

図 5. 各条件での培地中へのアルブミン分泌能 (Run-1, 単層培養のみ).

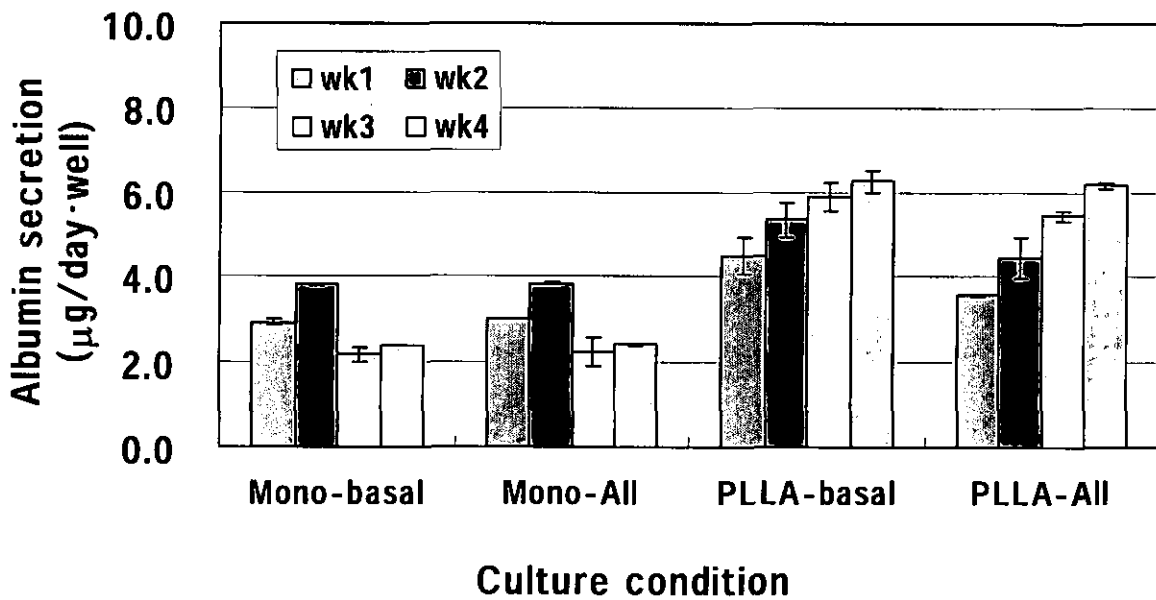


図 6. 各条件での培地中へのアルブミン分泌能. (Run-2, 単層培養とPLLA三次元培養).

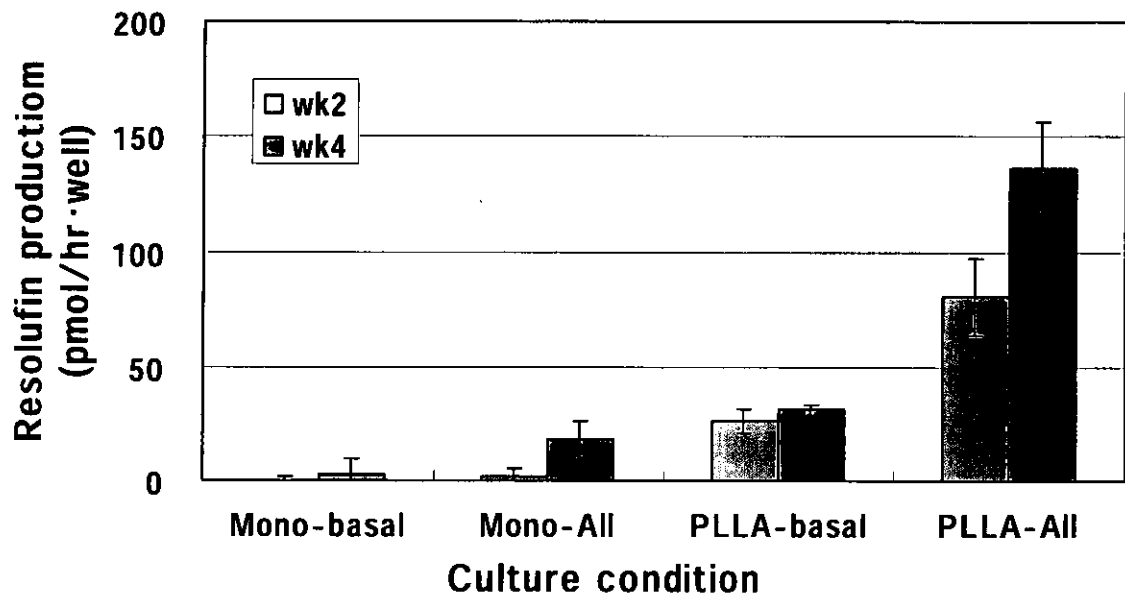


図7. 各条件でのEROD活性.
(Run-2, 単層培養とPLLA三次元培養).

