

寺本彰・阿部康次

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

研究テーマ

15-2-6：幹細胞培養用 scaffold の開発と幹細胞の分化制御に関する研究

ABSTRACT

Embryonic stem (ES) cells have a pluripotent ability to differentiate into a variety of cell lineages in vitro. In this study, we will discuss the differentiation of ES cell (I) by using synthetic PEC as culture materials and (II) cultured with low intensity ultrasound (US).

(I) On the synthetic type PEC, ES cell differentiated to various type of tissue cells than that on the tissue culture dish. On the sulfonic type PEC, neurons like cells with long neurite were observed. On the other hand, intestine like structures with peristalsis was observed on carboxy type PEC. As a result it was suggested that functional group of PEC effect the differentiation of ES cells.

(II) With the US, ES cells differentiated to various types of tissue cells than that on the tissue culture dish (TCD). Moreover, alizarin red S positive cells appeared. This indicates that the differentiation of ES cells to osteoblast like cells was promoted by US. As a result it was suggested that exposure to US effect the differentiation of ES cells.

研究目的

ES細胞は多分化能と自己複製能を有することから、再生医療への応用が期待されている。そのためには、目的とする組織へ選択的に分化させることが重要であり、近年、液性因子の添加や他の細胞との共培養などによる分化制御の研究が盛んに行われている。しかし、生体由来の液性因子や異種の細胞への接触は再生医療への応用という面から考えると不利な点である。我々は、これらの因子との接触を伴わないES細胞の分化制御手段の開発を目的としている。本研究では、細胞の培養に際して必ず使用する培養基材、また遠達力であるメカニカルストレスが、ES細胞の分化へ及ぼす効果について検討を行った。

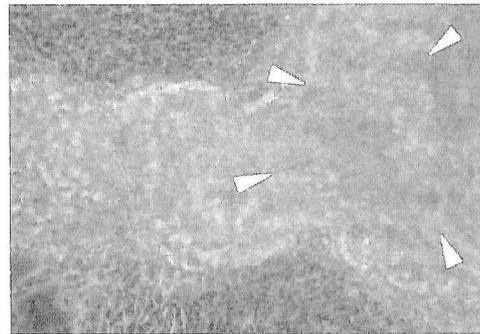


図1 シャーレ上で蠕動様運動を行うES細胞。

5年間の研究内容と成果

1. 多糖系高分子電解質錯体上におけるES細胞の分化挙動

硫酸基、カルボキシメチル基、リン酸基を導入したキチンとキトサンから成るPEC (S-PEC、CM-PEC、P-PEC) 上で、ES細胞の培養を行い、形態観察、RT-PCR法、免疫染色等の手段を用いて、その挙動について検討を行った。ES細胞からEBs (胚様体) を形成させた後に、各PEC上で培養を行うと、いずれのPEC上でも接着、増殖、分化が観察された。特に、S-PEC上で培養を行うと、突起を伸展させた神経様細胞が観察された。また、P-PEC上で培養を行うと、再現性良く、蠕動様の収縮運動部位が観察された。RT-PCR法によって、蠕動運動のペースメーカー細胞として知られている、Cajal間質細胞のマーカーであるc-Kit及びCD34のmRNAの発現が認められ、さらに免疫染色においても、平滑筋様細胞の周辺に、c-Kit陽性細胞が観察された。従って、蠕動様の収縮運動部位は、腸管様組織である可能性が示唆された。このような収縮運動は、S-PEC、



図2 シャーレ上で拍動を行うES細胞。

CM-PEC 上で培養を行った EBs では、P-PEC 上よりも遅れて観察され、TCD ではこの収縮運動は観察されなかった。このように、各 PEC 上で EBs の培養を行うと、PEC の種類によって、その分化挙動が異なる傾向にあることが示された

