

## collagen ゲルの物性による間葉系幹細胞の上皮分化への影響

## The effect of collagen gel physical property on the epithelial differentiation of human mesenchymal stem cells

○水田裕磨 (三重大) 久保田捷 (三重大) 溝口誠也 (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)

Yuma Mizuta, Mie University Syoh Kubota, Mie University, Seiya Mizoguchi, Mie University  
Keiichi Miyamoto, Mie University Takashi Horiuti, Mie University Yuji Ota, Ochanomizu University

**Abstract:** We have reported a thickness-dependent epithelial commitment of hMSC on 0.3% type I collagen gel but not on 25% elastin gel<sup>(1)</sup>. In this study, 1% type I collagen gel which has similar elastic modulus to that of 25% elastin gel, was used to comprehend the biological effect of hMSC-matrix interaction. Although hMSC cultured on 1900 $\mu$ m 1% collagen gel expressed CK-18 accompanied with actin depolymerization, CK-18 was expressed on 100 $\mu$ m 1% collagen gel, too. It is controversial to the previously reported results on 100 $\mu$ m 0.3% collagen gel. It is speculated that a number of integrin-ligand conjugation may be crucial issue to determine actin polymerization. While actin polymerization is governed below a certain level of integrin ligand density, depolymerization may be induced by increase of its density due to deformation on 1900 $\mu$ m collagen gel (0.3%).

**Key Words:** hMSC, epithelial differentiation, collagen gel, cytokeratin18, actin

## 1. 緒言

ヒト間葉系幹細胞(hMSC: human Mesenchymal Stem Cell)は自己複製能と多分化能を有しており、再生医療への応用が期待されている。再生医療へ応用する為には、分化制御方法の確立が必要である。これに関して、近年では細胞足場の物性により hMSC の分化制御が可能である事が明らかとなってきた。例えば、足場の硬さにより骨、筋、神経への分化制御が可能である。本研究室においては細胞足場となる 0.3% Type I collagen ゲルの厚さによって上皮細胞への分化制御が可能である事を明らかにした<sup>(1)</sup>。また、25% elastin gel 上ではその厚さに関わらず上皮分化が誘導されない事を明らかにした<sup>(1)</sup>。しかし、この時の2つのゲルの弾性率が異なっている事から、本研究では elastin gel と同様の弾性率を有する 1%collagen gel を用いた際の hMSC の上皮分化の影響と用いたゲルの物性を調査する事で、細胞足場の物性が hMSC の上皮分化に与える影響を調査した。

## 2. 方法

## 2-1 1% collagen gel 上培養 hMSC の CK-18 発現確認

hMSC の上皮分化は cytokeratin18(CK-18)の発現により評価した。I型コラーゲンを最終濃度 1%になるように調製し、厚さ 100 $\mu$ m, 1900 $\mu$ m の collagen gel を作成した。作成したゲルを PBS で洗浄し、1500cells/cm<sup>2</sup>で播種した。7日間培養後、免疫蛍光染色により Cytokeratin18(CK-18)を観察した。

## 2-2 1%collagen gel 上培養 hMSC の F-actin 染色

2-1 と同様に、厚さ 100 $\mu$ m, 1900 $\mu$ m の 1%collagen gel を作成した。ゲル上に 1500cells/cm<sup>2</sup>で播種した。7日間培養後、免疫蛍光染色により F-actin を観察した。染色には Rhodamine-Phalloidin,を用いた。

## 2-3 AFM による collagen gel の物性測定

gel 表面の物性は、AFM(Atomic Force Microscope; 原子間力顕微鏡)の Contact Mode を用いて測定した。collagen 濃度

0.3%, 1% の collagen 溶液を準備し、100 $\mu$ m, 1900 $\mu$ m の厚さになるように collagen gel を作成した。作成した collagen gel のフォースカーブを AFM により求めた。

