

旋回培養法によるヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の分化制御

The rotating culture system regulates the osteogenic fate of human bone mesenchymal stem cells

○山崎 慎也, 竹林 貴史, 大友佳子, 堀井 貴司, 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

○ Shinya Yamazaki, Takafumi Takebayashi, Keiko Otomo, Takashi Horii, Hiromi Denno,
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。MSC の培養は、骨分化の指標にもされる Alp の発現を高め未分化維持できないことが明らかとなっている。我々の目指す最終目標は生物的因子、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段階として物理的因子、特に重力の影響の評価を目的とし、二軸旋回装置にて細胞に掛かる重力を分散しながら培養を行い、その間の MSC に与える骨分化への影響を調べた。

【方法】

(1)hMSC の形質を確認するため、MSC 上の表面抗原 (CD14、CD34、CD45、CD29、CD44) を Flow Cytometry にて、分化転写因子 (Runx2、PPAR γ 2、Sox9) を RT-PCR 法にて観察し、その各分化先である間葉系細胞(骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞)との比較を行った。

(2)ウェルプレートに播種した hMSC を 50ml チューブに挿入後、二軸旋回装置(Fig.1 参照。shaft1, shaft2 ともに 10rpm の等速回転で操作)上に接続し、7日間培養した。

骨分化への影響の確認として Alp の発現量を RT-PCR 法により観察した (RT-PCR 法)。また、二軸旋回培養時における細胞活性の確認として MTT-assay を行った。

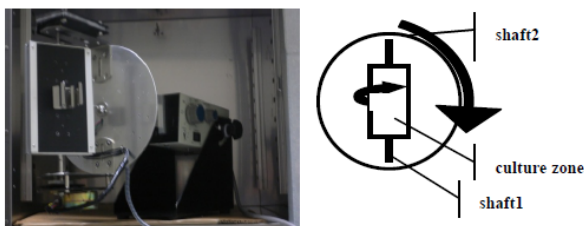


Fig.1 two axial rotation device

【結果】

(1)hMSC の形質状態。Flow cytometry より、CD14、CD34、CD45 が陰性、CD44、CD29 が陽性であることが確認され、これは、既報の MSC の定義¹⁾を満足するものであった。また、Runx2、PPAR γ 2、Sox9 の発現が、hMSC と各間葉系細胞に見られた。

(2)二軸旋回培養による分化能への影響。RT-PCR 法の結果。静置に hMSC の培養を行うと、骨分化マーカーである Alp の発現が上昇することを確認した。また、旋回時には Alp の発現が抑制されており、その後静置場にて hMSC の培養

を行うと、再び Alp の発現の上昇が見られた(Fig.3)。このことから、物理的因子と骨分化促進の関係性が見出せた。MTT-assay の測定の結果、7日間二軸旋回培養をおこなっても細胞活性への統計学的な影響は確認されなかった。

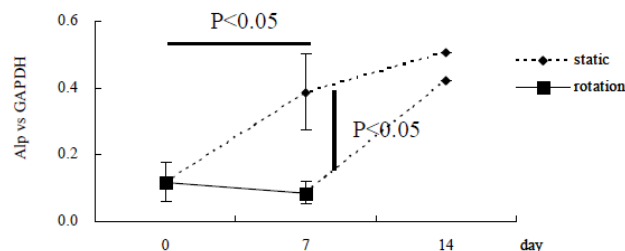


Fig.2 Effect of two axial rotation on Alp mRNA expression of hMSC

【考察】

本研究では、hMSC を培養することで Alp の発現が確認された。hMSC において骨、軟骨、脂肪細胞への分化転写因子が観察されたこと、間葉系細胞においても、異なる分化先の転写因子が発現を示しているところから分化先の決定は複雑に絡み合っていて決定されていることが分かる。以上を踏まえ、hMSC を静置にて培養することは、骨芽細胞様への形質変換が起こりやすい状態になっていると考察した。また、旋回培養を行うと、その骨芽細胞様への形質変換が抑制されていることから、骨分化への機序に対して抑制的な効果があることが分かった。細胞骨格の様態と骨分化が密接な関係性がある²⁾という報告から、hMSC を静置にて培養するとストレスファイバーの形成に伴って骨分化の促進、二軸旋回時にはストレスファイバーの崩壊に伴う骨分化の抑制が起こっている可能性がある。

【結論】

以上の結果から、hMSC に対して、旋回培養を7日間行うと、細胞活性に対して統計学的な影響を与えずに、Alp 発現が抑制されることが分かった。これは hMSC の骨芽細胞様への形質転換されていないことが分かった。

【参考文献】

- 1) Robert J. Deans. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol*(Copenhagen).2000; 28:875-884.
- 2) Yan Huang. Gravity, a regulation factor in the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical science*.2009;16:87