

ヒト間葉系幹細胞の上皮分化における細胞骨格とインテグリンへの影響

The effect of cytoskeleton and integrin on the epithelial differentiation of human mesenchymal stem cells

○ 久保田捷 (三重大) 水田裕磨 (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)

Sho Kubota, Mie University Yuma Mizuta, Mie University Seiya Mizoguchi, Mie University

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

Abstract: Integrin provides the primary link between human mesenchymal stem cell (hMSC) and their surrounding extracellular matrix (ECM). In our study, we investigated the effect of integrin exert Cytokeratin-18 (CK-18) and actin depolymerization on thick collagen gel. We cultured hMSC on 0.3% collagen gel (100 μ m or 1900 μ m in thickness) and assessed commitment to epithelial lineage. It was previously reported that hMSC cultured on 1900 μ m gel expressed CK-18 accompanied with actin depolymerization while on 100 μ m gel expression of CK-18 was diminished accompanied with actin polymerization and decreased expression of α 1, α 11, β 1 integrins. Blocking of α 1, β 1 integrin increased CK-18 expression facilitated actin depolymerization on 100 μ m gel. From these results, we suggested that integrin involved in epithelial differentiation of hMSC.

Key Words: hMSC, epithelial differentiation, collagen gel, thickness, cytokeatin-18

1. 緒言

細胞足場として利用される細胞外マトリックス(ECM)の違いによりヒト間葉系幹細胞(hMSC:human Mesenchymal Stem Cell)の分化が制御可能であることが報告されている⁽¹⁾。本研究では、細胞足場として0.3% Type I collagen gelを使用し、足場の厚さによって上皮細胞への分化制御が可能であることを明らかにした(Fig. 1)⁽²⁾。また、弾性率の等しい collagen gel と elastin gel 上では hMSC の上皮分化に有意な差が出る事も明らかにした⁽³⁾。collagen gel 足場の厚さにより上皮分化に差が出ることから、本研究では integrin の発現と細胞骨格タンパクである actin の polymerization に着目し、hMSC の上皮分化と integrin の関連性を調査した。

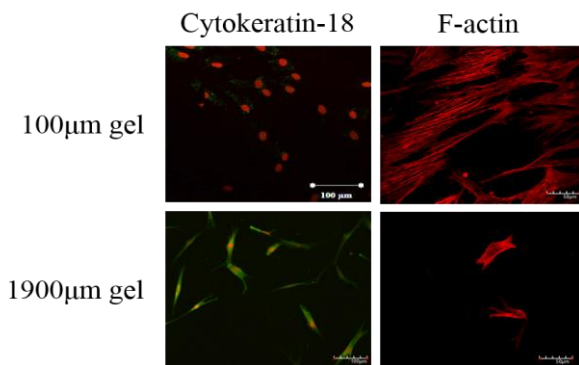


Fig.1 Expression of CK-18 and F-actin on collagen gel.

2. 方法

2-1 hMSC の integrin 発現

Type I collagen を最終濃度 0.3%になるように調製し、厚さ 100 μ m, 1900 μ m の collagen gel を作製した。1500cells/cm²で hMSC を播種した。1日間培養後、collagen との結合に関与する α 1, α 2, α 11, β 1 integrin の発現量を real-time PCR により測定した。

2-2 integrin 阻害試験

細胞懸濁液を DMEM で作製し、integrin 阻害剤(α 1, α 2, α 11, β 1 inhibitor)を最終濃度 10 μ g/ml で加え、90 分間プレインキュベートした。その後、厚さ 100 μ m, 1900 μ m gel 上に hMSC を 1500cells/cm² で播種した。1 日間培養後、免疫蛍光染色により CK-18 と F-actin を観察した。

2-3 アルギン酸ゲルへの RGD ペプチド修飾

1% アルギン酸ナトリウム溶液を作製し、N-Hydroxysuccinimide(NHS),1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDC)を使ってアルギン酸ナトリウムの COOH 基に GRGDS ペプチドを修飾した。未反応物を透析で取り除き、2% RGD 修飾アルギン酸溶液を作製し、100mM CaCl₂ 溶液を添加しゲル化させた。

