

二国間交流事業 共同研究報告書

平成23年 4月 1 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 九州大学大学院医学研究院・SSP造血幹細胞分野

職・氏名 ^(ふりがな) 特任准教授・杉山 大介
^{すぎやま だいすけ}

1. 事業名 相手国（英国）との共同研究 振興会対応機関（ RS ）

2. 研究課題名 造血幹細胞増幅におけるヒト肝芽細胞の役割

3. 全採用期間

平成21年 4月 1日 ～ 平成23年 3月31日 （ 2 年 0ヶ月）

4. 研究経費総額

(1) 本事業により交付された研究経費総額 5,000 千円

初年度経費 2,500 千円、 2年度経費 2,500 千円、 3年度経費 _____ 千円

(2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額 _____ 千円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
<small>すぎやま だいすけ</small> 杉山 大介 <small>くんけーる かせむ</small> クンケール カセム <small>ささき たつや</small> 佐々木 達哉 <small>みずおち ちよ</small> 水落 ちよ <small>ほりお ゆか</small> 堀尾 有可 <small>ばとつえつえぐ ばとちゅるーん</small> バトツエツエグ バトチュールーン <small>よこお ともこ</small> 横尾 朋子	九州大学・特任准教授 九州大学・訪問研究員 九州大学・大学院生 九州大学・技能補佐員 九州大学・技術補佐員 九州大学・技術補佐員 九州大学・博士研究員	造血幹細胞増幅におけるヒト肝 芽細胞の役割

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 ノッティンガム大学病院・臨床組織研究室 分野長 主任研究者・Rhodri JONES

(3) 相手国参加者（代表者の氏名の前に○印を付すこと）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
○ Rhodri JONES	ノッティンガム大学・分野長 (イギリス)	造血幹細胞増幅におけるヒト肝芽細胞の 役割
Dileep LOBO	ノッティンガム大学・准教授 (イギリス)	
Noori ECHRISH	ノッティンガム大学・大学院生 (イギリス)	

6. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

<目的>

造血幹細胞とは、すべての血液細胞を作ることが出来る、自己複製能と多分化能を備えた血液の大元の細胞である。ヒト造血幹細胞は、成体では骨髄、出生時では臍帯血に多く存在する事がわかっており、この造血幹細胞を移植する事で、各種血液疾患の治療が行われている。この造血幹細胞移植療法を更に普遍化するために、造血幹細胞を試験管内で作製する研究や、またこれらを試験管内で増幅する研究が行われているが、未だ臨床応用されていない。これは、ヒト造血幹細胞発生メカニズムの解明が発展途上である事に起因する。造血幹細胞は胎生初期に大動脈-生殖隆起-中腎領域で発生し、中期には肝臓へホーミング（移動・定着）し、増幅の後、最終的に骨髄へホーミングすると考えられている。これら発生イベントをヒト胎児サンプルを用いて解析する事は、本邦においては倫理上様々な制約があり困難であるが、イギリスにおいてはある適切なガイドラインの元その解析が進んでいる。ヒトのモデル動物であるマウスにおける実験結果はマウスにおける現象を保証するものであるが、ヒトにおける現象のすべてを反映しない。よって、マウスで得られた知見を最終的にヒトへ還元するためには、ヒト胎児サンプルを用いて造血幹細胞発生研究を行う事は、避けて通れない。以上の理由から、ヒト胎児造血幹細胞サンプルをイギリスにおいて入手し、ヒト造血幹細胞発生メカニズムの解析を行う。

<内容>

イギリスにおいて、本邦では倫理的に入手困難な中絶胎児より、胎生初期あるいは中期のヒト胎児造血幹細胞を採取する。一方日本においては、既に設立されているバンクより臍帯血を入手し、胎生後期のヒト胎児造血幹細胞を採取する。これらヒト胎児造血幹細胞をヒト生体内においてリアルタイムに観察する事は困難なので、マウス胎仔へ移植し、続けて全胚胎仔培養を行う。本法により造血微小環境を再構築する事で、ヒト胎児造血幹細胞はマウス胎仔肝臓へホーミングし、増幅する事が予測される。そこで、肝臓へホーミングしたこれらヒト胎児造血幹細胞を再度採取し、遺伝子発現の推移を解析する事で、ヒト造血幹細胞増幅メカニズムを解明し、臨床応用する事を目指す。