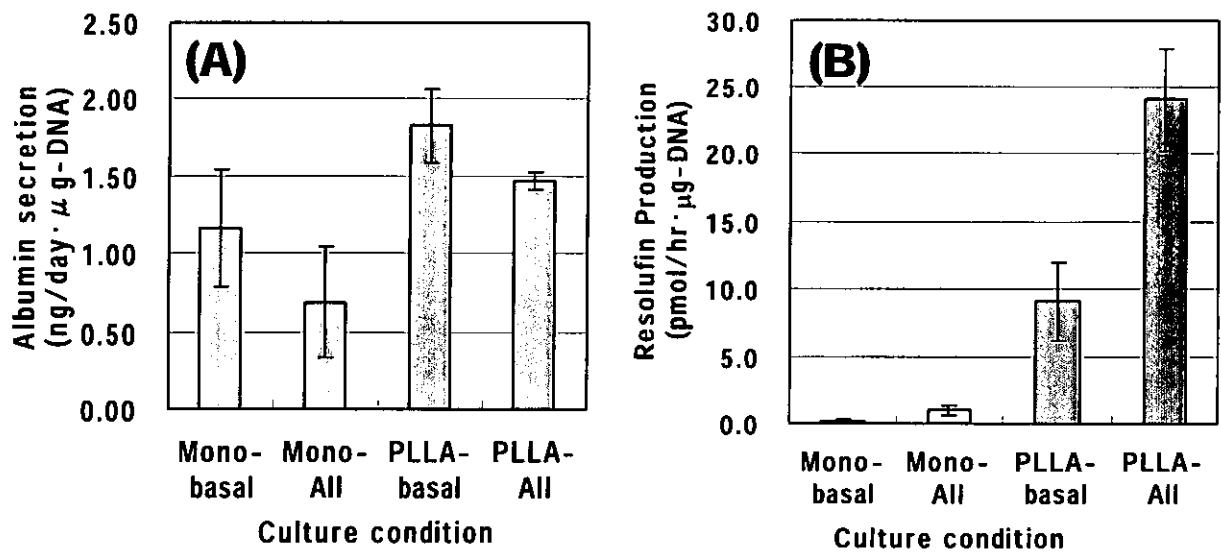


図8. 4週間後におけるDNA量当たりのアルブミン分泌能(A)とEROD活性(B)
(Run-2, 単層培養とPLLA三次元培養).

ES 細胞からの肝細胞分化系に関する研究

分担研究者 渡部 徹郎 東京大学大学院医学系研究科・助手

研究要旨 臓器移植がドナー不足により困難な我が国においては、外傷や疾病によって損なわれた臓器を補うために、ほぼ全ての臓器に分化する能力を持つ胚性幹細胞（ES 細胞）を用いた再生医療への期待が高まっている。殊に患者数の多い肝疾患の治療を目的とした肝臓などの内胚葉由来の組織細胞への分化系の樹立は急務である。しかし、哺乳類の内胚葉形成機構には未解明な部分が多く、ES 細胞から肝臓細胞への分化系はいまだ確立されていない。発生生物学的知見より胚性肝においては肝細胞と胆管細胞の両者へと分化できる Dlk-1 を発現する肝前駆細胞の存在が示されている。そこで本研究においては、ES 細胞からの肝臓分化において肝前駆細胞が存在するか検討するために Dlk-1 を発現する細胞の同定を試みた。ES 細胞を胚様体(embryoid body)を経由して分化させ、肝臓マーカーの発現を継時的に解析したところ分化開始 6 日目から初期肝臓マーカーである AFP の発現が、分化開始 9 日目から Dlk-1 の発現が、そして分化開始 12 日目から肝臓マーカーである albumin の発現が検出された。さらに Dlk-1 を発現する細胞を分取し、分取した陽性細胞と陰性細胞における肝臓マーカーの発現を検討したところ、Dlk-1 陽性細胞においてより多くの albumin の発現が見出された。以上の結果から、ES 細胞からの肝臓分化においても Dlk-1 陽性細胞が出現することが示された。

