様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年５月２５日現在

機関番号：２４６０１
研究種目：若手研究（B）
研究期間：２０１０～２０１１
課題番号：２２７９１３１８
研究課題名（和文）　三次元構築を持つ組織再生を目指したコラーゲンゲル内における間葉系幹細胞の分化誘導
研究課題名（英文）　Induction of mesenchymal stem cell differentiation in collagen hydrogel for constructing three dimensional organ
研究代表者
河合　紀和（KAWAI NORIKAZU）
奈良県立医科大学　医学部　研究員
研究者番号：４０４５８０１３

研究成果の概要（和文）：
ラット間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導する際のコラーゲンゲル内での三次元培養の有用性を二次元培養と比較した。同法では二次元培養と比較し培養初期に Runx2 遺伝子の発現が高まり、骨芽細胞への分化が誘導され、続いて osterix 遺伝子やオステオカルシン蛋白など骨芽細胞の成熟に関連した遺伝子の発現や蛋白の分泌量が増加し、最終的に成熟した骨芽細胞の割合が増加した。コラーゲンゲル内での三次元培養は幹細胞の分化誘導に有用である。

研究成果の概要（英文）：
We examined the usefulness of three-dimensional culture in collagen hydrogel for inducing differentiation of rat mesenchymal stem cells into osteoblasts compared with two-dimensional culture. In this culture method, the expression of Runx2 gene in early culture phase became higher compared with two-dimensional culture, which induced differentiation into osteoblasts and increased the expression of ostrix gene and the secretion of osteocalcin proteins associated with the maturation of osteoblasts. Finally the percentage of matured osteoblasts was increased. Three-dimensional culture in collagen hydrogel is useful for inducing differentiation of stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２０１０年度	600,000	180,000	780,000
２０１１年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総　計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学
キーワード：再生医療、組織工学、細胞・組織、骨芽細胞、間葉系幹細胞

１．研究開始当初の背景

近年、様々な領域で組織工学（Tissue Engineering）の技術を用いた組織作成が試みられている。同技術の臨床応用に向けては、
１、組織作成に適したドナー細胞の確保
２、移植に適した組織作成技術の確立

などの問題がある。

今回検討した人工気管に用いる軟骨輪に準じた組織を例にとると、幹細胞から高い効率で骨芽細胞を分化誘導し、その細胞によって固い組織を作成することが出来れば、目標を達成したこととなる。

２．研究の目的

今回の研究では上記の問題点を同時に解決する方法についての検討を行うこととした。即ち、移植に用いる為の組織を in vitro で作成することを前提とした三次元培養を行う過程で、幹細胞を目的の細胞に分化誘導し、分化の効率を二次元培養と比較した。

我々の用いる培養方法は液状のコラーゲン中での細胞の三次元培養であり、三次元培養は幹細胞の分化誘導に適しており、目的とする細胞への分化効率が良いのではないかと予想し検討を開始した。

今回の検討は今後の再生医療の臨床応用に向けて、組織工学（Tissue Engineering）の技術を用いて完全に自己の材料からなる組織を作成する上で問題となり得るドナー細胞の確保、組織の作成法という問題点を一気に解決する可能性がある。

３．研究の方法

ラットの間葉系幹細胞を液状のコラーゲン内で三次元培養する。培養中に培養液に誘導物質（アスコルビン酸、デキサメタゾン、β-グリセロフォスフェイト）を添加することによって骨芽細胞への分化を誘導する。

下記の指標を用いて、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化の効率を培養皿上での二次元培養と比較する。

１、培養液中へのオステオカルシン（幹細胞の骨芽細胞への分化に関与するタンパクであり、分化のマーカーとして用いられる）の分泌を ELISA 法で測定する。

２、細胞外マトリックスへのカルシウムの沈着(成熟した骨芽細胞はカルシウムを沈着させるため、成熟した骨芽細胞のマーカーとして用いられる)を測定する。

３、Runx2 遺伝子（幹細胞の骨芽細胞への分化を方向付ける）や osterix 遺伝子（幹細胞の骨芽細胞への分化に関与する）の発現を real-time RT-PCR 法で定量する。

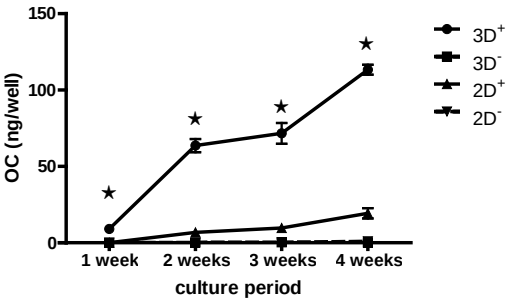
４、コッサ染色でカルシウムの沈着を組織学的に評価する。

４．研究成果

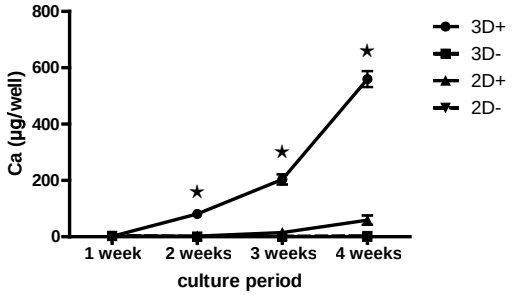
三次元/二次元培養で誘導物質を添加した $3D^+/2D^+$、三次元/二次元培養で誘導物質を添加しなかった $3D^-/2D^-$に群分して検討を行った。なお、培養は 24 穴の培養皿内で施行し、オステオカルシン（OC）の分泌量とカルシウム（Ca）の沈着量は培養穴１ヵ所当たりの量で比較した。また、Runx2 遺伝子、osterix 遺伝子の発現量はGAPDH遺伝子の発現量で標準化した。

