

collagen ゲルの厚さによるヒト間葉系幹細胞の上皮分化への影響

The effect of collagen gel thickness on the epithelial differentiation of human mesenchymal stem cells

○田野裕美 (三重大) 竹林貴史 (三重大) 中町信敏 (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)
Hiromi DENNO, Mie University Takafumi TAKEBAYASHI, Mie University
Nobutoshi NAKAMACHI, Mie University Keiichi MIYAMOTO, Mie University
Takashi HORIUCHI, Mie University Yuji OTA, Ochanomizu University

Abstract: It is epochal if physical property can regulate stem cell fate. Our goal is to elucidate mechanism for commitment of mesenchymal stem cell (MSC) to a certain direction of lineage by a mimic of stem cell niche. We cultured MSCs on collagen gel in about 100 μm and 1900 μm thickness. We used RT-PCR to determine the gene expression of differentiation markers, cytokeratin-18(CK-18: as epithelial marker), Alkaline phosphatase(ALP: as osteogenic marker) and PPARγ2(as adipogenic marker). Compared to MSC cultured on plastic dish, CK-18 remained highly expressed while expression of PPARγ2 and ALP diminished to 50% and 20%, respectively. Moreover, MSCs cultured on the collagen gel with 10μM all-trans retinoic acid (ATRA) induced not only CK-18 expression but cluster formation. These results suggest that ATRA, collagen extracellular matrix and thickness of gel are factors to determine a fate of MSC in an epithelial differentiation.

Key Words: MSC, epithelial differentiation, collagen gel, cytokeratin-18

1、諸言

体性幹細胞のひとつである間葉系幹細胞(MSC)は骨や軟骨、脂肪などへと分化できる多分化能を有するため、再生医療において幹細胞源として期待されている。しかし、実際の医療に応用するには、自在に分化制御する技術の開発が必要である。そこで、本研究では MSC 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査した。材料には type I collagen ゲルを用い、分化の評価には、上皮(cytokeratin-18(CK-18))、脂肪(PPARγ2)、骨(Alkaline phosphatase(ALP))の遺伝子及びタンパク発現の測定を行った。次に、ゲル上培養に all-trans retinoic acid(ATRA)を添加して培養を行い、材料であるコラーゲンと誘導因子である ATRA の相乗効果が MSC の分化に与える影響を調査した。

さらに、actin ストレスファイバー、ゲルの変位測定を行うことで、ゲル上における分化メカニズムの調査を行った。

2、方法

2-1 collagen ゲル上培養

濃度 3mg/ml、厚さ 100、1900μm の collagen ゲルを製作し、ゲル上で MSC を培養後、分化に与える影響を調査した。厚さ 1900 μm のゲル上で 7 日間培養後、上皮マーカーである CK-18、脂肪転写因子である PPARγ2、骨分化マーカーである ALP の遺伝子発現を RT-PCR により測定した。また、7、14 日間 plastic dish、厚さ 100、1900 μm のゲル上での培養後、免疫蛍光染色により CK-18 のタンパク発現を測定した。

2-2 all-trans retinoic acid (ATRA)による MSC の上皮分化

上皮分化誘導剤である ATRA⁽¹⁾が MSC の上皮分化に与える影響を調査した。ATRA 添加培地にて 7、14 日間培養後、免疫蛍光染色により CK-18 のタンパク発現を測定した。さらに、厚さ 1900 μm のゲル上での培養に ATRA を添加して培養を行い、CK-18 のタンパク発現を測定した。

2-3 ゲル上における MSC の分化メカニズム

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、調査を行った。actin ストレスファイバー形成を直接阻害する cytochalasin D を培地に添加し培養することで、CK-18 発現への影響を調査した。また、ゲルの厚さによる細胞への力学的影響を調査するために原子間力顕微鏡(AFM)を用い、コンタクトモードにて各ゲルの変位を測定した。

