

## 幹細胞再生治療のための細胞キャリアの開発

日大生産工(院) ○三浦 大輝

日大・医学 松本 太郎 日大生産工 野呂 知加子

### 1 まえがき

近年、人工多能性幹細胞iPSによる網膜再生医療などが話題になっている。本来幹細胞は様々な器官・組織の元になる細胞であり、体性幹細胞として体内に備わっている。特に間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell :MSC)は、自身が骨・軟骨・平滑筋・脂肪等に分化するだけでなく、組織の再生力を高める効果のあるタンパク質等を分泌することから、細胞再生移植医療の材料として注目されている。その1つの方法として、このMSCを損傷部位付近に導入し、MSCが局所に留まることで、細胞から分泌される増殖因子等が体性幹細胞を活性化し、損傷組織の再生力を高めると考えられている。また、2次元で培養した幹細胞を剥がすために必要としている酵素活性操作を省くことのできる可能性としても、細胞再生医療においては注目されている。本研究では、哺乳類の脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で体外培養することによって得られる細胞である、DFAT (dedifferentiated fat cell) にMSCの持つ高い増殖能と多分化性が備わっていることから、このDFATを使用して、細胞移植治療に用いる培養担体 (マイクロキャリア) 材料の検討とその評価を行った。

### 2 実験方法

培養担体の1つとして、「Cytodex 1」(GEヘルスケアサイエンス) という培養担体ビーズを用い、細胞の成長度合いや保持時間について、観察を行った。

Cytodex 1 は、通常時100~300  $\mu$ mの球形状をしたビーズで、攪拌培養状態で細胞が浮遊中のビーズに接着し培養される。Cytodex 1は、表面にN-N-diethyl amino ethyl groupの試薬が用いられ、軽度の正電荷を有する。

Cytodex 3は、Cytodex 1の表面にコラーゲンがコーティングされている。

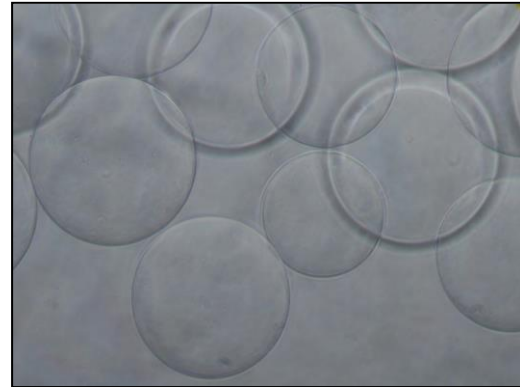


Fig 1 膨潤させた Cytodex 1 (倍率×200)

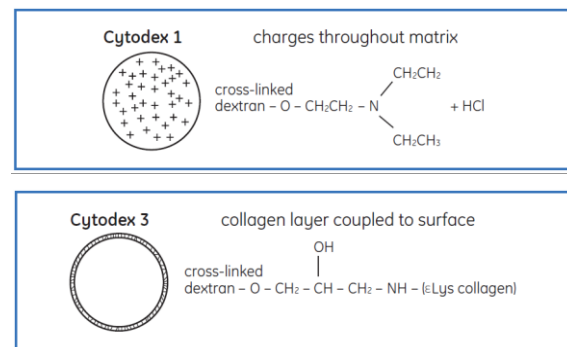


Fig 2 各 Cytodex の表面イメージ (GEサイエンス社の Website より引用)

Cytodex はカルシウム&マグネシウムイオンフリーのPBSで膨潤させた(50-100ml/g、少なくとも3時間、室温)。その後、上澄みを注ぎ出し、きれいなPBSで洗浄(30-50ml/g、小時間)、再度更に洗浄することで使用可能とした。また、使用細胞であるマウスDFATは、細胞維持培養液(DMEM+10%牛血清FBS+1%PS)にて培養した。解凍したDFATが培養皿に8割ほどになった後に、細胞数 $2 \times 10^5$  cells/mlをとり、膨潤したCytodexを導入した後、20~60rpmの攪拌、インキュベータ内(37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%)で1日培養した。

Research Development of the Cell Delivery Carrier for Stem etCell Regenerative Medicine

