

心筋作製のための「隠れた因子」を明らかに

長岡技術科学大学大学院博士後期課程生物統合工学専攻修士の Minh Nguyen Tuyet Le、5年一貫制博士課程技術科学イノベーション専攻4年の高樋美佳、大学院工学研究科技術科学イノベーション専攻の大沼清准教授らは、ヒト iPS 細胞から心筋細胞を作る際に、細胞自身が分泌するタンパク質が「隠れた因子」として働き、効率よく心筋細胞が作れることを明らかにし、本因子の有力候補として3種のタンパク質を同定しました。今後、この「隠れた因子」の全容が明らかとなれば、再生医療の細胞ソースとして注目されている心筋細胞の作製を、熟練研究者のノウハウに頼らずに機械を用いて大量生産することが可能となります。本研究成果は学術雑誌 Scientific Reports 誌（英国、ネイチャー・リサーチ社）にて11月2日に公開されました。

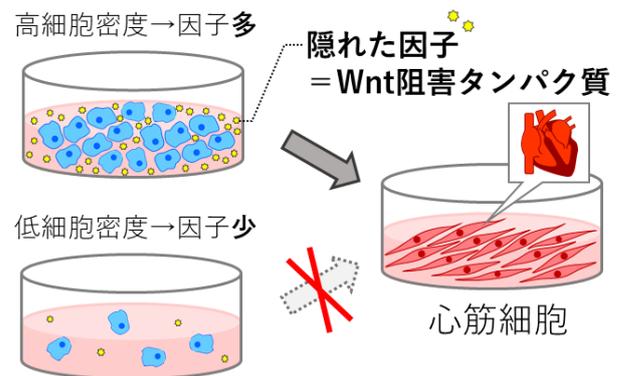


図1. 心筋作製における「隠れた因子」

1. 本研究のポイント

- ・心筋細胞を作るときのノウハウとして、細胞密度を高くすることで生じる「隠れた因子」が知られており、本因子は、細胞同士の物理的な接触ではなく、細胞が培養液中に分泌する物質であることを明らかにしました。
- ・心筋細胞を作る初期に Wnt（注1）シグナルを阻害することが、心筋細胞の分化（注2）を促進することを明らかにしました。
- ・Wnt シグナル阻害タンパク質の DKK1、DKK4、CER1 を分化途中の細胞が分泌している、つまりこれらが「隠れた因子」の有力候補であることを明らかにしました。

2. 研究背景

ヒト心臓は再生能力を持たないため、拒絶反応や倫理問題の少ないヒト人工多能性幹（iPS）細胞から作製した心筋細胞を用いた心疾患治療が注目されています。しかし、心筋細胞の作製メカニズムの全容は未だ解明できていません。その解明のカギを握ると考えられるのが、従来の心筋細胞の作製における「隠れた因子」です。実は、細胞の密度を非常に高くして「隠れた因子」を最大限に利用することが、心筋を作る際に重要であるというノウハウを、熟練の研究者たちは知っていました。そこで我々は、細胞がお互いに行き交っている「隠れた因子」（細胞間の相互作用）は細胞密度を高くすることで高濃度になり、その結果

として心筋細胞の作製が促される、との仮説を立てて研究を始めました。

3. 研究内容・成果

心筋分化に必要な「隠れた因子」を同定するためには、細胞間相互作用を抑制し、心筋分化に必要なシグナルを絞り込む必要があります。そこで、従来の心筋分化誘導法で多く用いられている高細胞密度ではなく、我々が以前に開発した従来の約 1/100 という低細胞密度からの心筋分化誘導法を利用しました（図 1 a、Le MNT, M Takahi, K Ohnuma, 2018, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*）。この低細胞密度の方法を用いれば、「隠れた因子」が非常に少ない状況を作ることができます。この低細胞密度の細胞を、高細胞密度の細胞と多孔膜（タンパク質が通過できる）で仕切って培養した結果、心筋分化率が有意に促進されました（図 1 b）。また、Wnt シグナルを早期（1~3 日目）に阻害することで、低細胞密度条件下でも心筋分化率が向上しました。更に、培養した後の培養液を調べたところ、Wnt シグナル阻害タンパク質である DKK1、DKK4、CER1 の分泌量が、分化 1~5 日目に大きく増加していました。これらの結果より、心筋分化を促進する「隠れた因子」は、細胞が分泌する Wnt シグナル阻害タンパク質であることが示唆されました。

