トピックス

間葉系幹細胞の分化制御を目指した培養基板の設計

山崎雅史¹, 木戸秋悟², 藤江裕道¹, 三好洋美¹

¹東京都市大学システムデザイン研究科機械システム工学域

²九州大学先端物質化学研究所医用生物物理化学分野

1. はじめに

機能的な細胞・組織・器官を生体外で再構成する技術は、再生医療において疾病を根本から治療する原因療法の基礎を支える要素技術である。間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell; MSC) は、骨格筋や骨、脂肪などの間葉組織を構成する細胞の他、血管内皮細胞や神経細胞など多様な細胞に特殊化、機能化する分化能を有するため、再生医療における有力な細胞供給源として期待されている。しかしながら、MSC の細胞集団において、分化能をはじめとした治療有効性と深く関わる性質にばらつきがあることが MSC を理解し医療の現場で役立てるアプローチの課題となっている。

MSC の性質はドナーや由来組織により異なり、さらにこれらの先天的な要因の他、培養条件や継代数によっても容易に変化する。本稿では、MSC の不均一性をもたらす要因のうち培養条件、特に培養基板の剛性に焦点を当て、基板剛性に対する MSC の応答特性についてのこれまでの報告を紹介するとともに、MSC の分化制御を目指した取り組みについてわたしたちが得た知見を交えて解説する。

2. 培養基板の剛性に応じた MSC の分化運命決定

2006 年 Engler と Disher らによって、MSC は培養基板の剛性に応じて鋭敏に分化の方向を変化させることが報告された¹⁾。MSC は、ヤング率を 0.1-1 kPa に設定した基板上では神経細胞、8-17 kPa では筋芽細胞、25 kPa を超える高剛性基板上では骨芽細胞への分化が誘起される (図 1)。細胞培養に標準的に用いられるポリスチレン容器は、ヤング率数 GPa の高剛性基板である。ポリスチレン容器を用いて培養された MSC は、たとえ分化誘導因子を含まない増殖用の培養液中でも骨芽細胞へと分化偏向する。この分化偏向は、高

剛性基板での培養において数日以内に基板の剛性を低下させると解除されるが、高剛性基板上で 10 日間以上を経ると分化偏向は不可逆になる²⁾。この厄介な特性が先天的な性質のばらつきとあいまって、基礎研究から臨床応用まであらゆるフェーズにおいて、MSC の幹細胞としての質を管理し再現性のある結果を得ることへの極めて難易度の高いハードルとなっている。

3. 培養基板の剛性に対する MSC 細胞集団の応答のばらつき

高剛性基板における MSC の骨芽細胞への分化偏向のシグナル伝達に関与する分子として、力学-化学シグナル変換分子として知られる yes-associated protein (YAP)、及び、骨芽細胞分化のマスター転写因子である RUNX2 が注目されている²⁾。ヤング率が数 kPa 程度と極めて柔らかいゲル上で培養された MSC では YAP 及び RUNX2 は核局在を示さない。一方、高剛性基板上の MSC では YAP、RUNX2 とともに核内に局在する。弾性率に依存した YAP 及び RUNX2 の局在調節については複数の

図 1
基板ヤング率に応じた MSC の分化の方向の変化。写真は文献³より引用。

Designing Culture Substrate for Controlling Mesenchymal Stem Cell Differentiation

Masashi YAMAZAKI¹, Satoru KIDOAKI², Hiromichi FUJIE¹ and Hiromi MIYOSHI¹

¹Department of Mechanical Systems Engineering, Graduate School of Systems Design, Tokyo Metropolitan University

²Laboratory of Biomedical and Biophysical Chemistry, Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University

報告があるが、RUNX2の核-細胞質間の局在が切り替わるヤング率の閾値は、数 kPa²⁾-10 kPa⁴⁾ まで研究グループ毎に見解が異なる。

わたしたちは基板のヤング率に応答した RUNX2 の局在調節のばらつきの要因を明らかにしたいと考え、基板ヤング率と核-細胞質間の局在との関係を分化効率の異なる MSC 細胞集団において系統的に解析した (図 2)⁵⁾。YAP が核内局在を示す細胞の割合は、10 kPa 未満の低域においてはヤング率と正の線形関係を示し、10 kPa でおよそ 90% に達して飽和した (図 2B)。低ヤング率における YAP 核内局在細胞の増加傾向は、細胞集団によらず同一の線形モデルで近似された。RUNX2 についても、低ヤング率において核内局在を示す細胞の割合は正の線形関係を示し、ヤング率の上昇に伴い 80-90% に達し飽和するという YAP と類似した傾向が認められた (図 2C)。しかしながら定量的には、RUNX2 の核局在化傾向は YAP よりも強く、核内局在細胞の割合が最大に達するヤング率は 5 kPa と、YAP の 10 kPa よりも小さい。また、RUNX2 ではヤング率に比例した核内局在細胞の増加は細胞集団毎に固有の近似直線が存在した。

