

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462142

研究課題名(和文) コラーゲンゲル内での三次元培養によるES細胞から心筋細胞への効率的な分化誘導

研究課題名(英文) Efficient cardiogenic differentiation from ES cells by three-dimensional culture in collagen hydrogel

研究代表者

谷口 繁樹 (TANIGUCHI, SHIGEKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90183467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンゲル内での三次元培養で未分化なES細胞を心筋細胞へ分化誘導することが可能であることを明らかにした。未分化なES細胞はコラーゲンゲル内で細胞凝集塊を形成し、細胞数は緩徐に増加した。コラーゲンゲルの濃度、播種する細胞数によって心筋細胞へ分化する割合が変化することも明らかにし、高い効率で心筋細胞へ分化誘導する条件を決定した。ビタミンC添加による心筋細胞への分化効率の上昇は認め、また、長期間の培養でも相対的な心筋細胞数の割合の低下を認めないという利点も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We showed that it was possible to induce differentiation into cardiomyocytes from undifferentiated ES cells by three-dimensional culture in collagen hydrogel. Undifferentiated ES cells formed cell aggregates in collagen hydrogel, and cell number increased slowly. We also showed that collagen concentration and initial cell seeding density affected differentiation ratio into cardiomyocyte, and we decided a culture condition which was possible to induce differentiation into cardiomyocyte with high efficiency. The addition of ascorbic acid increased the differentiation efficiency into cardiomyocyte. In three-dimensional culture the differentiation efficiency did not decrease in long term culture.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医療 組織工学 細胞・組織 心筋細胞 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞などで一旦心筋組織が壊死してしまうと、終末分化した心筋細胞を再生することは困難である。近年、収縮力が低下した心臓の機能回復を目指した心筋細胞移植が再生医療の一つとして研究されている。心臓に対する細胞移植としては現在すでに臨床応用もされているが、骨格筋芽細胞などがドナー細胞として用いられており、移植された細胞の発生する収縮力による機能回復というより、移植された細胞の分泌するサイトカインなどによる機能回復がメカニズムとして考えられている。移植された細胞の発生する収縮力による機能回復を目的とすると、細胞移植では困難であり、我々も *in vitro* で心筋組織を作成し、その心筋組織を移植することを目的とした研究を行ってきた。

移植された心筋細胞の発生する収縮力による機能回復を目的とすると、大量の心筋細胞の入手が必要である。間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導の報告、また、近年では成人の心臓にも心筋細胞を再生させる幹細胞の存在が報告されているが、分化効率などを考慮すると、ES 細胞や iPS 細胞からの心筋細胞への分化誘導の方が現実的であると考えられている。しかし、ES 細胞や iPS 細胞でさえ、高い効率で心筋細胞へ分化誘導する方法が確立されているとは言えない。

幹細胞の心筋細胞への分化誘導では、単離した細胞をハンギングドロップ法、もしくは、高濃度の浮遊培養内で自然に凝集する胚様細胞塊を培養皿上で培養するという方法が用いられることが多い。また、それらの方法に加えて、様々なサイトカインや薬物などの添加によって分化の効率が上昇するとも報告されている。

一方、我々はこれまでに幹細胞をコラーゲンゲル内で三次元培養することによって目的とする細胞への分化誘導の効率を高めることが可能であることを報告してきた。ラットの間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導する実験系では、従来の二次元培養下での分化誘導と比較して約 7.5 倍分化誘導の効率を高めることに成功している。

近年では、幹細胞の心筋細胞への分化誘導においては、細胞の接着する細胞外マトリックスからの刺激が分化の効率を高めるとの報告もあり、幹細胞をコラーゲンゲル内で三次元培養し心筋細胞へ分化誘導することは、分化の効率を高める可能性が十分にあるのではないかと考えられる。

今回の検討ではマウス ES 細胞をコラーゲンゲル内で三次元培養し、心筋細胞への分化効率をこれまで分化効率が高いとされてきたハンギングドロップ法による分化効率と比較検討する。

2. 研究の目的

コラーゲンゲル内での三次元培養を用いて、高効率で ES 細胞を心筋細胞に分化誘導

する方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

基本的には以下の 3 群間で検討を行う。
コラーゲンゲル内で三次元培養(検討群)
ハンギングドロップ法 (陽性対象群)
培養皿上での二次元培養 (陰性対象群)

