

ゲルの厚さによるヒト間葉系幹細胞(hMSC)の上皮分化への影響

Effect of thickness of gel on epithelial differentiation of the human mesenchymal stem cell (hMSC)

○ 中町信敏 (三重大) 水田裕磨 (三重大) 杉田夏美 (三重大)

宮本啓一 (三重大) 堀内孝 (三重大) 太田裕治 (お茶の水女子大)

Nobutoshi Nakamachi, Mie University Yuma Mizuta, Mie University Natumi Sugita, Mie University
Keiichi Miyamoto, Mie University Takashi Horiuti, Mie University Yuji Ota, Ochanomizu University

Abstract: Recent studies report that the mechanical environment influences the behavior and function of various types of cells, including Mesenchymal Stem Cell (MSC). However, the mechanism remains largely unknown. In our study we cultured hMSC on either collagen or elastin gels at varying thickness, and assessed commitment to epithelial lineage. hMSC cultured on type-I collagen gel in 1900 μ m of thickness expressed cytokeratin-18(CK-18: as epithelial marker) while hMSC cultured on elastin gel hardly expressed CK-18. Moreover, MSCs culture on type-I collagen gel in 1900 μ m of thickness induced actin depolymerization. These results reveal that thickness of gel is one of the factors to determine a fate of hMSC in its differentiation as well as type of extracellular matrix. Further, the cytoskeleton is a critical factor for the differentiation.

Key Words: MSC, differentiation, ECM, collagen gel, elastin gel, thickness, stiffness, cytokeratin-18, F-actin

1. 緒言

ヒト間葉系幹細胞(human Mesenchymal Stem Cell: hMSC)は自己複製能と多分化能を有しており再生医療の細胞源として期待されている。hMSCは、幹細胞自身の周りの環境(幹細胞 niche)によって分化の方向が左右されることが知られているが、近年では、幹細胞を弾性率の異なる足場(Scaffold)上で培養することにより様々な細胞に分化することが報告されている。細胞が何らかの方法により足場の硬さを認識するものと考えられるが、現時点でそのメカニズムは解明されていない。そこで、本研究ではhMSCの分化制御の確立及びメカニズムの解明を目的とし、材料表面の物性がMSCの分化に与える影響を調べた。材料には、type I collagen, elastinを用いた厚さの異なる足場を作成し、その上でhMSCを培養し特異タンパク発現を測定することでhMSCの分化に与える影響を調べた。さらに、actinストレスファイバー測定を行い、ゲル上での上皮分化との関連性を検討した。

2. 方法

2-1 collagen 細胞足場の作成

豚の血管から抽出・精製したI型コラーゲンをろ過滅菌後、凍結乾燥し実験に供した。ゲル溶液の最終濃度を3.0mg/mlになるように調製し、内径10mm、高さ100, 300, 600, 1000, 1500, 1900 μ mの型に注ぎ37 $^{\circ}$ Cでインキュベートしゲル化させた。完成したゲルはPBSで洗浄し使用した。

2-2 elastin 細胞足場の作成

豚の血管から抽出したエラスチンを一度フィルター滅菌し凍結乾燥し実験に供した。凍結乾燥後のエラスチンをゲル溶液の最終濃度25%になるように滅菌水に溶解し、架橋剤としてDode-DSP(ゲル架橋倍率 \times 0.5)を、ゲル化促進剤としてNa₂CO₃を用いた。この調整した溶液を型に注ぎ37 $^{\circ}$ Cでインキュベートしゲル化させた。作成したゲルは、一日間培地にさらすことで膨潤させた。膨潤後、余分な部分を取り除き、足場として使用した。

2-3 細胞培養

hMSC(RIKEN)継代数2~4を使用した。培地には、DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10%FBS(Featal Bovine Serum)を用い、播種密度1000cells/cm²の条件で、1)で作成したゲル上(24穴プレート)において二週間培養した。培地交換は3日毎に行った。

2-4 ゲル上培養後細胞のタンパク発現

hMSCをゲル上で1又は2週間培養し、免疫化学蛍光染色によって、上皮分化マーカーであるcytokeratin-18(CK-18)を染色した。そして、ランダムに3ヶ所写真を撮影し、発現率を算出した。

2-5 ゲル上培養後細胞 F-actin 形成

ゲル上におけるMSCの分化メカニズムとして、actinストレスファイバー形成が関与していると仮説を立てた。各基質足場の上で1週間培養し、F-actinの染色を行った。

3. 結果

3-1 ゲル上培養後細胞のタンパク発現

ゲル上培養後の細胞について特異タンパク質発現を調べた。コラーゲンゲル上での培養後では、ゲルの厚さを厚くしていくことで上皮分化マーカーであるCK-18の染色率が増加していくことが示された。厚さが100 μ m~600 μ mのゲル上培養では、CK-18の染色率が約20%であったが、厚さが1000 μ mを越えると染色率が約60%となり約半分の細胞がCK-18を発現していることがわかった。また、上記と異なる基質であるエラスチンゲル上での培養後では培養期間やゲルの厚さにも関係なくCK-18の高い発現率は得られず、最大でも20%ほどであった。