3、結果

3-1 collagen ゲル上培養

plastic dish 上での MSC の mRNA 発現に対するゲル上での MSC の相対的な mRNA 発現を Fig.1 に示す。ゲル上培養における MSC の各分化マーカーの発現は CK-18 が最も高く、維持されていたが脂肪(PPAR γ 2)では約 50%、骨(ALP)では約 20%の発現率であった(Fig.1)。次に、CK-18 タンパク発現を免疫蛍光染色により測定したところ、1900 μm の厚いゲル上での培養において CK-18 の陽性細胞の出現を認めた。しかし、plastic dish 上、100μm の薄いゲル上では CK-18 陽性細胞は認められなかった(Fig.2)。

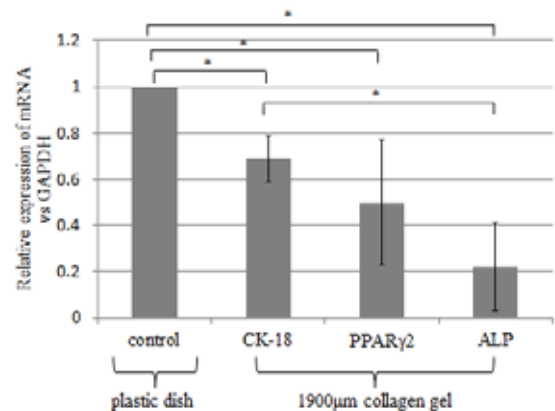


Fig.1 The expression of mRNA on the collagen gel vs control.

すなわち、ゲルの厚さによって細胞は異なる形態を示す (Fig.4)。MSC の場合、この細胞形態の違いが分化に影響を与えたと考えられる。

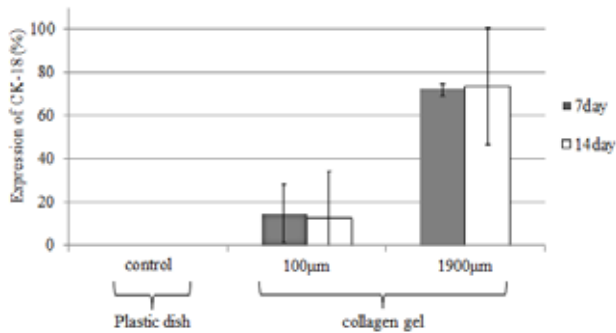


Fig.2 The expression of CK-18 on the collagen gel.

3-2. ATRA による MSC の上皮分化

免疫蛍光染色による CK-18 タンパク発現は約 20% の陽性細胞を確認した。しかし、Collagen ゲル上培養と ATRA を組み合わせることで collagen ゲル上培養と同様の陽性細胞数を示し、さらにゲル上培養では見られなかったクラスター形成を認めた (Fig.3)。このことから、ATRA と組み合わせることで MSC はより上皮細胞様の形態を有することが示された。

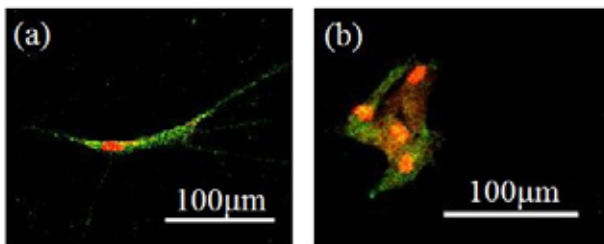


Fig.3 The expression of CK-18 on the collagen gel treated ATRA.

(a) MSC cultured on the collagen gel. (b) MSC cultured on the collagen gel treated ATRA.

