

細胞バイオメカニクス：マテリアルのトポロジーと細胞分化コントロール

東京大学大学院工学系研究科機械工学専攻/バイオエンジニアリング専攻

牛田 多加志

Takashi USHIDA



1. はじめに

ヒト iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells) の樹立を契機として、再生医療に対する期待は大きな高まりを見せている。特に細胞ソースとして、成熟細胞を用いるのではなく幹細胞を用いる戦略、そして自家細胞ではなく他家細胞を用いる戦略が臨床応用への現実味を帯びた視点で採用され始めたことにより、再生医療産業が飛躍的に発展する可能性が生じてきている。

幹細胞を目的の成熟細胞に分化させるには多段階の分化ステップが必要であり、その幹細胞が上流であればあるほど、そのステップの数は多くなる。それらの分化コントロールは通常は各種の細胞増殖因子やサイトカインなどいわゆる生化学因子により行われており、幹細胞を生化学刺激を用いて如何に目的の細胞に分化させるかについて多くの研究が行われている。生化学刺激による細胞の分化コントロールにかかるコストは、基本的にその細胞数に比例する。細胞数が 10^6 オーダーで進められてきた実験室レベルの規模は、再生医療の臨床においては少なくとも 10^8 オーダーに拡大する。それにともない、生化学因子にかかるコストも 100 倍に増大する。したがって、細胞分化コントロールにかかるコストを如何に低減させるかが、幹細胞の再生医療を実現化させる大きなキーポイントであると考えられている。

そこで、細胞数に必ずしも比例しないコストで細胞分化コントロールが可能な方法として、物理刺激による分化コ

ントロール、そして、マテリアルによる分化コントロールの研究が進められている。これらの方法は、生化学刺激を代替できる程の特異性を持った分化コントロールの実現までには至っていないが、生化学刺激との相補的な使い方により、細胞分化コントロールにかかるコストを十分に低減させることが可能であると考えられている。本稿においては後者のマテリアルによる分化コントロールについて、特にマテリアルのトポロジーの観点から、当方の研究を中心に概説する (図1)。

2. マテリアルによる細胞分化コントロール

血球細胞を除く全ての細胞は基質に接着することで基質から outside-in のシグナルを受け取り、細胞の機能の維持、分化のコントロールを実現していることが知られている^{1)~3)}。したがって、マテリアルの表面に生体内の環境を再現することで、生体内と同等のシグナルを細胞に伝達させるという方針のもと、多くのマテリアルが開発されてきている^{4),5)}。具体的には、細胞における接着機構の中心的な位置にあるインテグリンと相互作用可能な分子、例えばファイブロンネクチンやラミニン、そして細胞外マトリックスの一つであるコラーゲンを、マテリアル表面にコーティングする方法である。また、マテリアルの物理的な性質を変化させることにより細胞分化コントロールを実現させようとするアプローチも存在する。その典型的なアプローチが、材料の弾性率を変化させることである。基質材料の弾性率を 1 kPa から 100 kPa まで変化させることにより、ヒト骨髄性幹細胞の分化を神経細胞、筋芽細胞、骨芽細胞にそれぞれ方向付けることを実現した⁶⁾。

一方、マテリアル表面の物理的な形状を変化させることにより、細胞の分化をコントロールしようとする研究が進められている^{7)~10)}。これらの研究においては、マテリア

■ 著者連絡先

東京大学大学院工学系研究科機械工学専攻/バイオエンジニアリング専攻
(〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)
E-mail. ushida@mech.t.u-tokyo.ac.jp

