様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成24年　4月10日

群馬大学生体調節研究所長　殿

所属機関名　防衛医学研究センター異常環境衛生研究部門
職名　助教
研究代表者　山本　頼綱
勤務先所在地　〒359－8513
埼玉県所沢市並木3－2
電話番号　（04）2995―1626
ファックス番号　（04）2991－1612
E-メール　yoritsuna@gmail.com

下記により共同研究成果を報告します。

記

（課題番号　11020　）

1. 研究プロジェクト名と共同研究課題名	プロジェクト名：（〇で表示） (1)「代謝疾患ゲノム研究プロジェクト」、 (2)「代謝シグナル機能研究プロジェクト」 (3) その他、((1)と(2)のいずれにも関連し区分できない場合等) 共同研究課題名： 脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASCs)を利用した膵β細胞再生
2. 共同研究目的	脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASCs)を用いた、糖尿病に対する新規膵β細胞再生治療法の開発
3. 共同研究期間	平成　23年　4月　1日　～　平成　24年　3月　31日

4. 共同研究組織

氏　名	年齢	所属部局等	職名等	役割分担
（研究代表者） 山本　頼綱	40	防衛医科大学校 防衛医学研究センター	助　教	研究の実施・解析全般
（分担研究者） 濱野　邦久	33	防衛医科大学校病院 総合臨床部	大学院	細胞移植実験等の実施

5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	細胞調節	氏名	小島　至

※　次の6，7，8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6，7，8の項目全体では1頁に収めて下さい。

（課題番号　　11020　）

6. 共同研究計画

脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASCs)は採取が低侵襲であり、倫理的・免疫学的なハードルが低い「自家移植」を見越した再生医療のセルソースとして期待されている。美容形成の分野ではすでに広く行われている脂肪吸引術等により比較的軽易に採取可能で、現状では破棄してしまっている細胞群から大量に得られるという点で、骨髄幹細胞とは異なっている。ただ、体性幹細胞であるゆえその増幅には限界があり、糖尿病再生治療への応用を考えるとその能力はいまだ不明な点が多く、例えば加齢や高血糖状態による特徴の変化もわかっていない。インスリン産生細胞への分化誘導の報告も存在する(Timper et al. Biochem Biophys Res Commun 2006 など)が、効率・再現性などの観点から不十分で実用の域には遠く達しない。

低酸素ガス環境は HIF-1 を始めとする細胞内シグナルを介して、幹細胞の増殖に促進的に働き、また多分化能を維持させる働きがあることが近年わかってきた(Simon MC et al, Nat Rev Mol Cell Biol., 2008 ほか)。ASCs に対する影響についての詳細は不明ながら、増殖能や多分化能維持に促進的に働く効果が十分に期待できる。

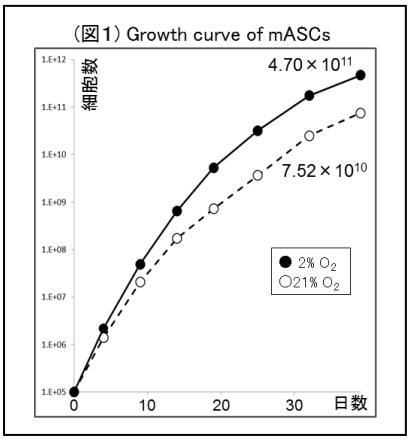
これまで申請者は膵β細胞の分化誘導因子、特にアクチビンやベータセルリンなどを利用した糖尿病再生治療の研究を行ってきた。また現在は、低酸素ガス環境が細胞に与える影響に関して研究を行っている。本共同研究は、1)加齢・高血糖状態での ASCs の特徴を解析する、2)低酸素ガス環境が ASCs の増殖・分化能維持に与える影響について解析する、3)全ての知見を活用して ASCs の効率的な増幅と膵β細胞への分化誘導を達成し、もって新規の糖尿病再生治療を開発することを目的とする。

7. 共同研究の成果

［H23 年度成果］

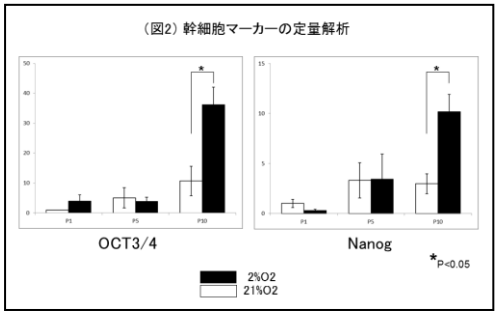
H23 年度は主に低酸素ガス環境が ASCs の増殖・未分化度の維持に与える影響について検証できた。

5 週齢雄マウスより ASCs を採取・培養した。採取直後の細胞を Passage(P)1 とし、P10 まで 21%正酸素もしくは 2%低酸素ガス環境下でそれぞれ培養し細胞増殖曲線を作成した（図 1）。継代数の増加に伴って細胞増殖は徐々に低下し、その傾向は両群で共通していた。6 週間の培養の結果、低酸素群では正酸素培養群の 6 倍の細胞数が得られた。他の幹細胞と同様に、ASCs においても低酸素培養は効率的な増幅法であることが確認された。



（図1）Growth curve of mASCs

多分化能の維持について検証するため、幹細胞において未分化のマーカーとして知られる Oct3/4 と Nanog の発現量について定量的 PCR 法をもちいて確認した。いずれにおいても P10 において 2%低酸素ガス群で有意な発現量の増加をみとめ、継代数を経ても未分化能が維持されることが示唆された（図 2）。



（図2）幹細胞マーカーの定量解析

P2～5 の比較的継代数の少ない ASCs をもちいて、アクチビン(Act)とベータセルリン(BTC)による膵β細胞への分化誘導実験を行った。各々2nM の濃度で培養液中へ添加し、1 週間後にインスリンの発現を確認した。分化誘導因子添加群においてインスリンの発現誘導を PCR 法にて確認できた（図 3）。現在、さらに他の分化誘導因子についてもその有効性を検証中であり、インスリンの発現をリアルタイムでモニターできるコンストラクトをもちいて、より効率的で再現性の高い条件を見いだす努力を続けている。

（図3）アクチビンとベータセルリンによる分化誘導でインスリンが発現する

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

（本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。）

論文投稿準備中