A. 研究目的

ES 細胞を用いた肝臓などの内胚葉由来の組織細胞への分化系の樹立は急務であるが、哺乳類の内胚葉形成機構には未解明な部分が多く、発生段階に従った ES 細胞から肝臓細胞への分化系はいまだ確立されていない。胚性肝においては肝細胞と胆管細胞の両者へと分化できる Dlk-1 を発現する肝前駆細胞の存在が示されている。そこで我々は発生段階に従った ES 細胞から肝臓細胞への分化系の樹立を目標として、(1) ES 細胞からの肝臓分化系における肝臓分化各種マーカーの発現解析、(2) ES 細胞からの肝臓分化における Dlk-1 陽性細胞の同定、を試みた。

B. 研究方法

(1) ES 細胞を胚様体(embryoid body)を経由して FGF-2, HGF, OSM, ITS, Dex 存在下で分化させると、肝臓細胞を含む様々な種類の細胞群が形成される。肝臓への分化を検討するために RT-PCR 法により肝臓マーカーの発現を継時的に解析した。(2) さらに肝前駆細胞を同定するために分化開始 12 日目の細胞から Dlk-1 陽性細胞を磁気細胞分離システム(MACS)を用いて分取し、分取した Dlk-1 陽性細胞と陰性細胞における肝臓マーカーの発現を検討した

以上の実験はすべて *in vitro* のマウス培養細胞を用いた実験であり、倫理面の問題はないと考える。

C. 研究結果

(1) ES 細胞を胚様体を経由して FGF-2, HGF, OSM, ITS, Dex 存在下で分化させると、肝臓細胞を含む様々な種類の細胞群が形成された。肝臓への分化を検討するために RT-PCR 法により肝臓マーカーの発現を継時的に解析したところ、分化開始 6 日目から初期肝臓マーカーである AFP の発現が、分化開始 9 日目から Dlk-1 の発現が、そして分化開始 12 日目から肝臓マーカーである albumin の発現が RT-PCR 法により見出された。(2) 肝前駆細胞を同定するために ES 細胞から上記の条件で分化させた細胞から Dlk-1 陽性細胞を磁気細胞分離システム(MACS)を用いて分取した。上記の分化条件では分化した細胞の 20%が Dlk-1 陽性であり、分取した Dlk-1 陽性細胞と陰性細胞における肝臓マーカーの発現を検討したところ、陽性細胞においてより多くの albumin の発現が見出された。

D. 考察

以上の結果から ES 細胞からの肝臓分化においても Dlk-1 陽性細胞が出現すること、また分取した Dlk-1 陽性細胞は陰性細胞に比べて多くの albumin 産生が検出されたことから得られた Dlk-1 陽性細胞が肝臓へと分化している可能性が示唆された。現在分取した Dlk-1 陽性細胞を培養して肝臓マーカーの発現を解析することにより、肝前駆細胞としての機能を検討している。

E. 結論

本研究により ES 細胞からの in vitro 肝臓分化系においても肝前駆細胞のマーカーである Dlk-1 陽性細胞が出現することが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takeda M, Mizuide M, Oka M, **Watabe T**, Inoue H, Suzuki H, Fujita T, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K. Interaction with Smad4 is indispensable for suppression of BMP signaling by c-Ski. *Mol Biol Cell*. 2003 Dec 29 [Epub ahead of print]

Watabe T, Nishihara A, Mishima K, Yamashita J, Shimizu K, Miyazawa K, Nishikawa SI, and Miyazono K. (2003) TGF- β receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J. Cell Biol.* 163:1303-1311.

Takebayashi-Suzuki K, Funami J, Tokumori D, Saito A, **Watabe T**, Miyazono K, Kanda A, and Suzuki A. (2003) Interplay between the tumor suppressor p53 and TGF- β signaling shapes embryonic body axes in *Xenopus*. *Development* 130:3929-3939.

Murakami G, **Watabe T**, Takaoka T, Miyazono K and Imamura T. (2003) Multi-step Inhibition of BMP Signaling by Smurf1. *Mol. Biol. Cell*. 14:2809-2817.

