

都, 7月. [Neurosci Res 2006; 55(Suppl 1): S114]

V. その他

- 1) 太城安良, 河合良訓. 発達期孤束核におけるアストロサイトの発現. 第8回 ORIGIN 神経科学研究会. 松山, 9月.
- 2) 岡田知明, 河合良訓. 発達期の孤束核における膜タンパク質の遺伝子発現変化. 第8回 ORIGIN 神経科学研究会. 松山, 9月.

解剖学講座第2

教授: 石川 博	ES細胞に関する研究・新しい抗癌剤感受性試験法の開発
助教授: 橋本 尚詞	形態学・細胞生物学
講師: 立花 利公	下垂体細胞学
講師: 島田 貴 (兼任)	血液学

研究概要

I. ヒト羊膜由来細胞の各種細胞への分化誘導

臓器移植は各種疾病に対する究極の治療選択といえる。しかしドナー不足の問題は一向に解決されず、再生医療により作成された素材による細胞移植や人工臓器の研究は一層盛んになってきた。これまで我々はラット ES 細胞を作製し、肝、歯胚、臍細胞などへと分化させ各種移植実験に成功している。

本年度は、生命倫理問題が少ないヒト羊膜をインフォームドコンセントを施行した上で提供してもらい、羊膜細胞を分離して同様の方法で各種細胞への分化誘導実験を行った。

1. 肝細胞の作成と肝不全ラットへの移植によるその機能評価

ヒト初期胚羊膜の初代単層培養細胞中に出現する小型球形細胞集団から細胞株 (HEAC 細胞と命名) を分離した。HEAC 細胞は angular で adhesive な細胞と小型球形で付着性の弱い細胞から構成されている。これらの細胞に embryotrophic factors (ETFs) を作用させて胚様体を形成させ、さらに三胚葉性の胚子様モンスターに生育させた。このモンスターから実体顕微鏡下に原始肝組織 (HEAC-L) を採取し、HEAC-L 細胞株を樹立した。HEAC-L 細胞は細胞内小器官が豊富で敷石状に増殖し、接触阻害と高い2倍体性を有し、長期間安定した phenotype を示した。HEAC-L 細胞株は肝構成細胞をすべて含み、albumin や IGF-1 産生等の肝機能を有していた。CCl₄ 誘発肝不全ラットの脾臓に HEAC-L 細胞を移植したところ、control に比べ約 85% の延命効果が認められ、血中のプロトロンビン時間値、アンモニア、ビリルビン値などが改善され肝代謝機能の存在が確認された。

2. レチノイン酸添加培養によるヒト羊膜細胞の神経系細胞への分化

ヒト初期胚羊膜を分散培養し、HEA-1 細胞株を樹立した。この細胞株は単層で増殖し長紡錘形細胞

を主とする、小型球形細胞や上皮様細胞から構成されていた。HEA-1 cell にレチノイン酸を作用させると単層培養シート中に長い突起を有する細胞からなるコロニーが出現し、ここから HEA-NC cell line を樹立した。HEA-NC cell line 中には peripherin, bovine neuron specific enolase (bNSE), S100 protein や GFAP に陽性の細胞が存在したことから、ヒト初期胎盤の羊膜中には stem cell あるいは神経細胞やグリア細胞に分化する progenitor cell が存在しているものと考えられた。分化誘導された神経細胞やグリア細胞は 20 継代を超えても上記免疫染色性を失わないことから獲得した phenotype は消失していないと思われる。

3. 羊膜より樹立した細胞株 (HAM) の肝細胞様細胞および神経細胞への分化誘導

羊膜を洗浄・細切後、trypsin-EDTA 処理を行って遠心し、沈殿をさらに酵素処理し、rhEGF と rhLIF を加えて培養し、樹立した細胞株を HAM と名付けた。

