

臓器再生研究ユニット

Research Unit for Organ Regeneration

ユニットリーダー 谷口 英樹
TANIGUCHI, Hideki

生体が有する自己修復能を利用し、各種疾病の治療を行う「再生医学」は次世代医療の中心課題の1つである。血管や骨などの組織レベルの再生技術の開発は急速に進みつつある一方で、複雑な構造と高次機能を有する固形臓器を対象とした実用化技術は未開発である。当研究ユニットでは、これまでにフローサイトメトリーと蛍光標識モノクローナル抗体を用いた精度の高い細胞分離法を確立して、固形臓器における組織幹細胞の同定と特性解析を推進している。すなわち、肝臓・膵臓・腸管・唾液腺などの消化器官や腎臓などの様々な固形臓器における組織幹細胞の分離・同定を行い、それらの分化・増殖・自己複製・可塑性機構を横断的に比較するという視点から解明することを試みている。また、「再生医学」に対する社会的ニーズの高い糖尿病や慢性腎不全等に対する再生医療のための実用化技術の開発を行っている。

1. 膵幹細胞の分離法・分化誘導法の確立 (梶谷 *1, 大島 *2, 谷口)

膵臓を構成する細胞には、ランゲルハンス氏島（膵島）を形成する4種の内分泌細胞 [β 細胞, α 細胞, δ 細胞, γ (PP)細胞] と、外分泌細胞、膵管細胞がある。これらの細胞群はすべて膵幹細胞 (pancreatic stem cell) から分化・派生してくるものと考えられている。このような膵幹細胞の分離と機能解析を目的として、2つのアプローチで研究を進めている。まずは、膵幹細胞で発現している pancreatic duodenal homeobox-1 (pdx-1) 遺伝子のプロモーターで蛍光タンパク遺伝子 (DsRed2) を発現するトランスジェニックマウスを樹立した。このトランスジェニックマウスの膵臓から細胞を単離し、フローサイトメトリーを用いて細胞を分画化してDsRed陽性細胞を分離・回収した。培養系におけるクローン性コロニー形成能を指標として高い増殖能を有する画分を検討したところ、膵臓中の僅かに約1.2%を占めるにすぎないDsRed^{dim}SSC^{high}細胞画分に限定して高い増殖能を有する膵幹/前駆細胞が存在することが明らかとなった。この細胞がインスリン産生細胞へと分化することも確認された。また、重要な発見として、1個のDsRed^{dim}SSC^{high}細胞がクローナルに増殖することにより形成されたコロニー中に1個のDsRed陽性細胞が維持されていることが判明した。これは、pdx-1を発現する1個の膵幹細胞が増殖後も1個の幹細胞として細胞集団の中で維持されていることを可視化したといえる。また、この幹細胞維持のメカニズムが幹細胞の不均等分裂であることも明確にされ、今後の細胞極性分子に関する詳細な解析が期待できる。もう1つのアプローチとして、複数の細胞表面抗原の発現パターンを指標とした、フローサイトメトリーを用いたマウス膵幹細胞の分離・同定を試みている。現時点において、DsRed陽性細胞を分取可能な細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体をスクリーニングし、複数の候補抗体を選別している。今後、これらのモノクローナル抗体を利用した膵幹細胞の分離法の確立を検討する。膵幹細胞のインスリン分泌細胞への選択性の高い分化誘導因子のスクリーニングを継続的に実施しているが、効率化を目的として、Pdx1-DsRedト

ランスジェニックマウスやNgn3-EGFPトランスジェニックマウス等の利用を推進する。

2. 腸管上皮幹細胞の分離・同定 (関谷 *1, 菅野 *2)

