

胆管上皮細胞の管腔構造形成に及ぼす細胞外マトリクスの弾性率の影響

Effect of Extracellular Matrix Elasticity on Biliary Epithelial Cell Ductular Formation

80815949 小松那也(Tomoya Komatsu) Supervisor 谷下一夫(Kazuo Tanishita)

1 結論

組織工学(Tissue Engineering)により生体外で組織を再生し移植する再生医療に期待が寄せられているが、現在までのところ、臓器の様な複雑な構造をもつ組織は再生されていない。臓器は生命維持に重要な物質を輸送する管のネットワークによって構成される。したがって、生体外での臓器再生に向けて、3次元的な管構造形成を制御する因子を明らかにすることが必要である。

管腔構造形成には細胞の周囲を覆う細胞外マトリクスとのインタラクションが重要な役割を果たす。しかし、細胞外マトリクスはその生化学的シグナルのみではなく、その力学的特性が細胞の形態や機能に影響を及ぼすことが近年明らかになってきた[1]。しかし、これらの研究は2次元状に接着する細胞に対する評価である。したがって、細胞外マトリクスの力学的特性が3次元的な管形成に及ぼす影響は不明であり、管形成を制御する因子となる可能性がある。

そこで、本研究では、肝臓内で胆管を構成する細胞である胆管上皮細胞をコラーゲンゲルでサンドイッチし、網目状の管構造が構築させる培養方法[2]を用いて、3次元細胞外マトリクスの力学的特性が胆管上皮細胞の管腔構造形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

2 実験方法

2-1 コラーゲンゲルの作製と弾性率の測定

コラーゲンゲルはゲル化させるときのコラーゲン濃度やpHを調整することによりコラーゲン線維の太さや長さが増減し弾性率が変化する。そこで、本研究ではコラーゲンの濃度とpHを調節することで、弾性率の異なるゲルを作製した。

ゲル化させたコラーゲンゲルの力学的特性である弾性率は、動的粘弾性測定装置により測定した。

2-2 細胞の分離と培養

胆管上皮細胞はまず、コラーゲンゲル上で単層培養し、培養5日目に形成されるコロニーをコラーゲンゲルで被覆してゲルサンドイッチ培養(3D)に移行した。

2-3 蛍光染色による微小形態の可視化

異なる弾性率のコラーゲンゲル下で構築された管構造に対し、微小構造を可視化するために蛍光染色を行った。細胞骨格をF-actin(緑)、細胞核をPI(赤)により染色し、共焦点レーザー顕微鏡により3次元画像を取得した。

2-4 遺伝子解析による胆管上皮細胞の機能評価

異なる弾性率のコラーゲンゲル下での胆管上皮細胞の機能発現をReal time qPCR法により解析した。

3 結果及び考察

コラーゲンゲルの硬さに依存し形成された管腔の断面および内腔の断面積をFig.1に示す。形成された内腔の断面積は弾性率の高いコラーゲンゲルのほうが優位に大きかった。

また、細胞と細胞外マトリクスが接着する領域で発現する接着班は弾性率の高いゲルの方がより多く発現しており(Fig.2)、胆管上皮細胞はコラーゲンゲルの硬さを認識し、その硬さに依存した管腔構造形成した。

生体内の胆管は、管腔構造の大きさに依存して機能発現が異なる(Heterogeneity)。qPCRによる機能解析の結果、コラーゲンゲルの硬さに依存して形成された大きな管腔と小さな管腔では、胆管上皮細胞の機能発現が異なり、生体内にみられるような管腔の大きさに依存したheterogeneityを有していた。

細胞周囲の力学環境と細胞の応答は、病変の際に力学環境が変化する肝硬変等での細胞の応答と関連しており、病気の原因の解明につながる。さらに、再生医療における生体外で組織再生やそれに利用するBiomaterialsの開発に役立つことが期待される。

4 結論

胆管上皮細胞は細胞外マトリクスの弾性率の硬さに依存した管腔構造形成をした。さらに、形成された管腔は管腔構造の大きさに依存し、その機能発現が異なっていた。

5 参考文献

- [1] D.E.Discher. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. Science. 2005.
- [2] W.Hashimoto Ductular network formation by rat biliary epithelial cells in the dynamical culture with collagen gel and dimethylsulfoxide stimulation. Am J Pathol. 2008

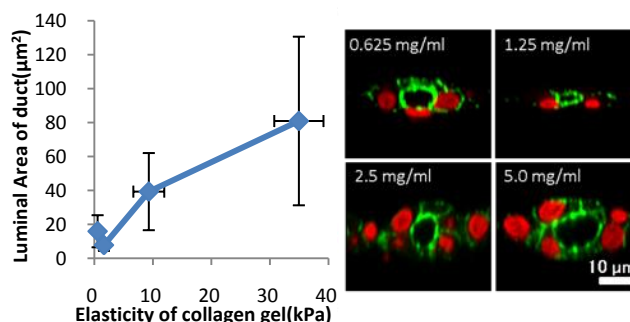


Fig.1 コラーゲンゲルの弾性率に依存した管腔構造形成

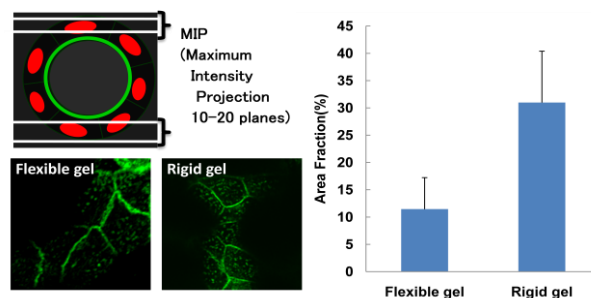


Fig.2 コラーゲン濃度に依存した接着班形成