HAM に HGF, FGF-2, oncostatin M および dexamethasone を作用させて肝細胞への分化・誘導を行った。誘導された細胞では、RT-PCR により α -FP, albumin, α_1 -AT, CK18, HNF-4 α の mRNA の発現が確認され、細胞は α -FP, albumin, CK18 が免疫染色陽性で、PAS 染色も強陽性であった。

HAM に 1. glutamin, EGF, FGF-2, N₂ supplement, あるいは 2. glutamin, N₂ supplement, BHA, dbcAMP, IBMX, all-trans retinoic acid を作用させて、神経細胞へ分化・誘導した。分化誘導された HAM は神経細胞様に形態変化し、Nestin, NSE, NF, GFAP の mRNA の発現を確認し、NSE, MBP, Tuj1 に対して免疫染色陽性を示した。

4. ヒト羊膜細胞の臍ラ氏島細胞への分化

ヒト羊膜中の多分化能を有する細胞(組織幹細胞)を FACS を用いて分離し、cell lines を樹立した。これを ETFs 添加培養液で懸濁培養して胚様体へと分化させ、さらに ETFs 存在下で灌流培養を行って胚子様モンスターを発育させた。モンスタの消化管様構造に添った部位で毛細血管に富み、かつヘム蛋白を合成していない原基をガラス細管で採取し、培養上清中にインスリンを産生している原基から cell lines を樹立した。

3 株の cell lines にはインスリン、グルカゴン免疫陽性細胞が混在していた。これら cell lines は培養液の glucose に対し濃度依存的にインスリンの分泌量を増加させるが、6 passage を越すと分泌量が減少し、12 passage を越えると分泌しなくなった。また、

ラ氏島を 3 次元的に構築させたところ、約 40 日にわたって glucose 濃度依存的にインスリンを分泌したが、その後は徐々に産生が低下した。糖尿病ヌードマウスの腎皮膜下に移植したところ、移植成功例は 2/6 匹であった。現在、尿糖と血糖の測定を行っている。

II. 卵管類肝癌由来類肝癌細胞株 HEPFT の樹立と細胞株の性状、特に産生される α -FP のレクチン親和性と類肝癌組織発生に関する検討

卵管類肝癌より類肝癌細胞株 HEPFT を樹立した。この株は 13ヶ月 35 回以上継代されている。HEPFT 細胞は多稜形、紡錘形で多型性、多彩性に富み、接触阻止が見られず乳頭状多層性の増殖を示す。細胞質内には胆汁色素がみられ、多量の α -FP を産生している。電顕では類円形のミトコンドリアと多数の小さいゴルジ装置が発達し、細胞間にはデスモソーム結合があり、小胆管も見られた。細胞増殖は安定し、倍加時間は約 45 時間であった。染色体数は異数性の広い分布で、染色体数モードは高三倍体であり、多くのマーカー染色体が認められた。患者血清および培養上清中 α -FP のレクチン親和性を解析したところ、ほぼ類似した結果が得られ、HEPFT 細胞が類肝癌由来であることを示唆していた。CGH を用いた BACarray による遺伝子解析では様々なゲノムのコピー数の変化が見られた。4q13-3 の α -FP 遺伝子のコピー数は 0.0322 増幅(カットオフ値以下)を示していた。そこで、 α -FP の mRNA の発現を RT-PCR によって分析したが、強い発現が見られた。

HEPFT 細胞株は、類肝癌の細胞生物学的特性を検討するのに貴重な細胞株である。

「点検・評価」

羊膜は通常分娩時に廃棄されるものであり、それに由来する幹細胞は生命倫理的な問題が少ない。さらに、この羊膜幹細胞から種々の器官原基を生じさせることが可能となってきており、臍帯血とともに将来の自家移植のために凍結保存しておくことが考慮されている。本年度はこの羊膜幹細胞を分離し、それを出発点として種々の器官を分化誘導させる実験に取り組んできた。その結果、肝細胞、神経系細胞、臍ラ氏島細胞へと分化誘導することに成功し、肝不全ラットや糖尿病マウスに移植して一時的に症状を軽減させることができた。しかしながら、分化誘導した形質発現は十分に安定しておらず、再び脱分化を生じてしまうところがあり、今後は如何にして誘