## 3. 結果

## 3-1 1% collagen gel 上培養 hMSC の CK-18 染色

1%collagen gel 上で培養した hMSC の CK-18 の発現を観察した。100 $\mu$ m collagen gel においては 0.3% の場合 (Fig.1A.a)とは異なり CK-18 の発現が見られた (Fig.1A.b)。また、1900 $\mu$ m collagen gel では 0.3% の場合 (Fig.1A.d)と同様に CK-18 が発現した (Fig.1A.e)。Fig.1B では、それぞれの gel 上で CK-18 を発現していた細胞の割合を示した。elastin gel 上での CK-18 の発現は以前に報告している(1) (Fig.1A.c, A.f, 1B)。

Fig.1A

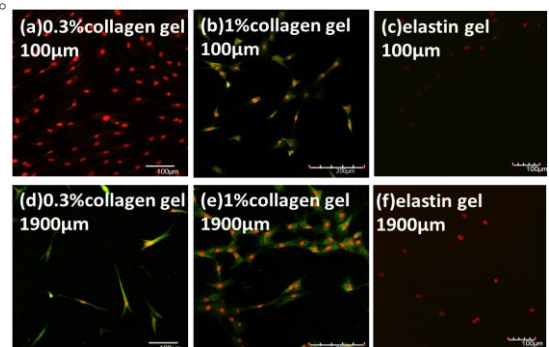


Fig.1B

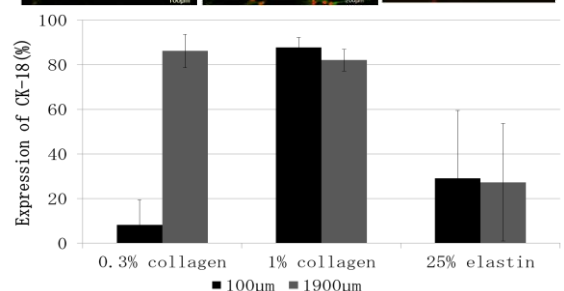


Fig.1 The expression of CK-18 on collagen or elastin gel

### 3-2 1%collagen gel 上培養 hMSC の F-actin 染色

1%collagen gel 上で培養した hMSC の F-actin の発現を観察した。0.3%100 $\mu$ m collagen gel の場合(Fig.2.a)は F-actin が繊維状に強く発現しているのに比べて、その他の collagen gel の場合(Fig.2.b, d, e)は F-actin の発現が弱く、actin 繊維も少ない事が観察された。elastin gel 上での F-actin の発現は以前に報告している(1) (Fig.2.c, f)

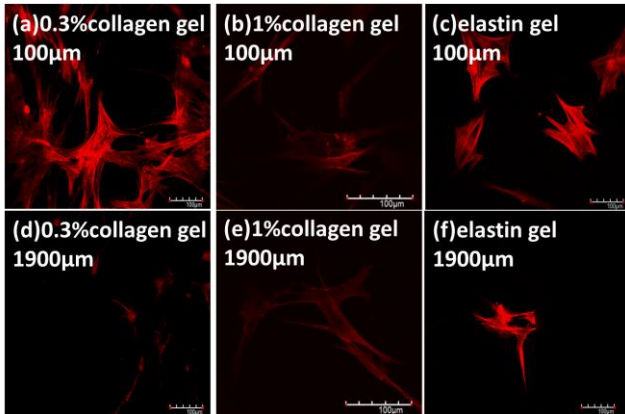


Fig.2 The expression of F-actin on collagen or elastin gel

### 3-3 AFM による collagen gel の物性測定

AFM を用いて 0.3%, 1% の 100 $\mu$ m, 1900 $\mu$ m collagen gel のフォースカーブを測定した。Fig.3 に得られたフォースカーブを示した。フォースカーブはそれぞれのカンチレバーの変位の大きさを表している。100 $\mu$ m, 1900 $\mu$ m collagen gel 共に、1%の方が 0.3%に比べて変位が大きい事が示された。また、それぞれの濃度の collagen gel においては 100 $\mu$ m collagen gel の方が 1900 $\mu$ m collagen gel に比べて変位が大きい事が示された。

