間葉系幹細胞の分化制御技術の開発

Development of a method to differentiate mesenchymal stem cells using extracellular matrices(ECM)

○那須 章仁, 竹林 貴史, 水本 健, 山崎 慎也, 宮本 啓一, 堀内 孝

三重大学大学院 工学研究科 分子素材工学専攻 生体材料化学研究室

○Akihito Nasu, Takafumi Takebayashi, Takeshi Mizumoto, Shinya Yamazaki, Keiichi Miyamoto,

Takashi Horiuchi

Dept. of Chemistry for Materials, Fac. of Eng., Mie University

【はじめに】

体性幹細胞のひとつである間葉系幹細胞(MSC)は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。我々の目指す最終目標は生物学的因子、化学的因子、物理的因子の3つを併用し、MSCの分化制御を行うことであるが、本研究ではその第1段階として生物学的因子のMSCへの影響の評価を目的とした。そこで代表的な細胞外マトリックス(ECM)である elastin と I 型 collagen に注目し、MSC に与える文化への影響を調べた。

【方法】

(1) MSC と分化した骨芽細胞、軟骨細胞、前駆脂肪細胞の表現系の形質を調べた。具体的には、CD29、CD44 表面抗原の発現(Flow Cytometry)、分化転写因子(Runx2、Sox9、PPAR γ 2)の定量(RT-PCR)、産生物質の測定(組織染色)を行った。

(2) ECM 上の MSC の継代培養に伴う表面抗原発現の変化を、CD29、CD44 抗体を用いてフローサイトメトリーで測定した。また形質維持への ECM の影響を評価するため、ECM(I 型 collagen、elastin)被覆シャーレ上で継代培養したものと比較した。

(3) MSC の継代に伴う分化能の維持を評価するため、1 μ M dexamethasone、0.2mM indomethacin、0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine、1 μ g/ml insulin で脂肪分化誘導させ、PPAR γ 2、Runx2 mRNA の発現を RT-PCR で測定した。又、脂肪滴の産生を肉眼的に観察し、14 日目に脂肪滴を Oil red O で染色した。

【結果・考察】

(1) MSC の表面抗原である CD29、CD44 は骨芽細胞、軟骨細胞においても発現が確認されたが、特に軟骨細胞における CD44 の発現量は、MSC に比べ約 17 倍高いことがわかった(Fig.1)。

Fig.1 expression pattern of surface antigen in mesenchymal cells

転写因子は骨芽細胞で Runx2、軟骨細胞で Sox9、脂肪細胞で PPAR γ 2 が強発現していることがわかった(Fig.2)。

Fig.2 expression pattern of transcription factors in mesenchymal cells

骨芽細胞で Alkaline phosphatase 染色、脂肪細胞において Oil red O 染色を行い、各細胞で特異的タンパクと脂肪滴が産生されていることを認めた。

(2) MSC を 7 代目まで継代培養した結果、表面抗原である CD29 と CD44 の発現量は大きく変化しないことがわかった。また、elastin、I 型 collagen 被覆シャーレ上で増殖した MSC においても非被覆シャーレに比べ変化しないことがわかった。

(3) 継代 1 代目の MSC を脂肪分化誘導すると、誘導 14 日目に PPAR γ 2 の発現量は 6 倍に増加し、Runx2 は変化が見られなかった。

誘導 4 日目から細胞質内に脂肪滴の産生が見られ、誘導日数とともにその細胞数は増加した(Fig.3)。この傾向は、ECM 上で継代した細胞においても同様であった。これより、継代 1 代目の細胞は、脂肪細胞への分化能を被覆、非被覆に関わらず同様に有していると考えられる。継代 3 代目では、elastin、I 型 collagen 上で継代した細胞に比べ、非被覆シャーレ上の細胞は脂肪滴の産生が 6 日目に降抑制されていた。これより、非被覆シャーレ上で継代し減少した分化能が、ECM 被覆上では維持されることが示唆された。

Fig.3 Change of the ratio of adipocytes with culture (upper: P=1, lower: P=3)

【結論】

以上の結果から、MSC を脂肪分化誘導することで脂肪分化のマーカーである PPAR γ 2 mRNA を強発現し、脂肪滴を産生した。また継代により MSC の表現型は維持されていたが、脂肪への分化能の低下が見られた。しかし ECM 上では分化能の低下が無かったので、表現形に加え、分化能も維持されることが示唆された。