

レチノイン酸による間葉系幹細胞の上皮様形質変化

Epithelial-like changes of human mesenchymal stem cells on thick collagen gel
by retinoic acid

○溝口誠也(三重大) 久保田捷(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)

Seiya Mizoguchi, Mie University, Sho Kubota, Mie University

Keiichi Miyamoto, Mie University Takashi Horiuchi, Mie University Yuji Ohta, Ochanomizu University

Abstract: Human mesenchymal stem cell (hMSC) has pluripotency, and demonstrated a possible differentiating ability to epithelial lineage. According to our previous studies, hMSC expresses the epithelial marker Cytokeratin 18 (CK18) on thick collagen gel, without morphological change to cobble-stone shape. In order to achieve a complete differentiation to epithelial lineage all-trans retinoic acid (ATRA) was used, combined with thick gel culture. As a result, hMSC cultured on 1900 μ m gel showed a three-dimensional and cobble-stone like morphology by addition of ATRA. In addition, expression of mesenchymal markers Vimentin decreased, therefore it was suggested that epithelial differentiation of MSC on thick gel was promoted by ATRA.

Key Words: MSC, epithelial differentiation, ATRA, morphology change

1. 緒言

ヒト間葉系幹細胞(hMSC: human Mesenchymal Stem Cells)は多分化能を有する体性幹細胞であり、hMSCを再生医療へ応用する前段階として、*in vitro*での分化制御技術の確立が不可欠である。本研究において、厚さ1900 μ mと100 μ mの0.3% Type I collagen gel上で培養したhMSCが上皮分化マーカーとして知られるCytokeratin-18(CK18)を高発現することを明らかとした¹⁾。しかし、CK18を発現したhMSCでも細胞形態の変化などに関して大きな変化が見られていなかった。本研究では、足場の物性による分化制御に加えて上皮分化の誘導因子として知られる全トランス型レチノイン酸(ATRA: All-Trans Retinoic Acid)を用いることでMSCを完全に上皮分化した状態に近づけることを目的とした。評価方法として、MSCの形態変化を細胞面積と真円度という二つの観点から測定を行い、さらに、上皮分化に関与するとされるSnailやVimentinなどの遺伝子発現を測定した。

2. 方法

2-1 足場の違いによるhMSCの形態の経時的な形態変化

Type I collagen 1900 μ m gel上と100 μ m gel上、dish上のそれぞれで10% FBS/DMEM培地にて培養中のhMSCを5min/frameの間隔で2日間の動画撮影を行い、経時的な形態変化を測定した。測定は播種後から1時間毎に48時間行い、形態変化の定量化を行った。画像処理ソフトimageJを用い、細胞面積と真円度の経時的変化を定量化した。

2-2 レチノイン酸によるhMSCの形態変化

厚さ100 μ m, 1900 μ mの0.3%collagen gelを作成し、それぞれのゲル上とdish上に10% FBS/DMEMにレチノイン酸

を最終濃度50 μ Mとした培地中で7日間培養しhMSCの形態を観察した。形態変化の測定は、播種後1日後と7日後に位相差顕微鏡で撮影した写真からimageJを用いて細胞面積と真円度を測定した。

2-3 レチノイン酸による上皮分化関連遺伝子の発現の測定

2-2と同様に厚みの異なるゲルとdish上でレチノイン酸添加もしくは未添加の培地で培養した7日目のhMSCの遺伝子発現をreal-time PCR法を用いて行った。

3. 結果

3-1 足場の違いによるhMSCの経時的な形態変化

Fig.1AとFig.1Bにcollagen gel上とdish上におけるhMSCの細胞面積と真円度の経時的変化を示す。細胞面積についてはdish上、100 μ m gel上において時間経過とともに増加するのに対し、1900 μ m gel上ではほぼ横ばいの変化を示した。真円度に関してはdish上が少し低い値を示したが、collagen gelの厚みによる変化は見られなかった。

Fig.1A

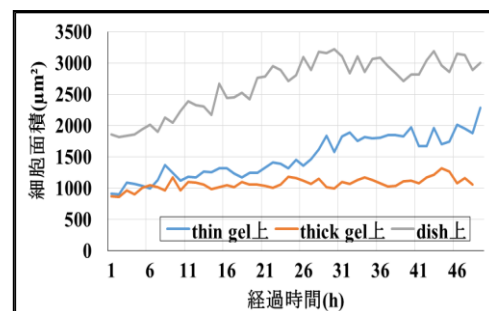


Fig.1B

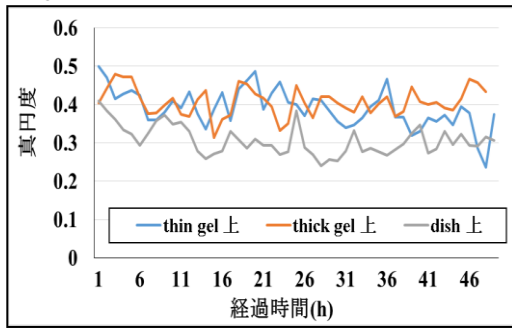


Fig.1 Morphological changes of hMSC by substrate thickness

3-2 レチノイン酸による hMSC の形態変化

Fig.2 に dish, thin gel, thick gel 上で培養した hMSC において、レチノイン酸添加による細胞面積と真円度の 1 日後と 7 日後の変化を比較した。細胞面積に関しては、dish 上、100 μ m ゲル上においてレチノイン酸添加による減少が見られ、真円度については dish と 1900 μ m ゲル上において上昇が見られた。

