

研究成果報告書の概要

講座等名	実験病理学講座	事業推進者名	上野 博夫
所属部門	がん部門		
分担研究課題	多色細胞系譜追跡法を用いた幹細胞の維持機構の解析		
キーワード	幹細胞・発生・再生		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	8名		
研究組織	<p>(本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割)</p> <p>上野博夫 研究の総括</p> <p>熊野恵城 幹細胞の単離と遺伝子発現解析</p> <p>比舎弘子 幹細胞の培養</p> <p>吉田真子 遺伝子改変マウスの作製</p> <p>厚海奈穂 ターゲティングベクターの構築</p> <p>松浦 徹 オルガノイド培養</p> <p>藤田恭平 オルガノイド培養</p> <p>エリック・ヨハンソン オルガノイド培養</p>		
研究成果の概要	<p>(令和元(2019)・令和2(2020)年度の研究成果について)</p> <p>(1) タイムラプスイメージング法を用いた発生期膵臓の細胞系譜追跡実験</p> <p>Sox9-CreERT2; Rosa26-rainbow マウスを用いて、Sox9⁺膵前駆細胞の多色細胞系譜追跡実験を実施した。当該マウスでは、タモキシフェン誘導的にCre-loxPシステムが働き、緑色蛍光を呈していたSox9⁺細胞が、青・橙・赤色のいずれかの蛍光色に特異的に標識される。胎生12.5日目(E12.5)のマウス膵臓原基の<i>ex vivo</i>培養細胞を用いてSox9⁺膵前駆細胞を標識した後、E14.5からE18.5までの4日間の長期3次元タイムラプスイメージングを実施した。これにより、Sox9⁺膵前駆細胞の細胞系譜(増殖・分裂・移動・分化・集合といった生命現象)をリアルタイムで長時間撮影し、追跡することに成功した。</p> <p>(2) 免疫組織染色による膵内分泌細胞への分化確認実験</p> <p>タイムラプスイメージング終了後、Sox9⁺膵前駆細胞の膵島への寄与を確認するため、各種抗体を用いて免疫組織染色を施した後、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。その結果、E18.5(day6)膵臓<i>ex vivo</i>培養細胞において、グルカゴン⁺α細胞、インスリン⁺β細胞およびソマトスタチン⁺δ細胞の少なくとも3種類の内分泌細胞の存在が認められ、良好な内分泌細胞分化が確認できた。膵臓原基の<i>ex vivo</i>培養細胞では、成体組織に比べ膵島形成が未発達であることから、これらの内分泌細胞が集合した小型の膵島が認められた他、分散ないし集合過程の細胞塊が認められた。さらに、膵島が青・赤・橙色の多色で構成され、それらがグルカゴン⁺α細胞ないしインスリン⁺β細胞であることを確認した。また、同一膵島内に異なる色のβ細胞が認められたことから、複数のSox9⁺膵前駆細胞が移動および分化し、膵島形成に寄与したことが示唆された。一方、ソマトスタチン⁺δ細胞に関しては、内分泌細胞分化において後期に出現する細胞であることと相関して、α細胞およびβ細胞と比較して、非常に細胞数が少ない傾向が認められた。</p> <p>今後、タイムラプスイメージングによって得られた画像データと免疫組織染色の結果を照合し、Sox9⁺膵前駆細胞の詳細な動態解析を行うことで、原始膵管から個々の細胞がどのように増殖・移動・分化して膵島が形成されるのか解明するための有用な手掛かりが得られるものと考えます。</p>		