<成果>

平成21年度

<イギリス側チーム>

実施計画に基づき、申請者研究室において、ヒト肝芽細胞・造血幹細胞・間葉系幹細胞採取及び培養に必要な培養法に関して講義を受講し、実習を行った。2010年2月9, 15, 18日にはJONES博士に九州大学において講演をしていただいた。（演題名：1. Haematopoietic development in the human fetal liver and implications for haemotherapy in adult life (2月9日). 2. Stem cells and hepatogenesis in fetal life (2月15日). 3. The contribution of mesenchymal stem cells to tissue generation and repair. (2月18日).) また、大分大学、熊本大学、久留米大学においても講演をしていただいた。

<日本側チーム>

実施計画に基づき、申請者が樹立した抗ヒトDlk-1抗体（1F10E8及び2D6D7）を提供した。JONES博士研究室において、佐々木達哉、堀尾有可が、ヒト肝芽細胞・造血幹細胞・間葉系幹細胞採取に関してトレーニングを受けた。また、データに関して討議を行った。またJONES博士が日本学術振興会・外国人招聘研究者として来日された際には、データに関して討議を行った。

平成22年度

<イギリス側チーム>

実施計画に基づき、申請者が提供した抗ヒト Dlk-1 抗体 (1F10E8 及び 2D6D7) を用いて免疫染色も行い、肝芽細胞及び胎児造血幹細胞の局在を検討した。日本側チームがイギリス側チーム研究室を訪問した際には、ヒト肝芽細胞・造血幹細胞・間葉系幹細胞採取及び培養に必要な培養法に関して講義を受講し、実習を行った。ヒト胎児肝芽細胞と造血幹細胞をフローサイトメトリー法により採取した。今後、造血細胞における肝芽細胞の役割を検討するため、マウス及びヒト肝芽細胞でフィーダー層を作製し、その上で造血細胞の培養を行い、分化に与える影響を検討する予定である。

<日本側チーム>

実験計画に基づき、イギリスチームよりヒト胎児肝芽細胞と造血幹細胞の提供を受け、マイクロアレイ法により網羅的遺伝子発現解析を行う予定だったが、ヒト胎児サンプルから一度に採取可能な細胞数には限度があり、マイクロアレイ法に必要な細胞数 (30,000 個) に到達しなかった。現在も継続してサンプル回収中である。JONES 博士研究室訪問時において、杉山大介、クンケールカセム、水落ちよ、横尾朋子が、中絶胎児よりヒト肝芽細胞・造血幹細胞・間葉系幹細胞採取に関してトレーニングを受けた。また、データに関して討議を行った。共同研究代表者の杉山大介は、2010年8月31日にノッティンガム大学において講演を行った (演題名: Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver hematopoiesis through extracellular matrix and cytokine production.)。また2010年9月2日に Imperial College London において講演を行った (演題名: Hematopoietic development in mice and implications for haematotherapy.)。

以上の成果をふまえ、申請者は以下の論文を1報発表し、3報投稿中である。

1. Sasaki T, Mizuochi C, Horio Y, Nakao K, Akashi K and Sugiyama D.
Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/c-Kit signaling in embryonic mouse. *Development*.137 (23): 3941-3952, 2010, Selected for cover image.
2. Daisuke Sugiyama, Kasem Kulkeaw, Chiyo Mizuochi, Yuka Horio and Satoko Okayama
Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production. (投稿中)
3. Daisuke Sugiyama, Kasem Kulkeaw, Chiyo Mizuochi and Yuka Horio
TGF-beta1 up-regulates extra-cellular matrix production in mouse hepatoblasts. (投稿中)
4. Mizuochi C, Horio Y, Biasch, K, Tavian M, and Sugiyama D.
Intra-aortic clusters undergo endothelial to hematopoietic phenotypic changes in early embryogenesis (投稿中)