

共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：広島大学・医歯薬保健学研究院

職名：教授

氏名：加藤 功一

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：上皮間葉相互作用解析のためのマイクロパターン化培養基材の設計
2. 再生医科学研究所共同研究者：岩田 博夫 教授
3. 研究期間：短期研究課題・長期研究課題
(平成24年4月1日～平成25年3月31日)
4. 研究経過及び研究成果：

(1) 緒言

複雑な構造をもつ器官の発生機序を理解し、また、そのような器官を人工的に構築するには、上皮間葉相互作用に基づく器官原基発生の再現が重要であると考えられる。しかしながら、上皮および間葉の二種類の細胞を同一の基材上に播種して培養すると両者が混在した共培養系となり、細胞集団同士の相互作用を分析するのは容易ではない。そこで本研究では、京都大学再生医科学研究所・岩田博夫教授と共同して、上皮細胞と間葉細胞を両者のマイクロな相対位置を制御しながら共培養する手法の開発に取り組んだ。すなわち、基板材料の微細加工および細胞に親和性のある生体分子の部位特異的固定化によって培養基材を作製し、二種類の細胞を構成的に微細配置することを試みた。固定化生体分子として、細胞表面マーカーを特異的に認識する抗体、ならびに、インテグリンと結合する細胞外マトリックスに注目した。それらを部位特異的に固定化した表面を用いて、上皮細胞および間葉細胞を異なる部位に接着させることが可能であるかについて調べた。

(2) 実験

細胞：上皮細胞としてマウスの歯肉上皮細胞株 (GE1) を用い、間葉細胞としてマウス間葉系幹細胞株 (C3H10T1/2 clone 8) を用いた。

表面マーカー発現解析：我々が間葉系幹細胞分析用に開発してきた抗体アレイを用いて、GE1 細胞および C3H10T1/2 clone 8 細胞に発現する表面マーカーを分析した。解析には、CD11b、CD31、CD44、CD45、CD51、CD73、CD90、CD105、CD254 に対する抗体およびコントロールとして IgG が配列固定された抗体アレイを用いた。GE1 細胞および C3H10T1/2 clone 8 をトリプシン処理によって培養皿から回収した後、1 mg/mL γ グロブリンおよび 0.53 mM EDTA を含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) に分散させた。これらの細胞分散液をアレイ上に滴下し、37°C で静置した。30 min 後、細胞が結合したスポットを調べ、表面マーカー発現に関する情報を得た。

インテグリン発現解析：GE1 細胞および C3H10T1/2 clone 8 に発現するインテグリンについて RT-PCR 法により調べた。調査したインテグリンは、 α_1 、 α_2 、 α_3 、 α_5 、 α_6 、 α_7 、 α_v 、 β_1 、 β_3 、 β_4 、 β_6 の 11 種類である。内部標準にはハウスキーピング遺伝子である GAPDH を用いた。

固体固定基材の作製：二種類の抗体 (抗 CD73 抗体および抗 CD105 抗体) を **図 1** に示す方法でガラス基板の異なる部位に吸着させた。その基材上に GE1 細胞および C3H10T1/2 clone 8 細胞を播種して部位特異的な培養を試みた。また、二種類の抗体が部位特異的に吸着されることを調べるため、Alexa Fluor 488 あるいは phycoerythrin (PE) をコンジュゲートしたモデル抗体を上記と同様の方法で基材上に吸着させた。

細胞外マトリックス固定基材の作製：GE1 細胞および C3H10T1/2 clone 8 細胞に対して特異的に結合する細胞外マトリックスの組み合わせを選択するため、ラミニン-1、フィブロネクチン、I 型コラーゲン、ゼラチンを表面に固定したガラス基材をそれぞれ作製した。これらの基材上に GE1 細胞および C3H10T1/2 clone 8 細胞を播種し、細胞接着性について評価した。

さらに、円形の窓をもつシリコンシートを利用して、ラミニン-1 およびゼラチンを異なる領域に配置した基材を作製し、その基材上に GE1 細胞および C3H10T1/2 clone 8 細胞を播種して部位特異的な培養を試みた。