Fig.2A

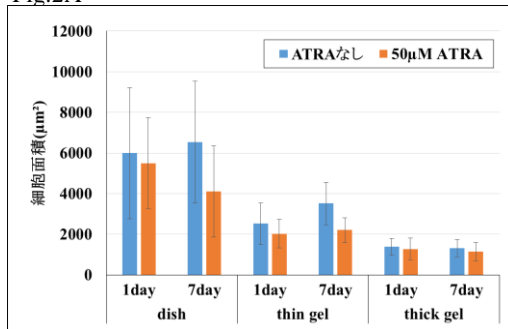


Fig.2B

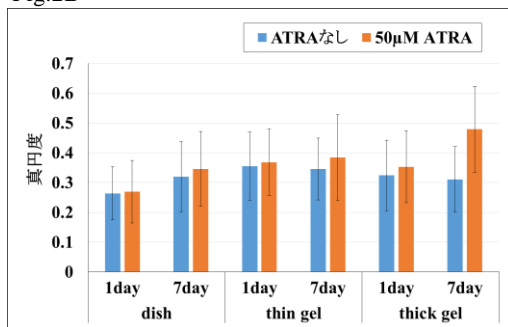


Fig.2 Morphological changes of hMSC by ATRA

3-3 レチノイン酸による上皮分化関連遺伝子の発現

real-time PCR により dish 上と 1900 μ m gel 上で ATRA 添加による遺伝子発現の変化を比較した。hMSC に高発現する Vimentin は 1900 μ m collagen gel 上で減少し、ATRA 添加によりさらに減少することが示された。

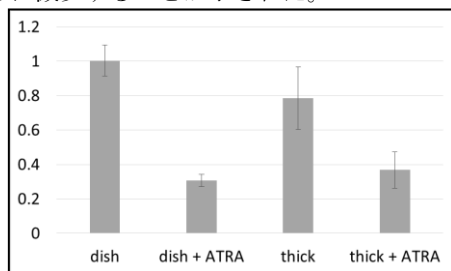


Fig.3 Gene expression changes of Vimentin by ATRA

4.考察

100 μ m、1900 μ m gel 上と、足場が厚くなるにつれて細胞面積が減少するという結果が得られた(Fig.1, 2)。有限要素法解析から、100 μ m gel と 1900 μ m gel では同じ弾性率においても厚みにより細胞の歪に違いが生じ、1900 μ m gel の方でより大きく歪むという事が推測できる²⁾。そのため、歪の少ない 100 μ m gel 上の細胞の方が伸展しやすいため細胞面積における差が生じたものと考えている。さらに、細胞面積の経時的な変化(Fig.1A)から、100 μ m gel 上と dish 上の hMSC では、時間が経過するにつれて細胞面積の増加が見られたが、1900 μ m gel 上では細胞面積の増加が見られないという結果が得られた。細胞の容積を一定であると仮定すると、細胞面積の減少は細胞がより高さを持つ形態変化を示したという事になる。これは上皮細胞が細胞間結合を形成し、極性を示すという特徴と一致する。

collagen gel 上での培養による上皮系への分化にレチノイン酸添加を組み合わせることで、上皮様形態変化の促進を試みた。レチノイン酸添加した MSC と未添加の MSC を培養 7 日後で比較すると、dish 上と 100 μ m gel 上で培養をした際には細胞面積の大きな減少が見られ、1900 μ m gel 上に関して細胞面積は小さい状態を維持する結果となった。1900 μ m gel 上においては真円度に関して上昇が見られ、上皮細胞に見られる玉石状の形態変化に近づいたと言える。上皮細胞は隣接する細胞同士が接着し結合した構造を取るために、細長い形態ではなく玉石状の形態を取っている。そのため、真円度の上昇は細胞同士が密着した構造の上皮細胞に必要な要素と言え、今回の結果は上皮分化への促進が示唆されるものと考えた。

これらの形態変化のみならず遺伝子レベルでの変化を調べるために real-time PCR を行った。結果として、Vimentin の発現が減少するという結果が得られた (Fig.4-8)。Vimentin は細胞骨格タンパクの 1 つである中間経フィラメントで、主として中胚葉由来の細胞に存在するとされている。上皮系の細胞である腹膜中皮細胞において、Vimentin と cytokeratin を共発現するという報告があるが、これは中皮細胞が中胚葉に由来する細胞であることが理由であろう³⁾。そのため、今回の Vimentin の発現が減少するという結果は、中胚葉由来の細胞である hMSC が外胚葉、もしくは内胚葉の細胞へと分化していることを示唆している。さらに上皮細胞に特有の中間経フィラメントである cytokeratin18 の発現が上昇していることを踏まえると、外胚葉もしくは内胚葉由来の上皮細胞への分化が促進されていることが考えられる。

5.まとめ

足場の collagen gel の厚みによる hMSC の上皮系への分化は細胞形態を伴う。さらにレチノイン酸を添加することで hMSC の上皮分化を促進させることができることが示唆された。

参考文献

- (1) 田野 裕美: 材料表面の物性によるヒト間葉系幹細胞の分化制御/平成 24 年度三重大学修士論文
- (2) 杉田 夏美: 細胞外マトリックスによる間葉系幹細胞の上皮分化/平成 25 年度三重大学卒業論文
- (3) Steven E, *et al*: Cells in focus The mesothelial cell, *IJBCB*, 2004; 36: 9-16.