2. 学会発表

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者 宮島 篤 東京大学分子細胞生物学研究所・教授

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版者名	出版地	出版年	ページ
Nakamura K and Miyajima A	Oncostatin M promotes differentiation of fetal hepatocytes in vitro and regulates liver regeneration in vivo	K. Okita	Frontier in hepatology growth/differentiation and hepatocyte/HCC.	Springer-Verlag	Germany	2004	in press

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
N. Tanimizu, M. Nishikawa, A. Miyajima	Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1.	<i>J. Cell Sci</i>	116	1775-1786	2003
Anzai H., A. Kamiya, H. Shirato, T. Takeuchi and A. Miyajima	Impaired differentiation of fetal hepatocytes in homozygous <i>junonji</i> mice	<i>Mech. Dev</i>	120	791-800	2003
Tanaka M., Y. Hirabayashi, T. Sekiguchi, T. Inoue, M. Katsuki, and A. Miyajima	targeted disruption of Oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis	<i>Blood</i>	102	3154-3162,	2003
Tanaka M. and A. Miyajima	Oncostatin M, a multifunctional cytokine	<i>Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology</i>	149	39-52	2003
Hanada S, Kayano H, Jiang J, Kojima N, Miyajima A, Sakoda A, Sakai Y	Enhanced in vitro maturation of subcultivated fetal human hepatocytes in three dimensional culture using poly-L-lactic acid scaffolds in the presence of oncostatin M	<i>Int J Artif Organs</i>	26(10)	943-951	2003
Nakamura K., H. Nonaka, H. Saito, M. Tanaka, and A. Miyajima	Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice	<i>Hepatology</i>	39	635-644	2004
Rump A., Morikawa Y., Tanaka M., Minami S., Umesaki N., Takeuchi M., and Miyajima A	Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion	<i>J. Biol. Chem</i>	279(10)	9190-9198	2004
Tanimizu N. and Miyajima A	Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors	<i>J. Cell Sci</i>			in press

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版者名	出版地	出版年	ページ
酒井康行	マイクロファブリケーション・三次元造型 (3.8)	立石哲也 田中順三	図解再生医療工学	工業調査会	東京	2004	印刷中

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
J. Jinlan, N. Kojima, A. Miyajima, W. Yan, Y. Sakai	Cultivation and induction of fetal liver cells in poly-L-lactic acid scaffolds	<i>Mat. Sci. Eng. C</i>	in press		2004
Y. Sakai, M. Otsuka, S. Hanada, Y. Nishiyama, Y. Konishi, A. Yamashita	A novel poly-L-lactic acid scaffold that possesses a macroporous structure and a branching/joining three-dimensional flow channel network: Its fabrication and application to perfusion culture of human hepatoma Hep G2 cells	<i>Mat. Sci. Eng. C</i>	in press		2004
Y. Sakai, M. Otsuka, J. Kozasa, F. Miyata, K. S. Furukawa, A. Yamashita	Ultra-violet-light irradiation-based photofabrication that simultaneously produces a macroporous structure and flow channels using a photo-reactive biodegradable polymer and a gas-forming azoamide compound	<i>Biochem. Eng. J.</i>	in press		2004
J. Jiang, L. Guo, N. Kojima, K. Naruse, M. Makuuchi, A. Miyajima, W.-Q. Yan, Y. Sakai	Efficacy of engineered liver tissue based on poly-L-lactic acid scaffolds and fetal mouse liver cells cultured with oncostatin M, nicotinamide and dimethyl sulfoxide	<i>Tissue Eng.</i>	in press		2004
Hanada S., Kayano H., Jiang J., Kojima N., Miyajima A., Sakoda A. and Sakai Y.	Enhanced in vitro maturation of subcultivated fetal human hepatocytes in three dimensional culture using poly-L-lactic acid scaffolds in the presence of oncostatin M	<i>Int. J. Artif. Organs</i>	26(10)	943-951	2003
酒井康行	三次元造型の再生医療への利用	再生歯科医療学会誌	1(1)	12-21	2003

分担研究者 渡部 徹郎 東京大学大学院医学系研究科・助手

書籍
なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Takeda M, Mizuide M, Oka M, Watabe T, Inoue H, Suzuki H, Fujita T, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K.	Interaction with Smad4 is indispensable for suppression of BMP signaling by c-Ski.	<i>Mol Biol Cell.</i>	Epub		2003
Watabe T, Nishihara A, Mishima K, Yamashita J, Shimizu K, Miyazawa K, Nishikawa SI, and Miyazono K.	TGF- β receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells.	<i>J. Cell Biol.</i>	163	1303-1311	2003
Takebayashi-Suzuki K, Funami J, Tokumori D, Saito A, Watabe T, Miyazono K, Kanda A, and Suzuki A.	Interplay between the tumor suppressor p53 and TGF- β signaling shapes embryonic body axes in <i>Xenopus</i> .	<i>Development</i>	130	3929-3939	2003
Murakami G, Watabe T, Takaoka T, Miyazono K and Imamura T.	Multi-step Inhibition of BMP Signaling by Smurf1.	<i>Mol. Biol. Cell.</i>	14	2809-2817	2003

20030411

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。