

## 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

## Influence of the epithelial differentiation on the human mesenchyme system stem cell (hMSC) by the thickness of gel Cells

○ 中町信敏 (三重大)      田野裕美 (三重大)      竹林貴史 (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    Hiromi Denno, Mie University    Takafumi Takebayashi, 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 MSCs on either collagen or elastin gels at varying thickness, and assessed commitment to epithelial lineage. MSC cultured on type-I collagen gel in 1900 $\mu$ m of thickness expressed cytokeratin-18(CK-18: as epithelial marker) while MSC cultured on elastin gel didn't express CK-18. These results reveal that thickness of gel is one of the factors to determine a fate of MSCs in its differentiation as well as type of extracellular matrix.

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

## 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堅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。本研究では、厚さの異なる足場を作成し、その上でhMSC(human Mesenchymal Stem Cell)を培養し特異タンパク発現を測定することでhMSCの上皮分化を調べた。

## 2. 方法

## 1) 細胞足場(collagen)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、凍結乾燥したものを使用した。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 $\mu$ 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) 細胞足場(elastin)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たものを使用した。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(体積分率;2.5%)、ゲル化促進剤としてNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>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。

## 3) 細胞培養

RIKENから購入したヒト間葉系幹細胞(human Mesenchymal Stem Cell: hMSC)継代数2~4を使用した。培養培地には、DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10%FBS(Fetal Bovine Serum)を用い、播種密度1000cells/cm<sup>2</sup>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。

## 4) ゲル上培養後細胞のタンパク発現

hMSCを培養期間1週間、2週間としてゲル上で培養し、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。

## 3. 結果

## 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 $\mu$ m~600 $\mu$ 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 $\mu$ 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の発現は確認されなかった。

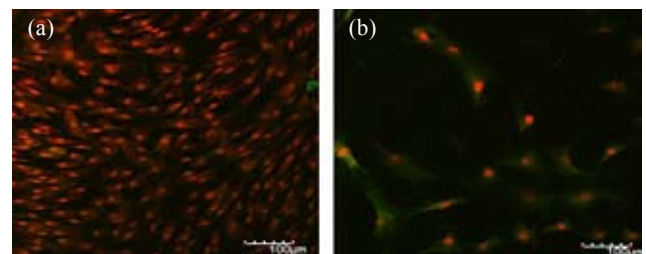


Fig.1 The expression of cytokeratin-18 on the collagen gel. (a)100 $\mu$ m thickness (b)1900 $\mu$ m thickness

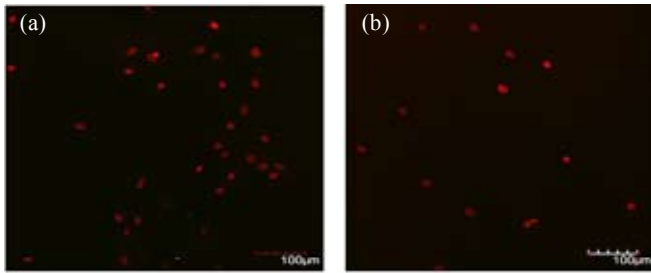


Fig.2 The expression of cytokeratin-18 on the elastin gel.  
(a)100µm thickness (b)1900µm thickness

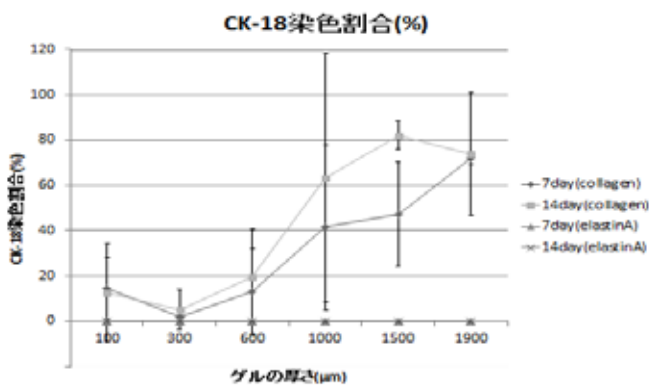


Fig.3 The rate of the stained cell that expressed cytokeratin-18

#### 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 の厚みをどのように変化させたとしても MSC とコラーゲンゲルの中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。ここで、重要と思われることはエラスチンでは全く CK-18 に代表される分化への影響がみられなかったことである。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ということである。

ここで、重要な次の点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。共同研究者の田野、太田らは 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を実証した。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。たとえ同じ弾性率をもつゲルでも厚くなればなるほど外力に対する変位は大きくなるはず

であるので AFM から得られた結果は妥当であり、それをそのままゲル状の MSC に置き換えて考察することは構わないであろう。インテグリンを介してマトリックスを掴んだ MSC はゲルが厚くなるにつれ、即ちゲルの変位が大きくなり広がろうとする自由度を失われ、極端な場合には球状となる。我々の既報では細胞面積はゲルの厚みとともに減少していることからこの仮説は正しいと思われる。

このような細胞骨格になん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、1000µm 以上の厚さのコラーゲンゲル上の培養により上皮分化できる可能性が示唆された。一方、エラスチンゲル上の培養では CK-18 発現がみられず上皮分化できる可能性は低い。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。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であると考えている。

#### 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
- (2) Denno H, et al. collagen ゲルによるヒト間葉系幹細胞の上皮分化への影響. 第 28 回ライフサポート学会, 2012