

論文内容要旨

Distinctive Biological Properties between Mesenchymal Stem Cell Spheroids and Clumps of Mesenchymal Stem Cells/Extracellular Matrix Complexes in 3D Culture Systems

(3次元培養システムにおける間葉系幹細胞
スフェロイドと間葉系幹細胞集塊との間の
識別的生物学的特性)

Applied Sciences,13, 12790, 2023.

主指導教員：水野 智仁 教授

(医系科学研究科 歯周病態学)

副指導教員：安達 伸生 教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員：谷本 幸太郎 教授

(医系科学研究科 歯科矯正学)

吉野 舞

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【背景・目的】

自己複製能、多分化能、及びパラクライン効果で知られる間葉系幹細胞 (MSCs) は、医学的に重要な関心を集めている。また、通常細胞は3次元 (3D) の環境内で機能し挙動することから、MSCs スフェロイド培養は、MSCs の生物学的特性を 3D 環境で研究するために広く採用されている。対照的に、我々は以前に、間葉系幹細胞とその細胞自身が産生した細胞外基質から構成される間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs)を開発した。スフェロイドと異なる作製法を用いる C-MSCs は、人工的足場無しに組織欠損部位へ移植することが可能であるという特性も有している。本研究の目的は、3D 培養システムにおける MSCs スフェロイドと C-MSCs の基本的な生物学的違いを明らかにすることである。

【材料と方法】

1. 細胞培養

ヒト骨髄由来 MSCs は DMEM、10%FBS、100 μ g/ml streptomycin、100U/ml penicillin にて構成された成長培地にて培養された。MSCs スフェロイドはハンギングドロップ法を採用した。成長培地に 50 μ g/ml の L-アスコルビン酸を添加した 20 μ l の懸濁培地中に細胞数 2.5 $\times 10^4$ 、5.0 $\times 10^4$ 、10.0 $\times 10^4$ 、20.0 $\times 10^4$ の密度で懸濁された。これらの細胞懸濁液はペトリディッシュの内蓋にハンギングドロップとして置かれ、48 時間インキュベートされた。細胞凝集後 96 ウェル低接着プレートに移され、さらに 48 時間培養された。その後細胞凝集体は成長培地で 5 日間維持され、MSCs スフェロイドを形成した。C-MSCs の作製法については、まず MSCs は 1 ウェルあたり細胞数 5.0 $\times 10^4$ 、10.0 $\times 10^4$ 、20.0 $\times 10^4$ の細胞密度で、それぞれ 96 ウェル、48 ウェル、24 ウェルプレートに播種された。これらの細胞は 50 μ g/ml の L-アスコルビン酸を添加した成長培地で 4 日間培養された。その後細胞外基質からなる細胞シートは、マイクロピペットを用いて鈍的に剥離、浮遊された。その後細胞シートは 48 ウェル低接着プレートに移され成長培地で維持され、5 日間の培養後成熟した円形の細胞集塊である C-MSCs が得られた。

2. 組織学および免疫蛍光解析

MSCs スフェロイド及び C-MSCs は 4%のparaホルムアルデヒドで固定され、8 μ m 厚のパラフィン切片が作製された。試料はヘマトキシリン・エオジン染色、TUNEL 染色後、顕微鏡で観察された。免疫蛍光染色では、固定された試料から凍結切片 (20 μ m 厚) が作製された。その後抗ヒト COL1 IgG、抗ヒト N-Cadherin IgG、Phalloidin によって免疫染色、DAPI を用いて対比染色が行われ、共焦点顕微鏡にて観察された。

3. RNA-Seq 解析及びリアルタイム PCR 解析

次の 3 つの異なる細胞培養グループから総 RNA を抽出した：それぞれ 24 ウェルプレート内に (1) 1 ウェルあたり細胞数 2.0 $\times 10^5$ で播種された 2D 培養 (n=3)、(2) それぞれが細胞数 2.5 $\times 10^4$ から構成された 8 つの MSCs スフェロイドのセット (n=3)、(3) 細胞数 2.0 $\times 10^5$ から形成される単一の C-MSCs (n=3)。抽出された RNA を用いてシーケンスが行われ、解析としてヒートマップ、ベン図、および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 解析が

行われた。また同条件の RNA を用いてリアルタイム PCR により RNA-seq の結果を検証した。

【結果】

1. MSCs スフェロイドは密でコンパクトな細胞凝集体であるのに対し、C-MSCs は細胞と細胞外基質で構成され、より大きなサイズの細胞集塊が作製できる。

肉眼所見では細胞数 2.5×10^4 , 5.0×10^4 , 10.0×10^4 で形成された MSCs スフェロイドは球状構造を持つが、細胞数 20.0×10^4 では不安定な構造が見られた。一方で、C-MSCs は異なる細胞数でも一貫して球状構造を形成した。両者ともに細胞数に依存してサイズが増加し、C-MSCs は MSCs スフェロイドよりも大きな直径を示した。組織学的に、MSCs スフェロイドは細胞密度が高く、今回の検証では細胞数 10.0×10^4 以上の大きなサイズでは内部構造が崩れ、アポトーシスが増加した。一方、C-MSCs は安定した球状構造で ECM 成分も観察され、細胞密度が低かった。以上のことから細胞数 2.5×10^4 の MSCs スフェロイド、 2.0×10^5 の C-MSCs が、各種の 3D 細胞構造が最も安定していることから、さらなる分析の対象とされた。この検証により、代表的な構造的特性を示す条件下での直接比較が可能となった。

2. MSCs スフェロイドは主に N-Cadherin によって媒介された細胞-細胞接触に依存しており、一方で C-MSCs は主に細胞外基質、COL1 によって形成されている。

免疫蛍光染色にて、MSCs スフェロイドは COL1 の発現が低いのに対し C-MSCs は COL1 の発現が豊富な上、F-アクチンファイバーを有していた。一方で、MSCs スフェロイドは N-Cadherin が強く広範に発現し、C-MSCs では弱く散在していた。

3. 3D 凝集体で培養された MSCs スフェロイドと C-MSCs の遺伝子発現パターンには差異が認められる。

トランスクリプトームシーケンシングにて MSCs スフェロイドと C-MSCs は 2D 対照群よりも免疫調節および細胞保護因子の発現が増加しており、C-MSCs がより顕著であることが示された。さらに、MSCs スフェロイドは主に「細胞接着」に関連する遺伝子が、C-MSCs は「サイトカイン伝達経路」に関連する遺伝子が豊富なことが GO 解析で示された。これらの結果は、MSCs スフェロイドと C-MSCs が異なる生物学的特性を持つことを示唆している。

【結論】

各細胞凝集体の異なる特性を認識することは、3D 細胞培養技術の進化の可能性や、各々の特性を活かした治療法の可能性について、洞察を与えるものとなった。