評価方法

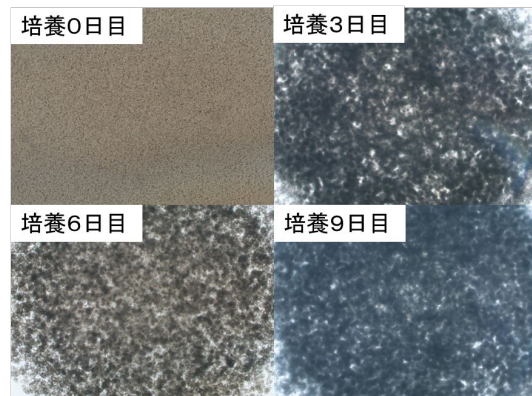
顕微鏡による観察、細胞数の評価など一般的な観察に加えて、

リアルタイム RT-PCR による心筋特異遺伝子発現の定量による分化効率の比較。
ウェスタンブロットによる心筋特異蛋白発現の定量による分化効率の比較。

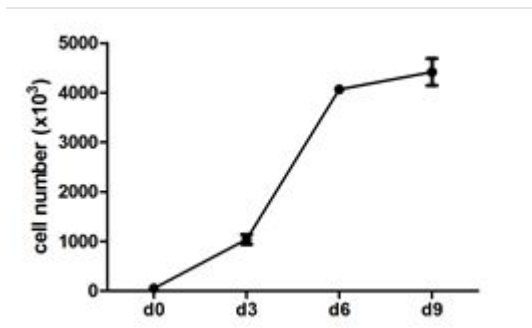
などを行った。

4. 研究成果

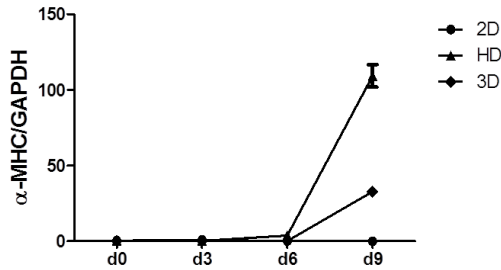
下図の如く、位相差顕微鏡による観察で、播種当日、細胞は単離された状態でコラーゲンゲル内に包埋されていた。培養 3 日目には細胞が凝集塊を形成し、培養 6 日目にはその大きさが増大することが確認された。培養 9 日目でもその大きさは維持されていた。



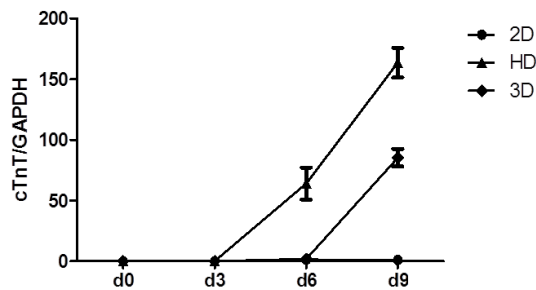
細胞数は位相差顕微鏡像の観察による印象と同様で、培養 6 日目まで急激な増大を示し、培養 9 日目にかけては緩徐な増大を示した。



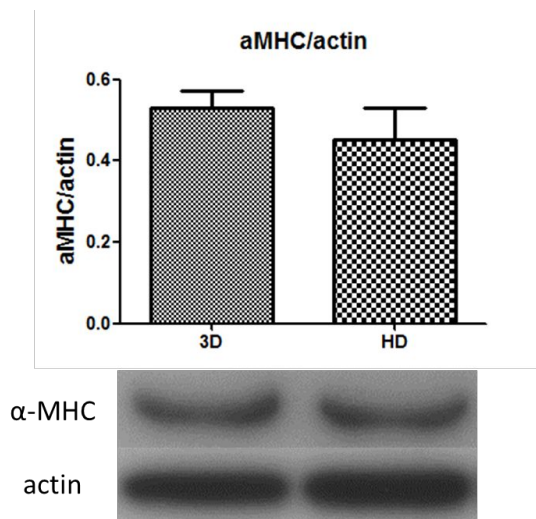
心筋特異遺伝子である α -MHC の発現は培養皿上での二次元培養 (2D) では殆ど認めなかった。一方、コラーゲンゲル内で三次元培養 (3D) ではハンギングドロップ法 (HD) よりも低値ではあったが発現を認めた。



