

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790635

研究課題名（和文）ES 細胞から膵 細胞への効率的な分化誘導法の確立

研究課題名（英文）The establishment of efficient method for differentiation towards pancreatic beta cells from ES cells.

研究代表者

白木 伸明（SHIRAKI NOBUAKI）

熊本大学・発生医学研究センター・COE リサーチ・アソシエイト

研究者番号：70448520

研究成果の概要：今回、私は様々な細胞株をスクリーニングして、ES 細胞から膵前駆細胞を効率よく分化誘導できる M15 細胞を見いだした。さらに、スクリーニングに使用した細胞株についてマイクロアレイ解析を行い、M15 細胞のもつ分化促進能力の本体について解析を行った。解析の結果、膵臓分化に関して、アクチビン・FGF・レチノイン酸・接着因子の関与が示唆された。そこで、M15 細胞と液性因子の添加を組み合わせることで ES 細胞から非常に効率よく膵前駆細胞を分化誘導できる方法が構築できた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病学・ES 細胞・発生生物学

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞から膵 細胞を誘導する技術については、多くの報告がなされていたが、膵 細胞に至るまでの分化制御機構について分子レベルでの解析は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、膵臓発生メカニズム解明のツールとして ES 細胞から正常発生に沿った形で膵 細胞を効率よく分化誘導する方法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験には、膵前駆細胞のマーカである Pdx1 制御下で GFP を発現するトランスジーンを持つ Pdx1/GFP マウスから樹立した ES 細胞を用いた。

(2) 分化誘導系を構築する上で、様々な細胞株をスクリーニングして、ES 細胞から膵前駆細胞を効率よく分化誘導できる支持細胞を探索した。

(3) 支持細胞のマイクロアレイ解析を行い、分化誘導機序の解明を進めた。

(4) SCID マウスへの移植実験を行い、*in vitro* で分化誘導した細胞がすべての膵臓細胞に分化できる能力を持つかを調べた。

4. 研究成果

(1) 支持細胞のスクリーニングの結果、マウス胎児中腎由来培養細胞株 M15 細胞に高い膵臓分化誘導活性があることを見いだした。

(2) M15 細胞を用いて、ES 細胞から膵前駆細胞 (Pdx1 陽性細胞) を効率よく分化誘導できる方法を開発した。

(3) マイクロアレイ解析の結果、M15 細胞の膵臓分化誘導活性シグナルの候補としてアクチビン・FGF・レチノイン酸を見いだした。

(4) 更に詳細な検討の結果、図 1 のように M15 細胞のみの場合に得られる膵前駆細胞は約 2%程度であったが、液性因子(アクチビンおよび FGF2)を添加することで約 30%と飛躍的に増加した。

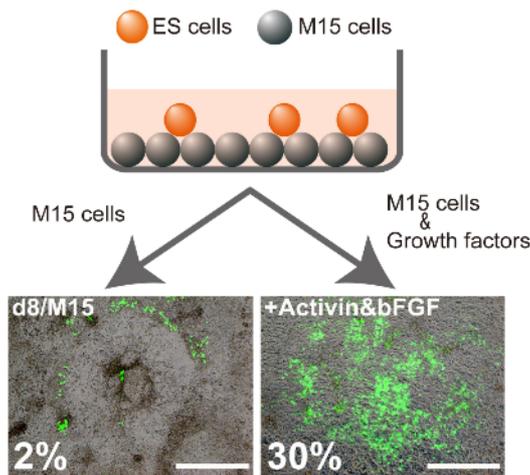


図 1

(5) 得られた膵前駆細胞については、マウスへの移植実験を行い、膵臓を構成するすべての細胞へ分化可能であることがわかった。研究成果は Stem Cells に掲載された。(Shiraki, Stem Cells, 2008)

(6) 更に、ES 細胞から内胚葉および膵前駆細胞分化に働く因子の解析および新規膵臓前駆細胞マーカー遺伝子の探索を行った。膵臓分化誘導研究の過程で、支持細胞と液性因子を組み合わせることで膵臓や肝臓といった内胚葉細胞のみならず、外胚葉および中胚葉も効率よく分化誘導できることを見いだした(図 2, 3, Shiraki, Genes Cells, 2008; Shiraki, BBRC, 2009)