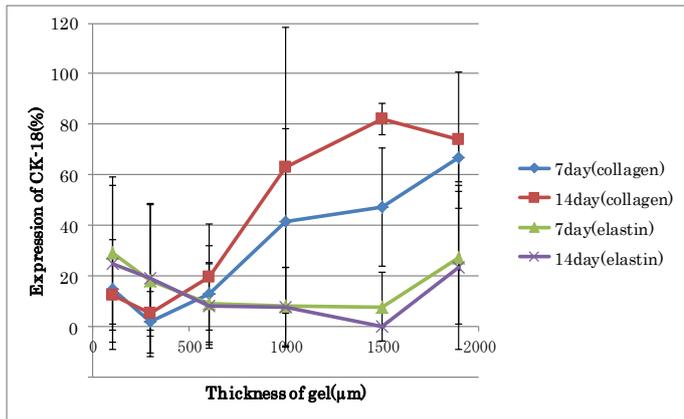


Fig.1 The rate of the stained cell that expressed cytokeratin-18

3-2 ゲル上における細胞骨格形成

ゲル上培養後の細胞について細胞骨格である F-actin の形成を調べた。厚さが 100 μ m の Collagen ゲル上の細胞では F-actin の形成が観察された。一方、厚さが 1900 μ m の Collagen ゲル上の細胞では F-actin の形成が抑制される結果を得た。また、Elastin ゲル上で培養した細胞ではいずれの厚さにおいても F-actin の形成が観察された。この結果は、細胞骨格である F-actin 形成と上皮分化との間に関係があることを示唆するものであった。

4. 考察

本研究から特筆すべき二つの結果が得られた。MSC の分化が細胞外マトリックスの種類と物理的性質によって制御できるということである。

I 型コラーゲン上で培養した MSC は被覆、100 μ m ~ 1900 μ m の厚みによらず MSC とコラーゲンゲルの間で形成する界面はどれも同じはずである。即ち、コラーゲンの細胞接着ドメインである RGD に $\alpha 2 \beta 1$ 等の特異的なインテグリンが結合することに関しては何らゲルの厚みを特徴付けるものは無い。そこでコラーゲンと異なる細胞-基質結合機序を持つエラスチン上で同様な条件下で CK-18 発現を調べた。エラスチンは細胞接着ドメインである VGVAPG を持ち、Elastin Binding Protein を介して結合すると言われている。ゲルの厚みにより CK-18 の発現は影響を受けるが、それにはマトリックスと MSC の結合が鍵となることを示す結果である。ただ、単にゲルの厚みを変えたところで、分化を制御することはできないということである。MSC の CK-18 発現、即ち上皮分化は少なくとも I 型コラーゲンと MSC のインテグリンを介する結合が必要であることを示唆するものと考察した。

次に、重要な点はコラーゲンの場合ではゲルの厚みにより CK-18 の発現が異なるということである。インテグリンを介する結合は重要であるが、100 ~ 600 μ m のゲルと 1000 μ m 以上のゲルでは CK-18 の発現量は大きく異なる。即ち、MSC はインテグリン結合を介して何らかの厚みの情報を認識していることである。使用したゲルは 3 mg/ml の I 型コラーゲンゲルなのでその固有の物性値、例えば弾性率は同じであるので、これらのメカニズムにはゲルの変位による細胞形態の変化が関与しているものと考えられる。原子間力顕微鏡(AFM)のコンタクトモードによるゲル物性の測定から厚いゲルの変位が薄いゲルに比べ大きいことが示された。このことから、1900 μ m の厚いゲル上に接着した細胞は、自由な運動が拘束され伸展を妨げられた形態を

とる。一方、厚さ 100 μ m ゲル上では伸展することが出来る。即ち、ゲルの厚さによって細胞は異なる形態を示す。

F-actin の染色結果は、ゲルの厚みの違いで細胞骨格に違いがあることを示したものである。このような細胞骨格に何らかの影響を及ぼすことにより CK-18 の発現に影響を与えていることを示唆する結果であるが、その後のメカニズムについては不明であり今後、更なる解明が必要である。

5. まとめ

MSC は、適当な ECM の選択と足場の物性(厚さ/硬さ)の調整によって様々な細胞への分化が可能であることが示唆された。そのメカニズムの一つにアクチンの重合が関与していることが実験的に明らかになった。今後さらに細胞と足場の関係性についてさらなる調査を行っていき、それにより、MSC があらゆる細胞に分化可能となれば、今後の再生医療のさらなる発展につながっていくものだと考えている。

参考文献

- (1) Adam J. Engler, Shamik Sen, H. Lee Sweeney, and Dennis E. Discher, Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. Cell Vol,126(4), pp677-689, 2006