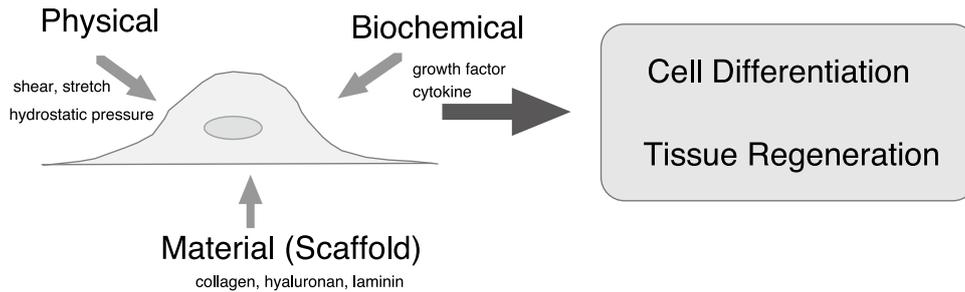


図1 生化学, 物理, マテリアルからのシグナルによる細胞分化コントロールおよび組織再生

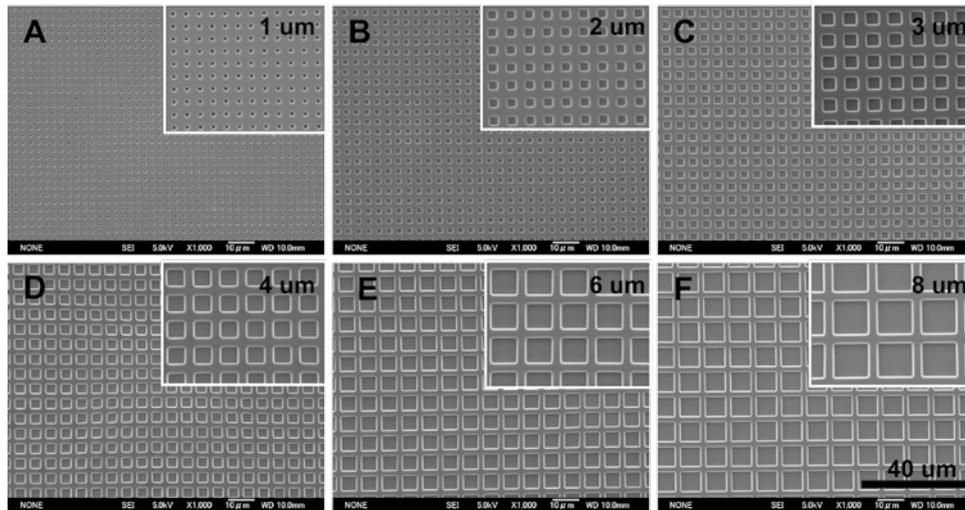


図2 MEMS技術を用いて作製された格子状のトポロジカル表面 (格子ピッチ A: 1 μm, B: 2 μm, C: 3 μm, D: 4 μm, E: 6 μm, F: 8 μm)

ル表面にmicro-またはnano-スケールの微細なパターンを形成させることにより, 細胞の接着, 運動, 増殖そして分化をコントロールしようとするものである。これらの研究は, 2次元平面でのマテリアルの親・疎水性のパターンを変化させることにより細胞接着斑の2次元的な分布をコントロールする方法と異なり, 細胞接着斑の分布を“トポロジカルに”コントロールするものである。このトポロジカルな表面と細胞接着斑との関係, そして細胞, 特に骨髄性幹細胞の分化に関する当方の研究について概説する。

3. トポロジカルな表面による骨髄性幹細胞の分化コントロール^{11),12)}

骨髄性幹細胞は, 骨髄中に存在する中胚葉系の幹細胞であり, 骨芽細胞, 軟骨細胞, 筋芽細胞, 脂肪細胞など主に筋骨格系の細胞に分化することが可能である。そこで細胞としてマウス骨髄性幹細胞を用い, 骨芽細胞への分化コントロールにおけるマテリアルのトポロジーの効果を検証した。トポロジカルな表面として, MEMS (micro electro

mechanical systems) 技術を用いて, 図2に示されるような微小な格子状の表面を作製した。格子の大きさを決めるパラメータは複数あるが, ここでは格子の深さおよび桁の幅を固定し, 格子のピッチを1~8 μmまで変化させた。この微細格子状の表面でマウス骨髄性幹細胞をosteogenic medium中で一定期間培養し, 各種骨芽細胞マーカー (alkaline phosphatase (ALP), collagen type I, osteocalcin) の遺伝子発現の変化を検証したところ, いずれのマーカーにおいてもピッチ間隔が3 μmにおいて発現のピークが見られた。マウス骨髄性幹細胞はosteogenic mediumにおいて培養されているため, 骨芽細胞への分化がコミットされているが, 格子のピッチ間隔以外は同じ条件であるにもかかわらず, このように遺伝子発現の違いが生ずる理由については, 細胞接着斑の分布の相違が考えられる。細胞接着斑は主に格子の桁のtop (lattice top) の部分に集中しており, bottomに存在する細胞接着斑は少ない。骨髄性幹細胞がなぜこのようなトポロジカルな表面においてlattice topに選択的に接着斑を形成させるか, そのメカニズムは不明