RUNX2 のヤング率に対する応答特性の MSC 細胞集団間の違いは何に起因するのか。Runx2 遺伝子の発現は YAP により促進される²⁾。YAP の核内局在につい

ては細胞集団に関わらず同一であることから、RUNX2 の応答のばらつきの要因は、YAP による転写調節の下流に位置する RUNX2 の核-細胞質局在調節の過程に求められそうである。わたしたちはまず、アクチンが要因となる可能性を検証した。アクチン線維の発達は基板の剛性と正の相関があることが MSC を含む多くの細胞で報告されている⁶⁾。高剛性基板上で培養した細胞では、アクチン線維が発達し YAP 及び RUNX2 が核局在を示す。この細胞に対して試薬処理を行いアクチン線維の発達を抑制し、YAP 及び RUNX2 の局在変化を検証した⁷⁾。アクチン線維の発達抑制により YAP 及び RUNX2 の核局在が阻害されることを想定したが、結果は予想に反するものであった。YAP の核局在は阻害されたにも関わらず (図 3A)、RUNX2 の核局在は維持された (図 3B)。

次に RUNX2 の核-細胞質局在の調節にクロマチン凝集状態が関与する可能性を検証した。RUNX2 の核局在が抑制される低ヤング率基板上での培養は MSC にクロマチン脱凝集を誘起する⁸⁾。他方、試薬処理によるアクチン線維の発達抑制では RUNX2 の核局在が維持され、かつ核の収縮が観察された⁷⁾。試薬処理によりクロマチンを脱凝集させると、YAP は核内に保持された (図 3A) が、RUNX2 は核から細胞質へと拡散した (図 3B)。RUNX2 が核マトリックスに対する結合配列を有する⁹⁾ ことから、クロマチン凝集状態に応じた核マトリックス構造の変化が RUNX2 の核局在化に影響している可能性が考えられる。MSC 細胞集団毎の分化効率のばらつきの一因は、集団固有の RUNX2 局在応答特性であり、RUNX2 の応答特性は

図 2 基板ヤング率に対する YAP 及び RUNX2 の応答特性。骨芽細胞及び脂肪細胞への分化効率の異なる 3 種の MSC 細胞集団 (A) の応答特性は、YAP は同一であった (B) のに対し、RUNX2 は細胞集団毎に固有であった。文献 5 より引用・改変。

図 3 アクチン脱重合 (Latrunculin B, LatB), ミオシン活性阻害 (Y27632, Y27), クロマチン脱凝集 (Trichostatin A, TSA; 酪酸ナトリウム, NaB) が YAP (A), RUNX2 (B) の局在に及ぼす影響。文献 7 より引用・改変。

クロマチンや核マトリックスの細胞集団毎の相違を反映しているのかもしれない。

4. MSCの分化制御のための培養基板の設計

YAP 及び RUNX2 は MSC の骨芽細胞への分化運命決定とその不可逆性の理解の鍵を握るシグナル分子である。これらのシグナル分子の核局在の外的制御は、骨芽細胞への分化効率の向上のみならず、MSC の骨芽細胞への分化偏向の抑制、解除による幹細胞性の担保にも重要である。低ヤング率の基板は YAP, RUNX2 いずれの核局在の抑制にも効果的である。しかしながら、YAP と比較すると RUNX2 は基板のヤング率を低下させても核内に頑強に保持される傾向があり、ヤング率に対する応答特性が細胞集団毎に異なる。わたしたちの系統的な解析から、MSC の骨芽細胞への分化偏向を抑制する基板のヤング率設計にあたっては、応答の柔軟性に欠け、かつ細胞集団に固有の応答特性を示す RUNX2 の制御にフォーカスすることが重要であると考えられる。ある細胞集団の分化偏向を抑制する基板のヤング率の設計及び期待値は、ヤング率 5 kPa 未満の基板上で MSC 細胞集団を培養する予備的評価により、RUNX2 核内局在率が線形増加を示すことを踏まえて予測することができる。