3-3 ゲル上における MSC の分化メカニズム

actin の重合阻害剤である Cytochalasin D の添加の有無に関わらず、CK-18 陽性細胞数は変わらなかった。また、AFM によるゲルの変位の測定では、10mg/ml の collagen ゲルにおいて、100µm のゲルより 1900µm のゲルの方が約 4 倍変位は大きく、変形しやすい足場であることが示された。

4、考察

本研究において、collagen ゲル上で培養した MSC は plastic dish 上での培養と比較して CK-18 の発現が最も高く、ALP の発現が最も低いことが確認された。また、CK-18 の免疫蛍光染色の結果から MSC が上皮細胞へ分化していることが示された。さらに、ゲルの厚さによって CK-18 の発現に違いがあることから、足場の物性が MSC の分化において重要な役割を果たしていることがわかる。

薄いゲルでも厚いゲルでも、3mg/ml collagen ゲルの有する固有の物性値は変化しないことから、これらのメカニズムにはゲルの変位が関与していると考えられる。AFM の結果より、厚さ 1900µm のゲルは大きく変位しており、変形しやすい足場であるといえる。そのため、細胞は接着後、運動することができず、収縮した形態をとる。一方、厚さ 100µm のゲルでは細胞が運動し、伸長することができる。

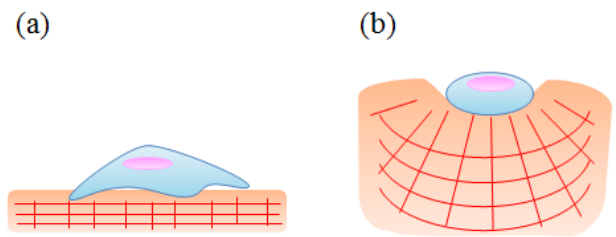


Fig.4 The effect of thickness to modification of gel and cell morphology.

(a) 100µm thickness (b) 1900µm thickness

また、細胞形態だけでなく、integrin を介したシグナルも考えられる仮説の一つである。細胞は ECM と結合する際、integrin を介する。そのため、integrin 由来のシグナルが CK-18 発現誘導に働いた可能性がある。また、柔らかい基質上では focal adhesion の発現が減少していること⁽²⁾、AFM によるゲルの変位測定の結果より 1900µm のゲルと 100µm のゲルでゲルの変位・柔らかさが異なることから、各ゲル上において integrin の発現量に差が生じ、それが CK-18 発現に関与したと考えられる。

以上より、現在考えられるシグナル経路を Fig.5 に示す。

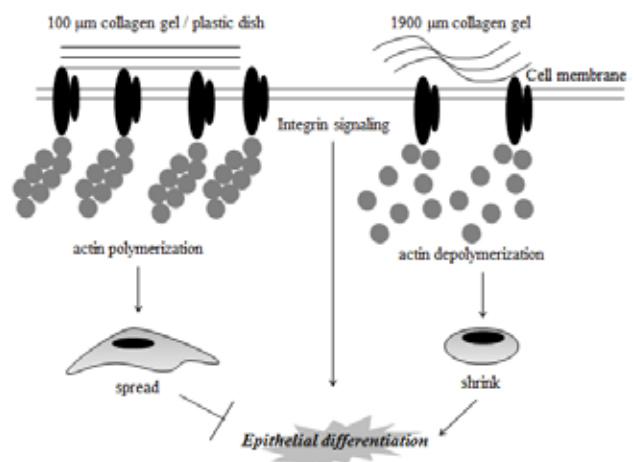


Fig.5 Signaling of the collagen gel thickness to epithelial differentiation

5、結論

以上の結果から、足場の物性が MSC の運命決定において重要な役割を果たしていること、そして ATRA のような分化誘導因子と組み合わせることで MSC の運命をより明確に決定できることが示された。また、分化のメカニズムにはゲルの変位により生じる細胞形態の変化、integrin が関与している可能性が示唆された。

6、参考文献

- 1) Martin Brzoska, Helmut Geiger, Stefan Gauer, Patrick Baer, Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells, Biochemical and Biophysical Research Communication, vol. 330, no. 1, pp142-150, 2005

- 2) Jennifer S. Park, Julia S. Chu, Anchi D. Tsou, Rokhaya Diop, Zhenyu Tang, Aijun Wang, Song Li, The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β , Biomaterials, vol. 32, no. 16, pp3921-3930, 2011