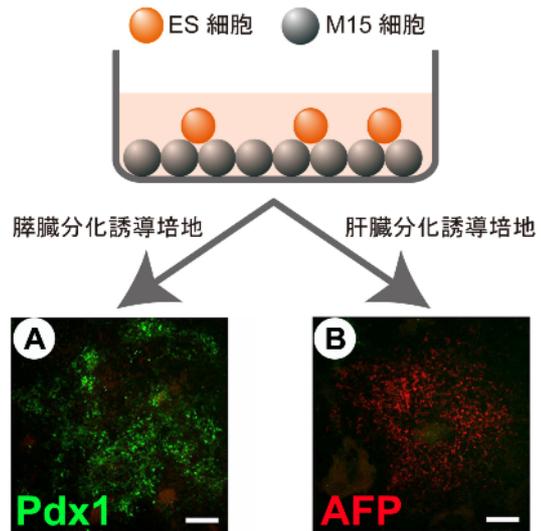


図 2

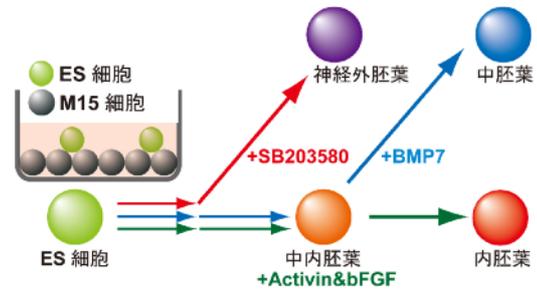


図 3

(7) さらに、内胚葉および膵臓特異的な発現を示す遺伝子を探すためにマイクロアレイ解析を行った(Yoshida, DGD, 2009; 白木未発表)。サンプルとしては、上記の方法で分化誘導した外胚葉・中胚葉および内胚葉細胞を用いた。解析の結果、初期内胚葉や膵前駆細胞特異的に発現する遺伝子を見いだしており、現在詳細な解析を行っている(白木、投稿準備中)

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7件)

Yoshida, T., Murata, K., Shiraki, N., Kume, K. and Kume, S. (2009). Analysis of gene expressions of embryonic stem-derived Pdx1-expressing cells: Implications of genes involved in pancreas differentiation. Dev Growth Differ 51, 463-72. (査読有り)

Shiraki, N., Higuchi, Y., Harada, S., Umeda, K., Isagawa, T., Aburatani, H., Kume, K. and Kume, S. (2009).

Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 694-9. (査読有り)

Yoshida, T., **Shiraki, N.**, Baba, H., Goto, M., Fujiwara, S., Kume, K. and Kume, S. (2008). Expression patterns of epiplakin1 in pancreas, pancreatic cancer and regenerating pancreas. *Genes Cells* 13, 667-78. (査読有り)

Shiraki, N., Umeda, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume, K. and Kume, S. (2008). Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. *Genes Cells* 13, 731-46. (査読有り)

Shiraki, N., Yoshida, T., Araki, K., Umezawa, A., Higuchi, Y., Goto, H., Kume, K. and Kume, S. (2008). Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. *Stem Cells* 26, 874-85. (査読有り)

白木伸明、糸昭苑「ES細胞を用いた膵臓の再生医学」、日本臨床、日本臨床社(大阪), 66(7), 482-487, 2008 (査読無し)

白木伸明、糸昭苑「ES細胞からの細胞分化」、分子細胞治療、先端医学社(東京), 6, 117-124, 2007 (査読無し)

[学会発表](計8件)

白木伸明、他., 支持細胞を用いたES細胞から膵臓系譜内胚葉への正常発育に沿った分化誘導、BMB 2008、2008年12月9日、神戸(口頭発表)

白木伸明「Guided differentiation of ES cells towards pancreatic and hepatic lineages」第1回熊大-KAIST共同シンポジウム 2008年9月8日、大田広域市、韓国(口頭発表)

白木伸明、他., ES細胞から膵臓及び肝臓系譜への分化誘導、第60回日本細胞生物学会大会、2008年6月30日、横浜(ポスター発表)

白木伸明、他., Guided differentiation of ES cells into Pdx1-expressing regional specific definitive endoderm, 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologist, May

28-30, 2008, Tokushima, Japan (口頭発表)

白木伸明、他., Differentiation of ES cells into hepatocyte-like cells, 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会、2007年12月12日、横浜(ポスター発表)

白木伸明、Efficient differentiation of ES cells into hepatic cells、グローバルCOEリエゾンラボ研究会・サマー・リトリート・セミナー、2007年9月28・29日、阿蘇(ポスター発表)

白木伸明、他., ES細胞からPdx1陽性胚性内胚葉への正常発育に沿った分化誘導、第28回日本炎症・再生医学会、2007年8月2日、東京(口頭発表)

白木伸明、他., ES細胞からPdx1陽性胚性内胚葉への正常発育に沿った分化誘導、第40回日本発生生物学会 第59回日本細胞生物学会 合同大会、2007年5月30日、福岡(ポスター発表)

[図書](計1件)

白木伸明、糸昭苑「ES細胞からの内胚葉系細胞の誘導」、培養細胞実験ハンドブック改訂第2版、羊土社(東京), 297-301, 2008

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称:「ES細胞から肝細胞の分化誘導方法」

発明者:糸昭苑、**白木伸明**、梅田 香穂子、**糸和彦**

権利者:国立大学法人 熊本大学

種類:特許権

番号:特願 2007-143225

出願年月日:2007年5月30日

国内外の別:国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np25.html>

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np27.html>

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np29.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

白木 伸明 (SHIRAKI NOBUAKI)
熊本大学・発生医学研究センター・COE リサ
ーチ・アソシエイト
研究者番号：70448520

(2)研究分担者

(3)連携研究者