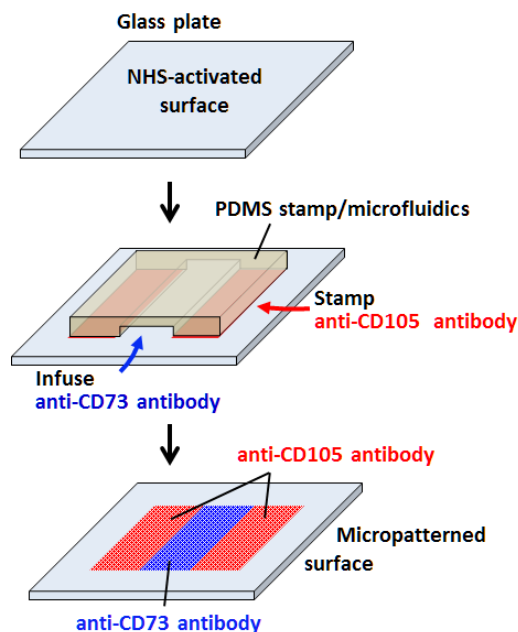


図 1. 抗体の部位特異的吸着の方法。

(3) 結果および考察

表面マーカー固定化抗体間の相互作用を利用した共培養：抗体アレイ分析法を用いて、GE1 細胞および C3H10T1/2 clone 8 細胞に発現する表面マーカーを調べた。その結果、**図 2** に示すよう

に、CD73はGE1細胞に発現するが、C3H10T1/2 clone 8細胞には発現していないことがわかった。これとは逆に、CD105はGE1細胞には発現しないが、C3H10T1/2 clone 8細胞に発現することがわかった。以上の結果から、抗CD73抗体および抗CD105抗体を用いることによって、それぞれの細胞を特異的に認識できるものと考えられた。

次に、**図1**に示す方法で2種類の抗体を基材上の異なる部位に吸着させる方法について検討した。スタンプに塗布する抗体溶液量、圧着力、流路内に注入する抗体溶液の濃度等の条件を最適化した結果、**図3**に示すように、2種類の抗体（Alexa Fluor 488およびPEで標識された抗体）を近接した部位に限局してそれぞれ吸着させることができた。

上記の検討によって最適化された抗体吸着条件を用いて、抗CD73抗体および抗CD105抗体を基材上に吸着させた。この表面にGE1細胞およびC3H10T1/2 clone 8細胞の混合懸濁液を滴下した。なお、両細胞を区別するため、予めC3H10T1/2 clone 8細胞を赤色蛍光を有するPKH26で染色した。結果を**図4**に示す。**図4A**からわかるように、細胞は均一に分布していた。一方、**図4B**からわかるように、C3H10T1/2 clone 8細胞は、抗CD105抗体を吸着させた部位に（図中の点線より下側）のみ接着し、抗CD73抗体を吸着させた部位（図中の点線より上部）には見られなかった。この結果は、

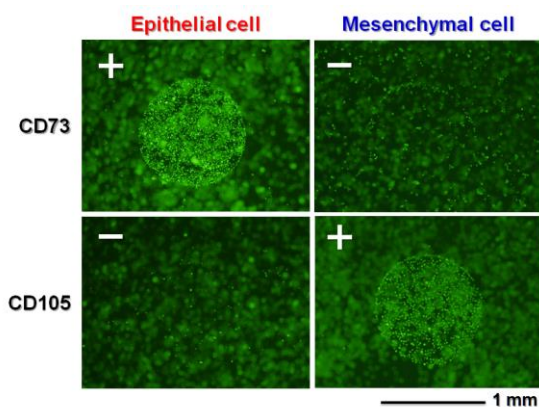


図2. 抗体アレイ法による細胞表面マーカー発現解析の結果. CD73およびCD105について示す.