2. 超音波照射下における ES 細胞の分化挙動

培養 1 日目には、全ての EBs はフラスコに接着し、超音波を照射しても剥離は生じなかった。形態観察を行ったところ、照射群では、未照射群に比べ、発達した拍動部位や蠕動運動部位が観察された。培養 20 日目、30 日目にこれらの EBs の分化挙動の評価を行った。ICG 染色や DTZ 染色では、培養日数や超音波照射の有無に関わらず陽性細胞が確認されたものの、両群に有意差は認められなかった。アゾ染色では、培養 20 日目の照射群において濃く染色された細胞が確認されたのに対し、未照射群では薄く染色された細胞しか確認されなかった。培養 30 日目では、超音波照射の有無に関わらず濃く染色された細胞が観察された。さらに、アリザリンレッド S 染色では、照射群でのみ、陽性細胞が確認された。これらの結果より、超音波を照射することで EBs は骨組織への分化が促進されていることが示唆された。

培養 20 日目、30 日目に RT-PCR 法による評価を行ったところ、特に骨組織や、心筋細胞などの中胚葉系のマーカーが、超音波を照射した EBs でより強く発現していた (Fig. 3)。これらの結果より、mRNA レベルでも超音波照射により、中胚葉系組織 (心筋細胞、骨組織) への分化が促進されていることが示された。

このように、従来ほとんど検討が行われていなかった培養基材や超音波照射により、ES 細胞の分化挙動が影響をうけることが示された。今後、基材の構造や照射する超音波を変化させ、分化挙動についてさらに詳細に検討を行う。

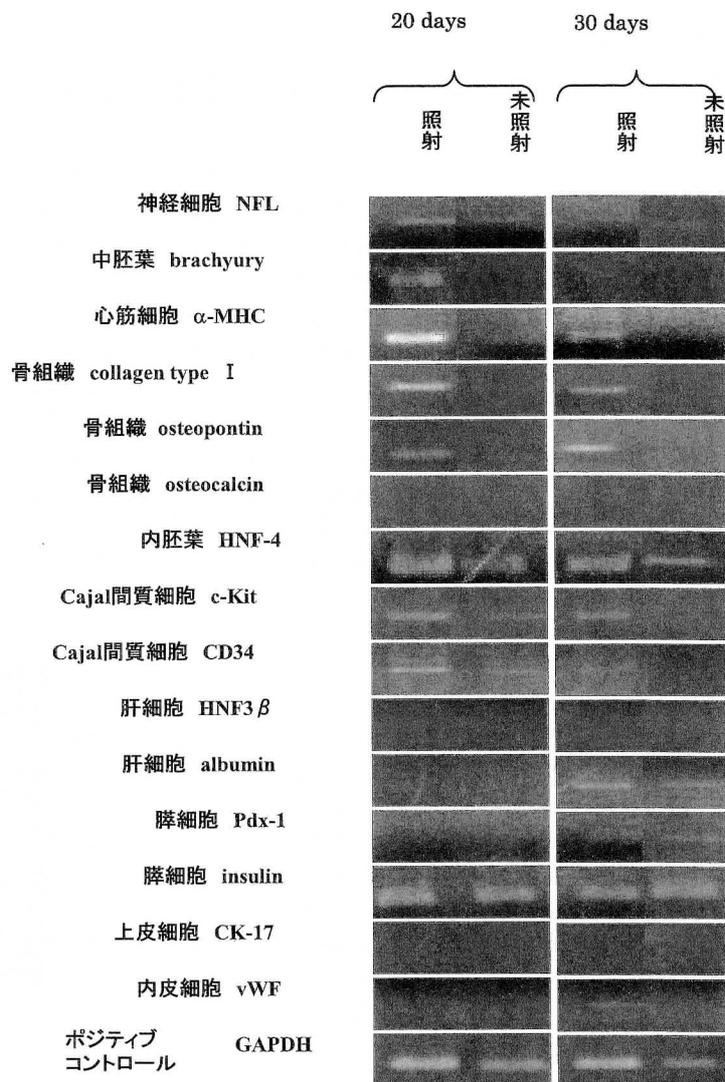


Fig. 3 超音波照射下におけるEBsの分化挙動、培養20および30日目