（結果）

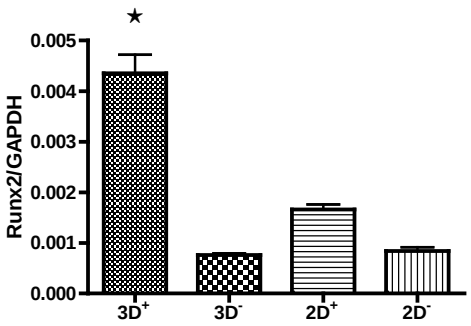
培養液中のOCへの分泌量を示す。$3D^-/2D^-$ではOCの分泌は認めなかった。$2D^+$では分泌を認めたが、$3D^+$では $2D^+$に比較して有意に分泌量は大きかった。



Caの沈着を示す。OCの分泌と同様に、$3D^-/2D^-$ではCaの沈着は認めなかった。また、$2D^+$では沈着を認めたが、$3D^+$では $2D^+$に比較して有意に沈着量は大きかった。

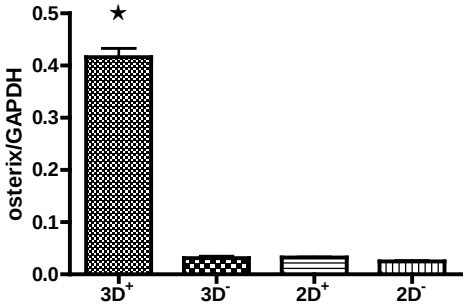


Runx2 遺伝子は骨芽細胞への分化を方向付ける機能を持つことから、培養初期の発現が重要であるとされている。下は培養１週目の発現量を示すが $3D^+$では $2D^+$、$3D^-/2D^-$に比較して有意に発現が大きかった。

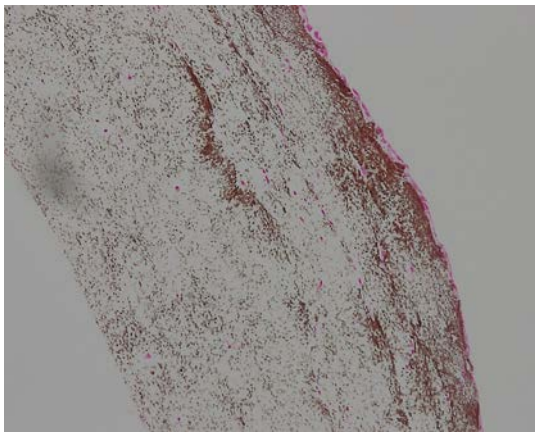


また、osterix遺伝子の発現は、骨芽細胞

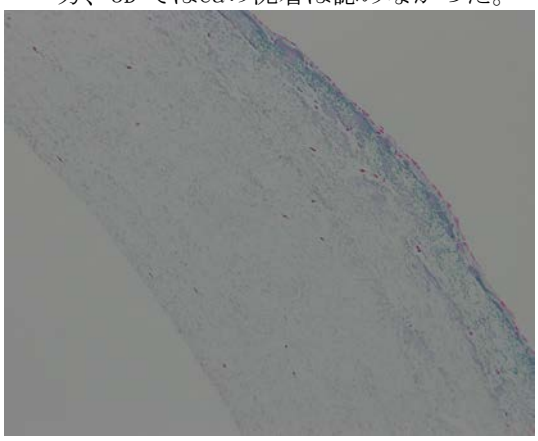
の成熟に関連しており、培養後期に増加してくるが、下に示すように培養３週目では$3D^+$で$2D^+$、$3D^-$/$2D^-$に比較して有意に発現が大きかった。



コッサ染色による組織学的検討では、$3D^+$では下に示すようにCaの沈着を認めた（茶色部分）。



一方、$3D^-$ではCaの沈着は認めなかった。



（まとめ）

ラットの間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導する際のコラーゲンゲル内での三次元培養の有用性について検討した。同培養法では従来の二次元培養と比較して、培養初期にRunx2 遺伝子の発現が高くなり、骨芽細胞への分化が誘導され、続いて osterix 遺伝子やオステオカルシン蛋白など骨芽細胞の成熟に関連した遺伝子の発現や蛋白の分泌量が増加し、最終的に成熟した骨芽細胞の割合が増加した。従って、コラーゲンゲル内での三次元培養は、二次元培養よりも幹細胞の分化誘導に有用である可能性があると考えられる。

５．主な発表論文等

なし

６．研究組織

(1)研究代表者

河合　紀和（KAWAI NORIKAZU）
奈良県立医科大学　医学部　研究員
研究者番号：４０４５８０１３