

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861691

研究課題名(和文) 各臓器由来線維芽細胞と体性幹細胞の各種線維芽細胞由来臓器再生に関する研究

研究課題名(英文) Research on the organ regeneration using organ-derived fibroblasts and somatic stem cells.

研究代表者

畑 未有希 (HATA, MIYUKI)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教

研究者番号：40707981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：期間内に、唾液腺および膵臓由来の線維芽細胞にて検討した。体性幹細胞と唾液腺もしくは膵臓由来線維芽細胞の共培養により、幹細胞が生体に生着可能な唾液腺もしくは膵臓マーカー陽性細胞へと分化したという結果を得た。分化のトリガーとなる因子は特定できていないが、多臓器において、線維芽細胞が幹細胞の分化誘導材料と用いることができることは明らかとなった。今後の再生医療において、線維芽細胞が分化誘導材料として用いることができるならば、生体材料のみで分化誘導過程を行うことができ、細胞の遺伝子操作あるいは人工的サイトカインなしに安全な完全自家移植の新規組織再生医療の開発に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Within the period, it was studied in the salivary glands and pancreas-derived fibroblasts. In co-culture with somatic stem cells and salivary gland or pancreas-derived fibroblasts, stem cells were differentiated into cells of the salivary glands or pancreas. Therefore, it became clear that fibroblasts can be used as differentiation inducing material of stem cells. In the future of regenerative medicine, can be induced to differentiate only in the biological material, there is a possibility of the development of new tissue regenerative medicine that a safe and complete autologous transplantation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医療 細胞培養 体性幹細胞 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞は、生体内の局在やその活性によって異なる外観と性質をもつことが知られている。近年、線維芽細胞に直接遺伝子導入を行い、幹細胞(iPS細胞)や心筋細胞等を作製する研究が増えており、非特異的性質を持つ印象があるが、以前は”場の理論”が主張され、線維芽細胞はそれぞれ組織特異的な性質を持つ可能性も報告されていた。しかし、国内外において、それ以上の成果は認められていない。そこで申請者は、その点に再注目し、線維芽細胞に組織由来の”記憶”が残っていれば、タンパク産生や遺伝子発現に違いがあり、臓器特異的性質を発見できるのではないかと考えている。また、線維芽細胞の臓器特異的性質に差異があればその性質を利用し、幹細胞との共培養により、それぞれ組織固有の性質をもつ上皮細胞へと分化誘導が可能でないかと考えた。すでに基礎実験にて、マウス early ES (EES) 細胞を、ヒト唾液腺由来線維芽細胞と共培養することにより、唾液腺細胞へ分化誘導を試みた結果、生体に生着可能な唾液腺細胞への分化に成功した。さらに、培養唾液腺細胞の解析において、共培養による分化誘導前後に、細胞の発現タンパクを比較検討したところ、免疫染色および RT-PCR 法どちらにおいても、発現タンパクが変化していることを認めた。特に、RT-PCR 法による解析で、分化誘導前後で遺伝子の発現にどのような変化があるかを検討した結果、AQP-5 と NGF では、共培養後に hSG-fibro において発現が消え、mEES 細胞にて発現を認めた。一方、Amylase と bFGF では、共培養前は発現していなかったのに共培養によって発現を認めた。このように、共培養前後で、それぞれの細胞に発現する遺伝子が変化しキャラクターが変化していることを確認した。唾液腺細胞への分化誘導の段階で、線

維芽細胞の持つ何らかの因子が分化誘導開始のトリガーとなり、幹細胞の分化する方向性が定まると因子産生を停止するという自己調節能を有しているのではないかと考えられた。

さらに申請者は、ヒト幹細胞での応用の可否についても実験を行い、ヒト類脂肪体由来幹細胞を細胞源として、ヒト唾液腺由来線維芽細胞との共培養法による唾液腺細胞への分化誘導にも成功している。

本研究において、唾液腺のみでなく他組織あるいは胎児(発生時期の差異検討のため)由来の線維芽細胞においても、応用が可能な検討を進める。

2. 研究の目的

組織の分化には上皮・間葉相互作用が必要といわれている。申請者は、これまでの研究において、マウス ES 細胞あるいはヒト類脂肪体由来幹細胞とヒト唾液腺由来線維芽細胞を共培養すると、幹細胞が唾液腺へと分化することを明らかにした。このことは、線維芽細胞がその組織固有な形質を記憶しており、幹細胞をその組織固有の上皮細胞に分化誘導する何らかの因子を分泌する可能性が高いと考えられる。そこで、組織由来の異なる、あるいは発生時期の異なる線維芽細胞の性質の違いを確認し、線維芽細胞が幹細胞を線維芽細胞の由来臓器へ分化・誘導するメカニズムを明らかにすることを目的に、分子生物学的検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 組織由来の違う線維芽細胞の収集
組織の異なる線維芽細胞を収集し、細胞培養し必要細胞数を確保する。

(2) 線維芽細胞を分化誘導材料とする分化

誘導法の確認と確立

申請者は、現在までの研究成果にて組織幹細胞と唾液腺組織由来線維芽細胞との共培養法により、唾液腺細胞へと分化誘導が可能であったことを確認している。この原理を利用し、組織由来の異なる線維芽細胞をそれぞれ幹細胞と共培養することにより、線維芽細胞の組織由来の性質を持った細胞へと分化誘導できると考えている。

共培養法の手順を以下に示す。

線維芽細胞の増殖能のみ抑制。

線維芽細胞に幹細胞を播種し、共培養へ移行。

共培養後、形態変化した細胞集団を colonialcloning にて分離し、培養継続。この細胞を解析・実験に用いる。

(3) 細胞移植：分化誘導を行った細胞をマウスへ移植し、生体内における組織形成の可否を検討する。移植は約1か月に設定とした。期間経過後組織摘出し、組織学的解析および遺伝子学的解析を行った。

(4) 細胞性質の評価

収集した細胞の組織学的解析（電子顕微鏡観察含む）および遺伝子学的解析を行う。

共培養後の細胞に対して、細胞の組織学的解析（電子顕微鏡観察含む）および遺伝子学的解析を行う。

共培養後の細胞を用い、三次元的培養にて組織再構築を行う。再構築後、組織学的解析（電子顕微鏡観察含む）および遺伝子学的解析を行い、組織特性の有無を確認する。

移植実験後の組織について、細胞の組織学的解析（電子顕微鏡観察含む）および遺伝子学的解析を行う。

解析にもちいるマーカーはそれぞれの細胞もしくは組織特異のマーカーを選択した。

4．研究成果

期間内に、唾液腺および膵臓由来の線維芽細胞にて検討した。体性幹細胞と唾液腺もしくは膵臓由来線維芽細胞の共培養により、幹細胞が生体に生着可能な唾液腺もしくは膵臓マーカー陽性細胞へと分化したという結果を得た。分化のトリガーとなる因子は特定できていないが、多臓器において、線維芽細胞が幹細胞の分化誘導材料と用いることができることは明らかとなった。今後の再生医療において、線維芽細胞が分化誘導材料として用いることができるならば、生体材料のみで分化誘導過程を行うことができ、細胞の遺伝子操作あるいは人工的サイトカインなしに安全な完全自家移植の新規組織再生医療の開発に寄与できる可能性がある。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者：

畑 未有希 (HATA, MIYUKI)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教

研究者番号：40707981

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号：