導した形質を長期間安定して発現させていくかに取り組んでいく必要がある。

本年度も種々の腫瘍組織より細胞株を樹立しているが、その代表的なものに上記の卵管の類肝癌由来の類肝細胞癌細胞株がある。この細胞株は安定して維持できており、今後類肝癌の細胞生物学的特性を解析していく上で貴重な材料になるものと期待される。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, Ohta Y, Sami M, Tachibana T, Ishikawa H, Kurosawa H, Kahn RC, Otsu K, Shirasawa T. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 2006; 281: 33789-801.
- 2) Tamagawa T, Ishiwata I, Nakamura Y, Ohoi S, Ishikawa H. Human Amnion Mesenchyme cells possess hepatocyte-like characteristics *in vitro*. *Hum Cell* 2007; 20(3): 77-84.
- 3) Ohi S, Kyoda S, Tabei I, Ninomiya K, Sugiyama K, Hashimoto H, Tachibana T, Ishikawa H. Establishment and characterization of a cell line (NABCA) derived from metastatic lymph nodes of breast scirrhus carcinoma. *Hum Cell* 2006; 19(4): 126-32.
- 4) Ohi S, Takahashi H, Ninomiya K, Nakajima M, Hashimoto H, Tachibana T, Yanaga K, Ishikawa H. Establishment and characterization of a cisplatin-resistant cell line (IGSK-1) from a poorly differentiated gastric adenocarcinoma. *Hum Cell* 2007; 20(1): 15-22.
- 5) Ohi S, Takahashi N, Hashimoto H, Tachibana T, Hirabayashi T, Sugiyama K, Yanaga K, Ishikawa H. Establishment and characterization of an IGSK-2 cell line derived from ascitic fluid of recurrent hCG and somatostatin secreted adenocarcinoma of the stomach. *Hum Cell* 2007; 20(2): 52-61.
- 6) Ohi S, Nogi H, Tabei I, Sugiyama K, Hashimoto H, Tachibana T, Uchida K, Ishikawa H. Characterization, anti-cancer drug susceptibility, and atRA-induced growth inhibition of a novel cell line (HUMEMS) established from pleural effusion of alveolar rhabdomyosarcoma of breast tissue. *Hum Cell* 2007; 20: in press.
- 7) 石川真由美, 大井 聡, 立花利公他. マウス early ES 細胞の甲状腺原基への分化・発育. 日本再生医療学

会雑誌 2006; 5(Suppl): 118.