複数の細胞表面抗原の発現パターンを指標とした、フローサイトメトリーを用いたマウス腸管上皮幹細胞の分離・同定を試みている。まず、腸管上皮幹細胞の解析系としてin vitroにおけるコロニーアッセイ法を確立することを目的として、クローン性コロニーを形成する胎仔腸管細胞の効率の良い培養条件を検討した。当初の予想よりも培養至適条件を決定することが困難であることが判明したが、その大きな理由が間葉系細胞の混入にあることから、今後フローサイトメトリーで分離したE-カドヘリン陽性細胞を対象とした条件検討を進めていく。至適培養条件が決定された後、コロニー形成能を指標としてフローサイトメトリーで分離したマウス胎仔腸管中の様々な細胞画分の増殖能について解析を行う予定である。一方、腸管上皮幹細胞に特異性の高いマーカー分子の探索を免疫染色法により実施した。その結果、インテグリン β 1など腸管陰窩に局限して発現する細胞表面抗原を特定した。

3. 腎尿管上皮前駆細胞の分離・特性解析と医療への応用 (與倉 *1, 岡本 *1, 菅谷 *3)

腎臓は薬物代謝上極めて重要な臓器であり、薬剤感受性遺伝子の多くが発現している。現在、創薬における前臨床試験の腎毒性スクリーニングは動物実験 (ラット, イヌ) により代用されているが、ヒトとの種差のため毒性発現予測は不十分である。さらに、近年、米国食品医薬品局 (FDA) は新薬承認時に患者の薬剤感受性に関する遺伝情報を要求しており、テーラーメイド医療に向けた世界的な取組みが望まれている。このような観点から、本研究ではヒト細胞を用いた薬剤感受性の評価系構築を目的とし、複数の患者から樹立した腎特異的幹細胞を利用した腎毒性発現予測の実証を試みている。現時点において、ヒト尿中落下細胞から近位尿管上皮前駆細胞を樹立する方法を確立しており、フローサイトメトリー等を用いた特性解析を推進中である。

The Research Unit for Organ Regeneration focuses on studies of the differentiative and regulatory mechanisms underlying endodermal tissues and organs in the digestive system, which include the liver, pancreas, intestine and salivary glands. By analyzing stem cells isolated from each of these tissue types, the Taniguchi lab seeks to confirm the existence of “endodermal stem cells” that enable the high levels of cellular plasticity seen in digestive organs. Using cell sorting technologies, Taniguchi is working to characterize these putative endodermal stem cells by sorting and analyzing cells from the livers and other digestive organs of fetal mice. The identification of molecular markers specific to such cells will make it possible to isolate them by flow cytometry and to pursue further investigations into their functional roles in the development of the endoderm-derived digestive system. The ability to identify and isolate stem cells capable of giving rise to endodermal lineage tissue types would also be of enormous potential value in the development of regenerative medical applications for the treatment of diabetes. In a concurrent project, Taniguchi is working to develop a system for isolating and guiding the differentiation of stem cells from the pancreases of adult mice, which is aimed at establishing the foundations for cell replacement therapies using insulin-producing pancreatic beta cells grown in vitro.

Research Subjects

1. To isolate and characterize pancreatic stem cells towards cell therapy for diabetes
2. To identify intestinal stem cells to elucidate the regulatory mechanisms controlling epithelial cell positioning and patterning in the intestine
3. To unravel the mechanisms of cell plasticity in endodermal tissues and organs

4. To characterize human renal progenitor cells for tailor-made medicine

Staff

Unit Leader

Dr. Hideki TANIGUCHI

Technical Staff

Ms. Midori YOKURA

Ms. Asuka SEKIYA

Ms. Naoyo KAJITANI

Mr. Satoshi OKAMOTO

Visiting Members

Dr. Takeshi SUGAYA (CYMIC Inc.)

Trainees

Mr. Yuji OSHIMA (Grad. Sch., Medicine, Univ. Tsukuba)

Mr. Masato SUGANO (Grad. Sch., Medicine, Univ. Tsukuba)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Suzuki A., Nakauchi H., and Taniguchi H.: “Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting”, *Diabetes* **53**, 2143–2152 (2004). *