

# 幹細胞培養のための硬質コラーゲンゲルの開発

○ 柚木 俊二<sup>\*1)</sup>、金城 康人<sup>\*1)</sup>、小林 はつみ<sup>\*2)</sup>、菊地 雅彦<sup>\*3)</sup>

## 1. はじめに

臓器・器官を構成する核種細胞に変化（分化）する能力を持つ細胞を幹細胞と呼ぶ。胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）などがある。創薬の評価系や再生医療などへの応用が期待されている。しかし、分化の制御が難しく、目的の細胞へ分化誘導させる場合の効率が極めて低いことが問題となっている。

本研究では、細胞が接着する足場、すなわち培養皿の底面の硬さが組織の硬さと近くなった場合に、その組織を構成する細胞への分化誘導が最も促進されるという最近の知見に基づき、生体高分子であるコラーゲンを用いて硬さを制御する技術を確立する。幹細胞の骨分化誘導に最適化した硬さを有する培養皿を開発する。

## 2. 実験方法

●コラーゲンゲルの作製： タイの皮から製造したコラーゲンを pH 3 希塩酸に溶解し、濃度 0.80 % のコラーゲン水溶液を調製した。食塩含有（濃度 60– 320 mM）の中性リン酸緩衝液に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド(EDC)（濃度 24– 50 mM）を溶解させた架橋剤水溶液を調製した。容量比を変えて両者を混合し、架橋コラーゲンゲルを 12 穴の細胞培養用プレートに作製した。圧縮試験により硬さ（弾性率）を求めた。

●細胞培養： 12 穴の細胞培養用プレート上に作製したゲルに、デキサメタゾン（DEX）を添加した培地（DEX+）を加え、ラットの大腿骨から採取した骨髄間質細胞（間葉系幹細胞）を播種した。培養 28 日目の Ca 濃度をオクトクレゾールフタレインコンプレキソン法で定量し、骨基質産生量とした。また、骨分化マーカーとしてオステオカルシン（OC）を ELISA 法により定量した。

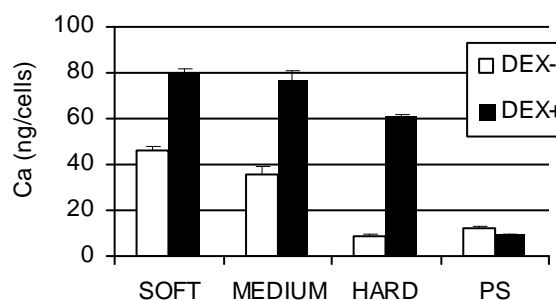


図1 コラーゲンゲルおよびPS皿上で培養した骨髄由来幹細胞の培養28日目における骨基質産生量

## 3. 結果・考察

コラーゲン濃度、EDC濃度、および線維化抑制剤としての食塩の濃度をパラメーターとして、ゲルの圧縮弾性率を 10～100 kPa の範囲で制御するレシピを作製した。圧縮弾性率 25、51、および 84 kPa のゲルを作製し、それぞれ"SOFT"、"MEDIUM"、および"HARD"と命名した。

図1に培養 28 日目における単位細胞当たりの骨基質産生量（骨分化の指標）を示す。骨分化誘導因子である DEX を加えた場合、PS 皿および HARD ゲルに比べ、SOFT および MEDIUM ゲルで高い骨基質産生量を示した。また、OC 産生量（骨分化の指標）についてもコラーゲンゲルの優位性が認められた。SOFT および HARD ゲルよりも MEDIUM ゲルで最も高い OC 産生量を示した。以上の結果から、コラーゲンゲル、特に MEDIUM ゲル周辺の硬さで特に骨髄間質細胞の骨分化を促進する可能性が示唆された。

## 4. まとめ

ラット骨髄間質細胞の骨分化誘導効率は PS 皿よりもコラーゲンゲル上で高く、圧縮弾性率 51 kPa で特に誘導効率が高まった。早期の商品化を目指す。

\*1) ライフサイエンスグループ、\*2) 井原水産（株）コラーゲン事業部、\*3)（株）ムトウ理化学機器事業部