4. 今後の展開

今後は、今回得られた各 Wnt シグナル阻害タンパク質を細胞へと添加することで、本当に心筋の作製効率が向上するかを明らかにします。また、シミュレーションにより Wnt シグナル阻害タンパク質の動態を明らかにします。これまで熟練研究者のノウハウであった「隠れた因子」の分子メカニズムの全容が明らかになることで、機械を用いて心筋細胞を大量生産することが可能となります。本研究の手法は、心筋細胞以外の細胞の作製にも応用可能であると考えられるため、再生医療の発展に貢献することが期待されます。

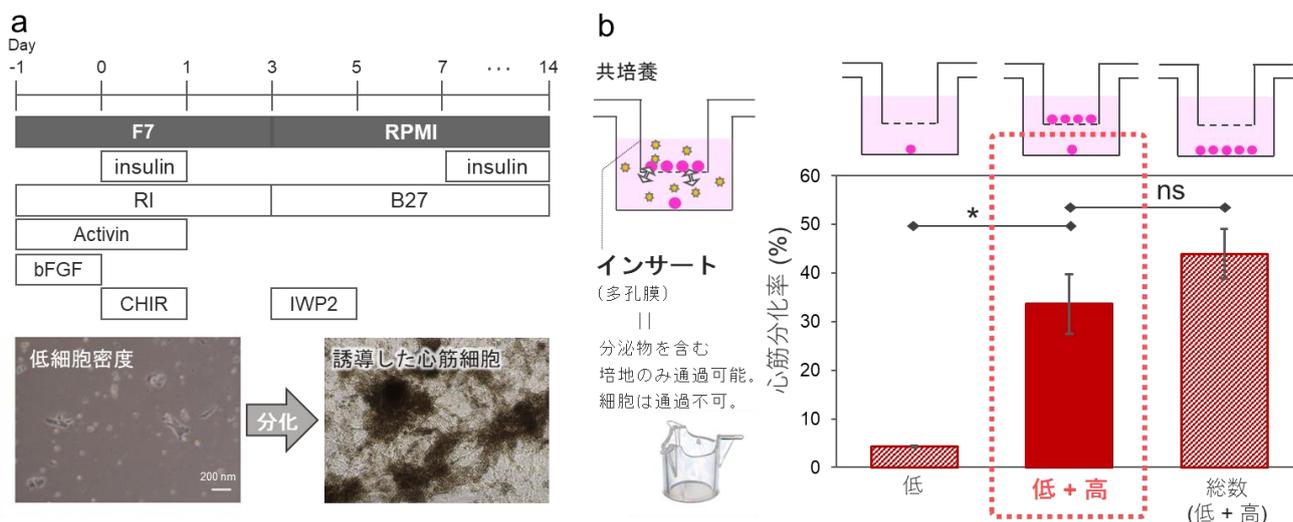


図 2. 独自の心筋分化方法に基づく「隠れた因子」の探索

a) 以前の研究で開発した、低細胞密度の培養方法。本実験では、「隠れた因子」が少ない対称群として利用した。

b) 低細胞密度のみで培養（左）。下では低細胞密度で培養・上では多孔膜上に高密度細胞培養（中：上下の細胞間で物理的接触がないが、タンパク質は透過）。低密度と高細胞密度を混ぜて培養（右：細胞が物理的に接触）。* 有意差あり、ns 有意差なし

<原論文情報>

タイトル : Auto/paracrine factors and early Wnt inhibition promote cardiomyocyte differentiation from human induced pluripotent stem cells at initial low cell density

著者 : Minh Nguyen Tuyet Le*, Mika Takahi*, Kiyoshi Ohnuma

* These authors contributed equally to this work

掲載誌 : Scientific Reports

doi : <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00763-z>

<用語説明>

注 1 : Wnt (ウイント) : 細胞の運命決定、移動、神経パターンニング、器官形成など、体作りの過程において重要な機構を制御しているシグナルの一つ。

注 2 : 分化 : iPS 細胞をはじめとする幹細胞が、異なった機能を持つ細胞に変化すること。

お問い合わせ

国立大学法人長岡技術科学大学大学院工学研究科技術科学イノベーション専攻

准教授 大沼 清 (おおぬま きよし)

TEL : 0258-47-9454 E-mail : kohnuma@vos.nagaokaut.ac.jp

国立大学法人長岡技術科学大学大学戦略課企画・広報室

TEL : 0258-47-9209 FAX : 0258-47-9010

E-mail : skoho@jcom.nagaokaut.ac.jp <https://www.nagaokaut.ac.jp/>