また、同様に心筋特異遺伝子である cardiac troponin T (cTnT) の発現も同様の結果であった。



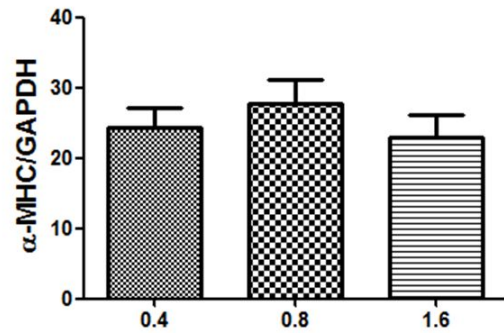
蛋白レベルでの心筋細胞への分化については、培養3日目や6日目のサンプルのウェスタンブロットで α -MHC の発現は確認できなかったが、培養9日目のサンプルで α -MHC の発現を認めた。発現の定量では、ハンギングドロップ法と同程度の発現であった。



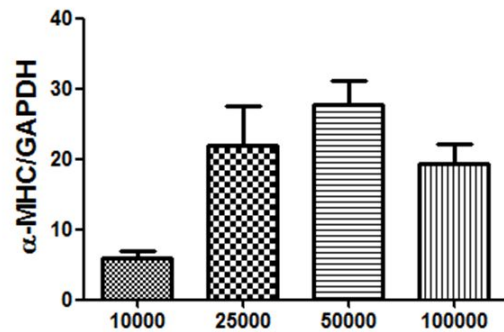
上記の結果より、コラーゲンゲル内での三次元培養で未分化な ES 細胞を心筋細胞へ分化誘導することが可能であることが明らかとなった。

心筋細胞へ高い効率で分化誘導するためのコラーゲンゲル濃度については、濃度を

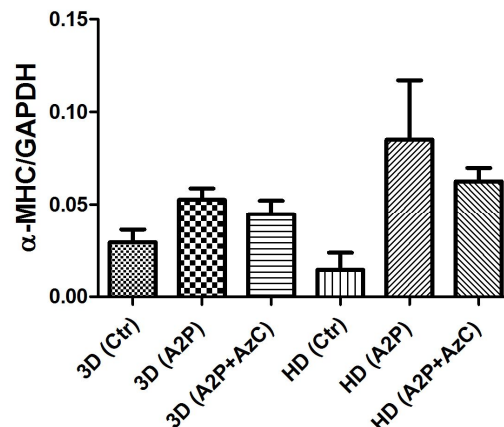
0.4、0.8、1.6 mg/ml で比較した。結果としては、コラーゲンゲルの濃度 0.8 mg/ml の条件で最も大きい α -MHC 遺伝子の発現を認めた。



また、播種する細胞数についての最適な条件については、播種する細胞数を 10,000、25,000、50,000、100,000 cells/20 μ l で比較した。結果としては、50,000 cells/20 μ l の条件で最も大きい α -MHC 遺伝子の発現を認めた。

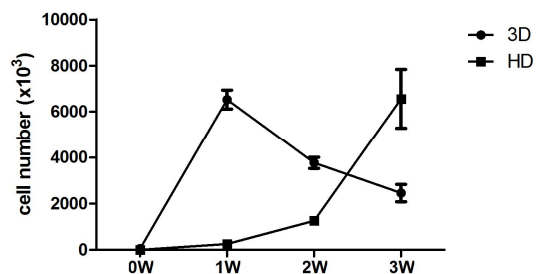


ハンギングドロップ (HD)、三次元培養 (3D) 共に、ビタミン C (A2P) による心筋細胞への分化誘導の傾向を認めた。一方、コラーゲン合成阻害剤であるアゼチジン 2-カルボン酸 (AzC) による拮抗効果はハンギングドロップで大きく、三次元培養では小さかった。これは、三次元培養ではコラーゲンゲル内で培養されていることが原因であると考えられた。

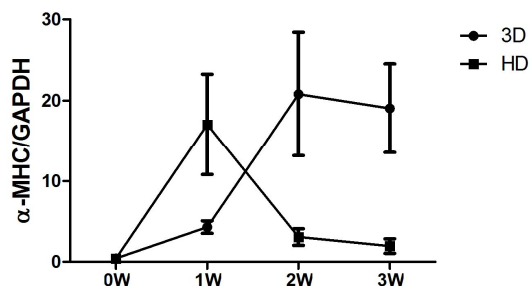


長期間の培養による心筋細胞分化への影

響については、ハンギングドロップと比較した。ハンギングドロップでは培養6日目に二次元培養に移行した後、急激な細胞数の増加を認めた。



それに伴い、心筋特異遺伝子の発現の低下を認めた。一方、コラーゲンゲル内での三次元培養では培養初期に急激な細胞数の増加を認め、その後は徐々に減少した。培養の継続による心筋特異遺伝子の発現の低下も軽度であった。



5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 繁樹 (TANIGUCHI SHIGEKI)

公立大学法人 奈良県立医科大学 胸部・心臓血管外科 教授

研究者番号：90183467