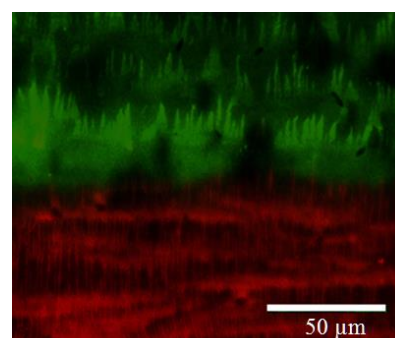


図3. 2種類の抗体を部位特異的に吸着させた基材表面の蛍光顕微鏡写真. 緑：Alexa Fluor 488 標識抗体，赤：PE 標識抗体.

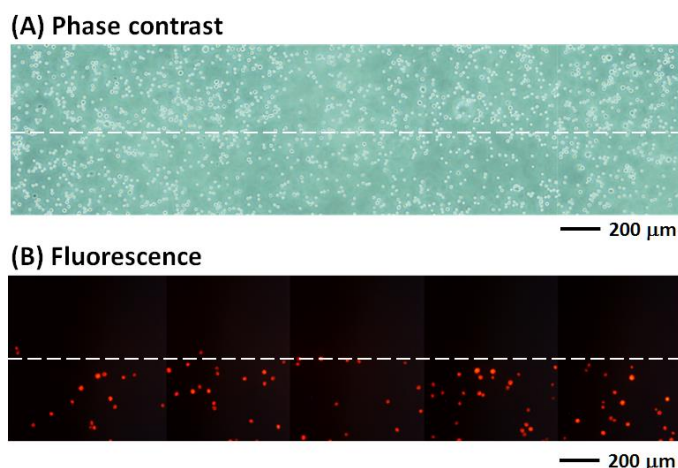


図4. 抗CD73抗体および抗CD105抗体を部位特異的に吸着表させた基材上への上皮・間葉細胞の接着. (A) 位相差顕微鏡写真、(B) 間葉細胞（赤）の蛍光顕微鏡写真. (A)と(B)は同一視野.

抗 CD73 抗体および抗 CD105 抗体を部位特異的に吸着させた基材を用いることによって、それらの領域に対応した上皮・間葉細胞共培養が可能であることを示している。しかしながら、位相差顕微鏡像と蛍光顕微鏡像を比較した場合、未染色の細胞（GE1 細胞）が抗 CD105 抗体吸着領域にも存在することがわかる。これは GE1 細胞が抗 CD105 抗体吸着領域へ非特異的に接着したためであると考えられ、より明確に区画を分けて共培養を行うには、細胞の非特異的接着を抑えるための改良が必要である。

インテグリン-細胞外マトリックス間の相互作用を利用した共培養: 第二の方法として、インテグリンの発現パターンの違いを利用して、空間的に制御された培養系を作ることを試みた。

まず、GE1 細胞および C3H10T1/2 clone 8 細胞に発現しているインテグリンの種類を RT-PCR 法によって調べた。図 5 に示すように、上皮細胞（GE1 細胞）では、とくに α_6 および β_4 インテグリンの発現が特徴的であった。これらが複合体を作るとラミニン-1 に対して比較的親和性が高いことが知られている。一方、間葉細胞（C3H10T1/2 clone 8）では α_1 および β_1 インテグリンの発現が比較的顕著であった。これらからなる複合体は I 型コラーゲンに対して親和性の高いことが知られている。

次に、各種の細胞外マトリックスに対する細胞の接着性を調べた。細胞外マトリックスとして、ラミニン-1、ファイブロネクチン、I 型コラーゲン、I 型コラーゲンの変性物であるゼラチンを用いた。それらを異なる基板上に固定して細胞の接着実験を行った。その結果を図 6 に示す。GE1 細胞はラミニン-1 に比較的よく接着した。一方、C3H10T1/2 clone 8 細胞はコラーゲンやゼラチンによく接着

