぼす影響を検討中である。これらの研究成果は、第44回日本小児外科学会総会指定シンポジウム/招待講演)、第108回日本外科学会総会(2008)シンポジウム『細胞を用いた治療の臨床応用をめざして』および第7回日本再生医療学会総会(2008)で発表したほか、第20回日本小腸移植研究会(2008)では最優秀演題・研究奨励賞を受賞した。

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0件)

[学会発表] (計6件)

1. 山田高嗣、金廣裕道、中島祥介：多能性幹細胞の腸管神経分化誘導における神経堤幹細胞移植の開発 (要望演題『ここまできた再生医療の現況』) 第64回日本消化器外科学会総会2009.7 大阪 (予定)
2. 山田高嗣、金廣裕道、中島祥介：ES細胞から神経堤細胞・腸管神経系への分化誘導の臨床的意義と今後の方向性について—Hirschsprung病に対する新たな治療戦略—第109回日本外科学会総会 2009.5 福岡
3. 山田高嗣、金廣裕道、中島祥介：ES細胞から腸管神経系・神経堤細胞への分化誘導—Hirschsprung病に対する新たな治療戦略—(シンポジウム『細胞を用いた治療の臨床応用をめざして』) 第108回日本外科学会総会 2008.5 長崎
4. 山田高嗣、金廣裕道、中島祥介：ES細胞から腸管神経系・神経堤細胞への分化誘導—Hirschsprung病に対する新たな治療戦略—第7回日本再生医療学会総会 2008.3 名古屋
5. 山田高嗣、金廣裕道、中島祥介：ES細胞から腸管神経系・神経堤細胞への分化誘導—Hirschsprung病に対する新たな治療戦略—(最優秀演題・研究奨励賞) 第20回日本小腸移植研究会 2008.3 大阪
6. 山田高嗣、金廣裕道、中島祥介：ES細胞から臓器を分化誘導する—蠕動運動する腸管をつくる(指定シンポジウム/招待講演) 第44回日本小児外科学会総会 2007.5 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田高嗣 (Takatsugu Yamada)

奈良県立医科大学 医学部 助教

研究者番号: 20316061