3. 結果

3-1 integrin 発現

100 μ m, 1900 μ m gel 上で培養した hMSC の integrin mRNA の発現を測定した。 α 1, α 11, β 1 integrin mRNA の発現において有意な低下が示された。一方、 α 2 integrin mRNA の発現においては有意な差は得られなかった(Fig.2)。

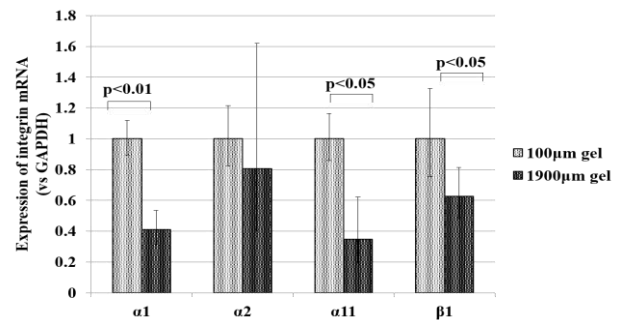


Fig.2 Expression of integrin mRNA on collagen gel.

3-2 integrin 阻害による CK-18, F-actin 発現への影響

3-1 の結果より、integrin を阻害した際の CK-18, F-actin の発現への影響を調査した。100 μ m collagen gel においては、 $\alpha 2$, $\alpha 11$ integrin 阻害剤を用いた際には CK-18 の発現に大きな影響は与えなかったが、 $\alpha 1$, $\beta 1$ integrin 阻害剤を用いた際には CK-18 の発現が増加した。また、 $\beta 1$ integrin 阻害剤は actin の脱重合を誘導したが、 $\alpha 1$ integrin 阻害剤では actin の脱重合が不十分であり、 $\alpha 2$, $\alpha 11$ integrin 阻害剤では actin の重合が見られた。1900 μ m collagen gel においても、 $\beta 1$ integrin 阻害剤を用いた際に CK-18 の発現が増加した(Fig.3)。

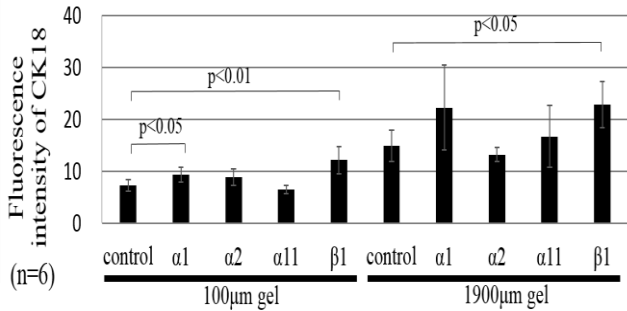


Fig.3 Fluorescence intensity analysis of CK-18 with integrin blocking.

3-3 アルギン酸ゲルへの RGD ペプチド修飾確認

NMR を用いてアルギン酸ナトリウムに GRGDS ペプチドが修飾出来ているか否か確認し、アルギン酸ナトリウム単体の測定では見られなかったピークが現れたことから(波線部)、GRGDS ペプチドが修飾出来ていることが確認できた(Fig.4)。

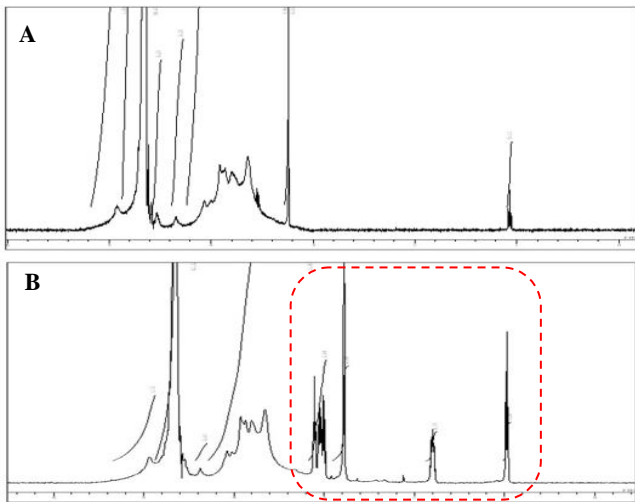


Fig.4 NMR of (A) Sodium Alginate and (B) GRGDS modified Sodium Alginate.