脂肪細胞や神経細胞への運命決定は骨芽細胞への運命決定に競合することが知られている。また、低ヤング率基板での培養による MSC の増殖率は極めて低い¹⁰⁾。MSC の質の管理をより確実なものにするためには、低ヤング率基板による骨芽細胞以外の細胞系列への分化偏向や増殖性低下にも着目して MSC 細胞集団の応答特性の理解を深める必要がある。

5. おわりに

本稿では、力学-化学シグナル変換分子 YAP、及び、骨芽細胞分化マスター転写因子 RUNX2 の基板ヤング率に対する MSC 細胞集団の応答特性についての知見に基づく、MSC の分化制御基板の設計について解説した。ばらつきのある MSC 細胞集団の分化制御には、ばらつきが回避され正確な情報伝達となされる人工システムの制御とは異なるアプローチが必要であろう。MSC 細胞集団を制御する基板の設計指針を得るため、細胞応答のばらつきの要因と生物学的意味について理解を深め、ばらつきを避けるのではなく向き合うアプローチを探っていききたい。

文 献

- Engler, A. J. *et al.* (2006) *Cell* **126**, 677-689. DOI: 10.1016/

j.cell.2006.06.044.

- Yang, C. *et al.* (2014) *Nat. Mater.* **13**, 645-652. DOI: 10.1038/Nmat3889.
- 山崎雅史ら (2020) 電子学会論文誌 C **140**, 432-436. DOI: 10.1541/ieejciss.140.432.
- Lee, J. *et al.* (2014) *J. Mech. Behav. Biomed.* **38**, 209-218. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2014.01.009.
- Yamazaki, M. *et al.* (2021) *Anal. Sci.* **37**, 447-453. DOI: 10.2116/analsci.20SCP02.
- Cho, S. *et al.* (2017) *J. Cell Biol.* **216**, 305-315. DOI: 10.1083/jcb.201610042.
- Yamazaki, M. *et al.* (2020) *J. Biomech. Sci. Eng.* **15**, 20-00083. DOI: 10.1299/jbse.20-00083.
- Gerardo, H. *et al.* (2019) *Sci. Rep.* **9**, DOI: 10.1038/s41598-019-45352-3.
- Zaidi, S. K. *et al.* (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 3093-3102. DOI: 10.1242/jcs.114.17.3093.
- Winer, J. P. *et al.* (2009) *Tissue Eng. Pt. A* **15**, 147-154. DOI: 10.1089/ten.tea.2007.0388.

山崎雅史

山崎雅史 (やまざき まさし)

東京都立大学システムデザイン研究科博士後期課程修了。博士 (工学)。
研究内容: 幹細胞の分化メカニズム

木戸秋悟

木戸秋悟 (きどあき さとる)

九州大学先端物質化学研究所医用生物物理化学分野教授
名古屋大学人間情報学研究科博士課程修了。国立循環器病センター研究所流動研究員、京都大学理学部 JST-CREST 研究員、九州大学医学研究院助教授を経て 2006 年 10 月より現職。
研究内容: 生命システムの階層間クロストークダイナミクスの理解と制御

連絡先: 〒 819-0395 福岡市西区元岡 744

E-mail: kidoaki@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

URL: <http://biomed.biophys.cm.kyushu-u.ac.jp/>

藤江裕道

藤江裕道 (ふじえ ひろみち)

東京都立大学システムデザイン研究科教授
東京工業大学総合理工学研究科博士前期課程修了、京都大学論文博士、北里大学、大阪大学などを経て現職。

研究内容: 関節のバイオメカニクス、バイオトライボロジー、組織再生工学

連絡先: 〒 192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1

E-mail: fujie@tmu.ac.jp

URL: <http://www.comp.sd.tmu.ac.jp/fujielab/>

三好洋美

三好洋美 (みよし ひろみ)

東京都立大学システムデザイン研究科准教授
東京工業大学生命理工学研究科博士後期課程修了。博士 (工学)。NEDO フェロー、理化学研究所研究員を経て 2017 年より現職。

研究内容: 細胞のメカノバイオロジー

連絡先: 同上

E-mail: hiromi-miyoshi@tmu.ac.jp

URL: <https://www.comp.sd.tmu.ac.jp/appliedmechanobio/>