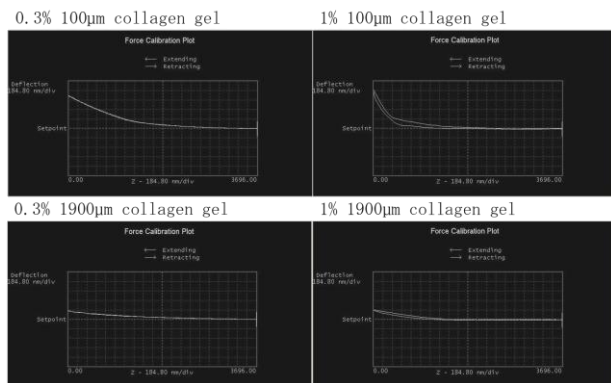


Fig.3 Physical property of collagen gel

## 4. 考察

本研究では以前用いた elastin gel と同様の弾性率を有する 1%collagen gel を用いた。1%collagen gel(1900 $\mu$ m)においては 0.3%collagen gel(1900 $\mu$ m)と同様に CK-18 の発現が確認された。一方、以前行った 25%elastin gel 上での実験では上皮分化は確認されていない。これは、elastin と collagen への hMSC の結合様式の違いによるものと考えられる。細胞の I 型 collagen への結合は  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 11\beta 1$  integrin 等を介する事が報告されている。elastin では EBP(elastin binding protein)等により結合する。これらの結合様式の違いが異なる細胞内シグナルを伝達経路を介し hMSC の上皮分化を制御したと考えられる。

0.3%collagen gel(100 $\mu$ m)では発現が認められなかった CK-18 は 1%や 0.3%の 1900 $\mu$ m collagen gel と同様の発現が

認められた。この事から、collagen gel 上の上皮分化においては足場の厚さのみに依存する訳では無いという事も明らかとなった。しかし、0.3%, 1%の 1900 $\mu$ m collagen gel の両方で CK-18 が発現している事から足場の硬さのみに依存する訳でも無いと考えられる。1%collagen gel(100 $\mu$ m)において CK-18 が発現する機序としては次の事が考えられる。1%collagen gel 上では厚さ依存性が無くなるという事である。1%は 0.3%に比べて collagen へのインテグリン結合量が増える事が考えられる。1%の様にインテグリン結合量が多い場合は厚さに関係なく上皮分化を誘導し、0.3%の様なインテグリン結合量が少ない場合は厚さに依存して上皮分化を誘導する事が考えられる。

0.3%collagen gel や elastin gel で得られた、actin の脱重合が誘導された際に CK-18 の発現が誘導されるという結果と 1%collagen gel 上での F-actin の形成結果が一致した。この事からも、actin の脱重合と上皮分化が密接に関連している事が示唆される。ここで、硬い足場では F-actin の形成が促進される事が知られている<sup>(2)</sup>。しかし、本研究において、より硬い足場である 1%collagen gel(100 $\mu$ m)において F-actin の形成が誘導されなかったという事は、100 $\mu$ m collagen gel において硬さによる影響ではなく、インテグリン結合量の違いによりアクチンの重合が抑制され上皮分化が誘導されたと考えられる。一方、0.3%collagen gel においては厚さに依存してアクチンの重合が異なり CK-18 の発現に差が生じたと考えられる。

最後にゲルの物性について考察する。厚さによるフォースカーブの傾きの違いが大きく見られたが、collagen 濃度によるフォースカーブの傾きの違いはほとんど見られなかった。この傾きを細胞がゲルから受ける力の大きさと見なすと、1900 $\mu$ m collagen gel では 100 $\mu$ m collagen gel に比べてゲルから受ける力は小さく、実際に細胞も丸い形態をしている。collagen 濃度によるフォースカーブの傾きの違いが見られなかったのは細胞がほとんど硬さの違いに影響を受けていないと考えられる。この事からも、1% collagen gel において 100 $\mu$ m collagen gel と 1900 $\mu$ m collagen gel で CK-18 の発現に影響しなかったのはインテグリンの結合量の違いによるものだと考えられた。

## 5. まとめ

細胞の受ける力と結合様式により actin の脱重合が制御され上皮分化が誘導されたと考えられる。

## 参考文献

- (1) 中町信敏：ゲルの厚さによる間葉系幹細胞の上皮分化への影響。平成 25 年度 三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文 2014
- (2) Rowlands AS, George PA, Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation, Am J Physiol Cell Physiol, vol. 295, no.4, pp.1037-44, 2008