4. 考察

collagen gel の厚さにより CK-18 と F-actin 形成に違いが見られたことは以前報告した²⁾。F-actin 形成の違いから、collagen gel への hMSC の接着に違いがあると考えられる。collagen gel と hMSC 間の接着は $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$ integrin が担っており、これらの integrin が CK-18 や actin の重合に与える影響を検討した。1900 μ m gel は 100 μ m gel と比較して、 $\alpha 1$, $\alpha 11$, $\beta 1$ integrin mRNA の発現が減少した。integrin

は ECM との結合により接着斑を形成し、その細胞内の接着斑同士に actin が橋渡しされる。このことから、collagen gel と hMSC の $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$ integrin の結合が減少し、actin の脱重合と CK-18 の発現を誘導したと考えている(Fig.5)。

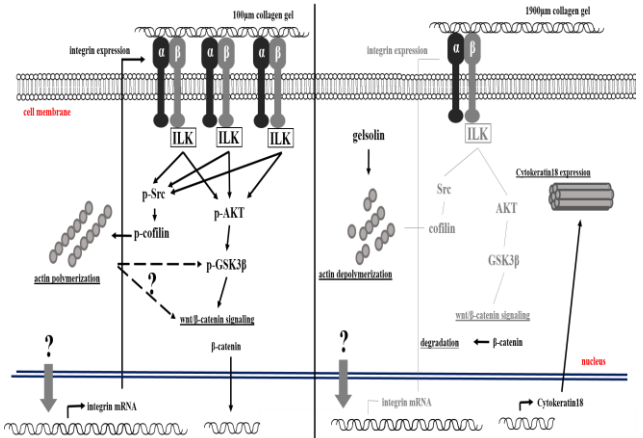


Fig.5 Signaling of the collagen gel thickness to epithelial differentiation.

integrin の阻害に関しては、 $\beta 1$ integrin を阻害した際 actin の脱重合が誘導されたことから、 $\beta 1$ integrin が actin の重合・脱重合に寄与していると考えられる。また、 $\alpha 1$, $\beta 1$ integrin を阻害した際 CK-18 の発現が増加したことから、 $\alpha 1\beta 1$ integrin あるいは $\alpha 1$ integrin が CK-18 発現に関与していると考えられる。(Fig.5)

アルギン酸ナトリウムへの RGD ペプチド修飾は、ゲルの弾性率と厚み、integrin の種類を変えることで本研究結果を基に、さらに hMSC のマトリックス上での分化メカニズムを探索する目的で試作を進めている。COOH 基をもつ人工的な足場を作製し、細胞が接着出来るリガンドを調節する事が可能となれば、integrin が CK-18 の発現や actin の重合・脱重合にどのように関与するのかを解明する手助けとなり得ると考えられる。

5. 結論

collagen gel の厚さによって integrin の発現量が調節され、1900 μ m では actin の重合を抑制し、CK-18 が発現することで上皮分化が誘導されたと考えている。しかし、ゲルの厚さがどのように integrin の発現を調節しているのかは不明であるため、これは今後の課題であると考えている。

参考文献

- (1) Santiago JA, et al., Heterogeneous differentiation of human mesenchymal stem cells in response to extended culture in extracellular matrices. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(12): 3911-22.
- (2) 水田裕磨:間葉系幹細胞の上皮分化メカニズムの解明. 平成 26 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 2015
- (3) 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