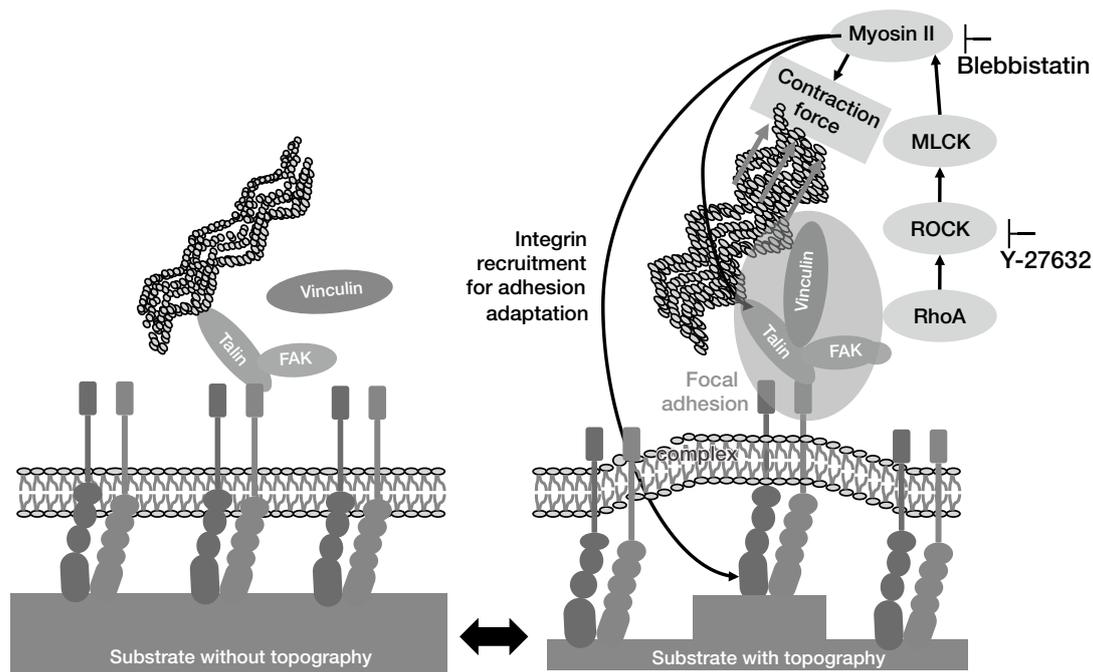


図3 格子状のトポロジカル表面におけるシグナル伝達と細胞接着斑の形成促進

であるが、細胞接着斑はoutside-inの形でシグナルを細胞に伝達し遺伝子発現を変化させることが知られているため、このような細胞接着斑の形成の相違が遺伝子発現の変化に繋がっている可能性がある。次に、このようなトポロジカルな表面で形成される細胞接着斑の詳細について検証した。

4. トポロジカルな表面における細胞接着斑の成熟と細胞シグナル^{13), 14)}

トポロジカルな表面で形成される細胞接着斑を分子レベルで解析すると、lattice topに選択的に形成された細胞接着斑には、インテグリンの他、FAK (focal adhesion kinase), vinculinなど接着斑を構成する主要な分子が高密度に集積していることが確認された。またFAKの活性化のレベルもフラットな表面と比較し有意に上昇していることも示された。これらのlattice topに存在する細胞接着斑にはアクチンファイバーの配向が強く見られた。このような細胞接着斑の形成、アクチンファイバーの配向には、RhoA/ROCK/myosin IIシグナルが知られている。このシグナルによりアクチンファイバーにより強いテンションが生じ、さらにそのテンションが細胞接着斑の形成を促進するというフィードバックシステムが存在する。ここで、ROCKインヒビターおよびmyosin IIインヒビターを作用させると、osteocalcinの遺伝子発現がフラットの表面と同

等のレベルまで減少した。このことは、トポロジカルな表面はRhoA/ROCK/myosin IIシグナルを通じて、アクチンファイバーおよび細胞接着斑の形成を促進させ、延いては遺伝子発現の変化に繋がっていることが示唆される(図3)。

5. おわりに

幹細胞を用いた再生医療の実現化のためには、幹細胞の分化コントロールにかかるコストを如何に低減するかがキーポイントであり、そのためには生化学的手法以外の手法、具体的には物理刺激そして材料によるシグナルコントロールが必須である。本稿では、後者の材料による方法、特に材料のトポロジーによる分化コントロールについて概説したが、幹細胞を用いた再生医療の実現化のためには、材料工学者の他、生体工学に関わる様々な研究者の横断的な協力が必要不可欠である。

本稿の著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Gumbiner BM: Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**: 345-57, 1996
- 2) Berrier AL, Yamada KM: Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* **213**: 565-73, 2007
- 3) Hynes RO: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-87, 2002
- 4) Place ES, Evans ND, Stevens MM: Complexity in

- biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater* **8**: 457-70, 2009
- 5) Lutolf MP, Blau HM: Artificial stem cell niches. *Adv Mater* **21**: 3255-68, 2009
 - 6) Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al: Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**: 677-89, 2006
 - 7) Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, et al: The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater* **6**: 997-1003, 2007
 - 8) Gaharwar AK, Mihaila SM, Swami A, et al: Bioactive silicate nanoplatelets for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Adv Mater* **25**: 3329-36, 2013
 - 9) Benoit DS, Schwartz MP, Durney AR, et al: Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nat Mater* **7**: 816-23, 2008
 - 10) Kim DH, Seo CH, Han K, et al: Guided cell migration on microtextured substrates with variable local density and anisotropy. *Adv Funct Mater* **19**: 1579-86, 2009
 - 11) Seo CH, Furukawa K, Suzuki Y, et al: A Topographically Optimized Substrate with Well-Ordered Lattice Micropatterns for Enhancing the Osteogenic Differentiation of Murine Mesenchymal Stem Cells. *Macromol Biosci* **11**: 938-45, 2011
 - 12) Seo CH, Furukawa K, Montagne K, et al: The effect of substrate microtopography on focal adhesion maturation and actin organization via the RhoA/ROCK pathway. *Biomaterials* **32**: 9568-75, 2011
 - 13) Seo CH, Jeong H, Furukawa KS, et al: The switching of focal adhesion maturation sites and actin filament activation for MSCs by topography of well-defined micropatterned surfaces. *Biomaterials* **34**: 1764-71, 2013
 - 14) Seo CH, Jeong H, Feng Y, et al: Micropit surfaces designed for accelerating osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells via enhancing focal adhesion and actin polymerization. *Biomaterials* **35**: 2245-52, 2014