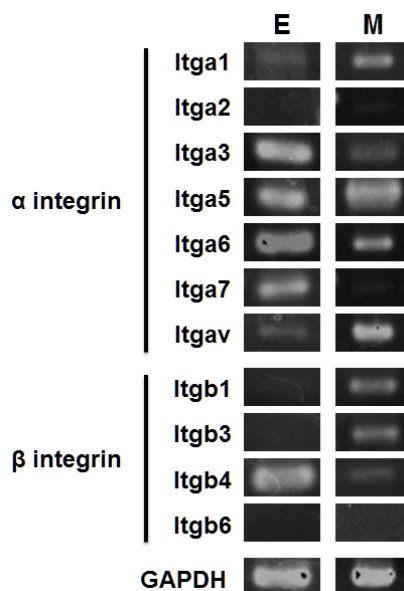
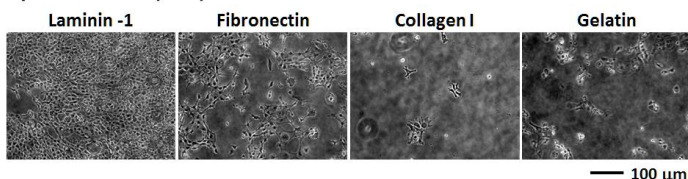


図 5. RT-PCR 法によるインテグリン発現解析結果. E: GE1 細胞 (上皮), M: C3H10T1/2 clone 8 細胞 (間葉).

Epithelial cells (GE1)



Mesenchymal cells (C3H10T1/2 clone 8)

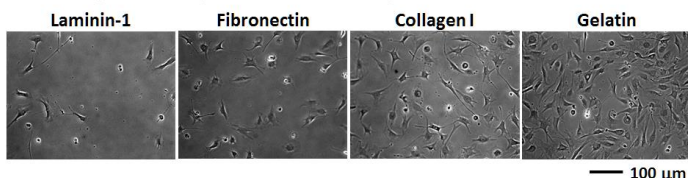


図 6. 各種の細胞外マトリックス固定化表面へ接着した上皮および間葉細胞の位相差顕微鏡像.

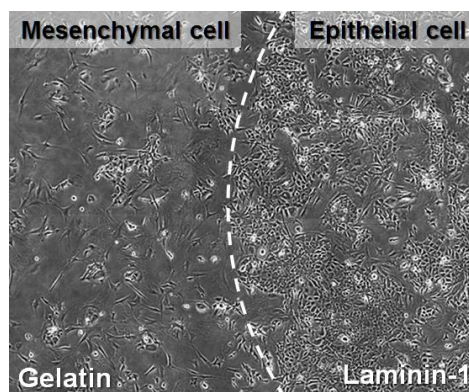


図 7. ラミニン-1 とゼラチンを部位特異的に固定した基材表面で培養した上皮および間葉細胞の位相差顕微鏡像.

することがわかった。これらの結果は、インテグリンの発現パターンから予想される細胞外マトリックス特異性と一致する。

上記の実験結果を踏まえて、上皮および間葉細胞に対して特異的に結合する細胞外マトリックスとしてラミニン-1 およびゼラチンの組み合わせを選択した。それらを特定部位かつ近接させて配置した基材を作製し、上皮・間葉細胞を播種した結果 (図7)、上皮および間葉細胞が対応する細胞外マトリックス上に選択的に接着した。ただし、細胞接着の選択性は十分には高くなかった。これは、インテグリン-細胞外マトリックス間相互作用の特異性の低さに起因しているものと推測される。

(4) まとめ

上皮および間葉の細胞集団をそれらの相対位置を制御しながら共培養するには、細胞特異的な表面マーカーあるいはインテグリンを認識する抗体あるいは細胞外マトリックスを基板上の特定部位に配置する方法が有効であることがわかった。

細胞の部位特異性をさらに向上させるための方策として、マイクロコンタクトプリンティング法のような微細加工技術を用いて、より精度の高い空間制御を行うことが有効であると期待される。また、カドヘリン-カドヘリン間のホモフィリックな相互作用のように、特異性が高くかつ強力な結合力を利用する方法も効果的であると予想される。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト (掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可)、学会発表等

1) Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Iwata H, In vivo study on the survival of neural stem cells transplanted into the rat brain with a collagen hydrogel that incorporates laminin-derived polypeptides, *Bioconjugate Chemistry*, submitted.