III. 学会発表

- 1) 石川 博. (教育講演) ヒト口唇: 口蓋の発生と異常. 第 30 回日本口蓋裂学会総会学術集会. 長野, 5月.
- 2) 日下部守昭, 橋本尚詞, 磯西成治, 井上 循(マトリックス), 松葉恭一(アロカ), 安田 允, 石川 博. (ポスター発表) 卵巣癌のシスプラチン耐性に関する遺伝子の解析. 第 65 回日本癌学会学術総会. 横浜, 6月.
- 3) 石川 博. 医歯工連携の共同研究について～異なる分野との共同研究の進め方～医療の立場から. 第 2 回日本歯科大学歯科再生医療ミーティング. 東京, 2月.
- 4) 大山晃弘, 熊沢弘樹, 石川 博ほか. 卵細胞の呼吸測定を試み. 第 10 回多目的酸素電極装置研究会. [学術集会抄録: 酸素電極の多様性と未来 2006: 14]
- 5) 橋本尚詞, 立花利公, 大井 聡, 石川 博. 再生医療における溶存酸素測定の意義. 第 10 回多目的酸素電極装置研究会. [学術集会抄録: 酸素電極の多様性と未来 2006: 14]
- 6) 橋本尚詞, 立花利公, 大井 聡, 石川 博. 癌の再発と化学療法. 第 10 回多目的酸素電極装置研究会. [学術集会抄録: 酸素電極の多様性と未来 2006: 14]
- 7) Ohi S, Takahashi N, Tabei I, Hashimoto H, Tachibana T, Yanaga K, Sato K (Nihon Univ), Ishikawa H. Establishment and characterization of a spontaneously cisplatin-resistant human gastric adenocarcinoma cell line (IGSK-1). 第 24 回日本ヒト細胞学会学術大会. 東京, 7月.
- 8) Ohi S, Takahashi N, Tabei I, Hashimoto H, Tachibana T, Ninomiya K, Hirabayashi T, Sugiyama K, Yanaga K, Sato K (Nihon Univ), Ishikawa H. Establishment and characterization of a cisplatin-resistant cell line (IGSK-2) derived from ascitic fluid of recurrent mucinous and poorly differentiated adenocarcinoma of stomach. 第 24 回日本ヒト細胞学会学術大会. 東京, 7月.
- 9) Tabei I, Nogi H, Ohi S, Ninomiya K, Sugiyama K, Hirabayashi T, Hashimoto H, Tachibana T, Uchida K, Ishikawa H. Establishment and characterization of human rhabdomyosarcoma cell line, HUMEMS, derived from primary embryonal rhabdomyosarcoma of the breast. 第 24 回日本ヒト細胞学会学術大会. 東京, 7月.
- 10) 立花利公. (シンポジウム) 免疫電顕法の概要: 免疫電顕を極める! こうすればうまくいく! 日本顕微鏡学会第 31 回関東支部講演会. 東京, 3月.

IV. 著 書

- 1) 橋本尚詞, 石川 博. 抗がん剤感受性試験. 安田 允編著. よくわかる卵巣癌のすべて. 大阪: 永井書店, 2007. p. 344-54.

生 理 学 講 座 第 1

教 授: 馬 詰 良 樹 筋生理学・体力医学
講 師: 竹 森 重 筋生理学・体力医学

研 究 概 要

I. 横紋筋スキンドファイバーのフィラメント格子動態の再検討

骨格筋, 心筋の筋原線維筋節は主としてアクチンから構成される細いアクチンフィラメントとミオシンから構成される太いミオシンフィラメントからなるが, この両フィラメントは弾性コネクチンフィラメントによって筋原線維長方向に連結されながら, 太さ方向には美しい液晶様格子構造をとっている。この規則配列構造は, 収縮性相互作用の主体となるアクチンとミオシンの相互作用を, 相互の位置関係を均一にして変調することに合目的な意義があると考えられる。このためこの格子構造の安定性と動態を調べている。

ゲルゾリン処理はこの格子構造から細いアクチンフィラメントだけを選択的に除去するものであり, 筋細胞膜を除去した名取のスキンドファイバーから, さらに細いアクチンフィラメントを除去することを試みたところ, 太いミオシンフィラメントが作る格子構造をほぼ完全に維持したまま, 細いアクチンフィラメントのみを除去することができた。そこでこのゲルゾリン処理スキンドファイバーを用いて, 筋節を伸展したときの筋フィラメント格子間隔の動態を高輝度放射光施設 SPring8 の放射光を用いて固定処理なしに経時観測した。筋節の長さはレーザ光回折法によりモニタし, 弾性コネクチンフィラメントが発生する静止張力は張力トランスデューサで同時モニタした。

その結果, アクチンとミオシンの相互作用のない状態において, 骨格筋の白筋および赤筋, 心筋のいずれの標本においても, 先に研究室が提唱していた Y 字型弾性コネクチンフィラメントによる筋フィラメント圧搾では説明できない筋フィラメント格子間隔動態が筋節伸展に伴って観測された。このフィラメント格子間隔動態は, 静電反発力とファンデアワールス力による DLVO 説でも説明がつかない変化であり, これまでに提唱されていない新たなメカニズムを提唱するべく, NMR によるフィラメント格子内の水動態解析の結果と併せて検討を進めている。

なお, この研究は川崎医療大学医学部の奥山博司