Daiki MIURA, Taro MATSUMOTO and Chikako YOSHIDA-NORO

その後、細胞を保持した Cytodex 1 をコラーゲンゲル (Cellmatrix Type I-A : A) に導入し、3次元における細胞の挙動や、Cytodex 1 および Cytodex 3 の細胞保持能力について検討した。

### 3 実験結果および検討

Cytodex 1 を使用して、培養した結果、Fig 3 のように、Cytodex 1 の周りに DFAT が接着していることが顕微鏡観察された。

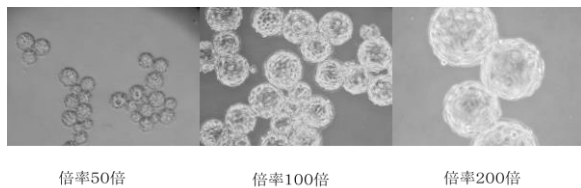


Fig 3 細胞が接着したCytodex 1

この細胞が接着したCytodex 1 をType I コラーゲンゲル内に包埋し、25日間3次元培養をした結果、包埋4日目より細胞のゲル内への遊走が観察された。25日目ではCytodex 1 から完全に細胞がコラーゲンゲル状に移動したことが確認された。

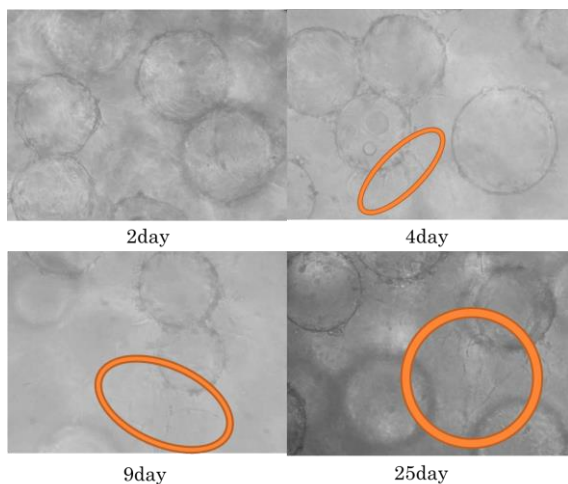


Fig.4 DFAT細胞のCytodex1からコラーゲンゲル内への移動

### 4 まとめ

DFAT細胞のCytodex 1 からコラーゲンゲル内への移動状況より、DFATについては、Cytodex 1 の環境に比べ、周りのコラーゲンの方がより好ましい環境であったと考えられた。つまり、DFATにおける細胞接着においては、「電荷による接着<コラーゲン環境」であることが判明した。一方他の細胞であるウシ大動脈

内皮細胞BAOECを用いて同様の実験を行うと、細胞はCytodex 1 からコラーゲンゲル内へ移動せず、Cytodex 1 上に留まることから (田中ら未発表)、この傾向は細胞の種類によって異なることがわかった。

さらに、表面がコラーゲンでコーティングされているCytodex 3 での細胞保持及び細胞挙動の観察および細胞種類による比較検討をしており、この結果についても報告する。

一方、Cytodexとは別の3次元培養のための培養担体として、日産化学工業株式会社製の新規3次元培養培地である「FCeM-D」を用いた培養についても検討を行っている。「FCeMシリーズ」は細胞凝集塊を均一分散するポリマー“FP001”を配合した三次元培養培地であり、FP001含有培地の効果により、非接着状態での細胞の増殖や機能を維持/促進する培養培地である。

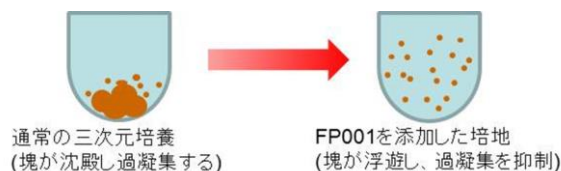


Fig 5 FCeMを使用した培養イメージ (日産化学ホームページより)

### 「参考文献」

- 1) Daisuke Obinata et al, International Journal of Urology (2011) 18, 827-834
- 2) 日本大学医学部 機能形態学系 細胞再生・移植医学分野 <http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/saisei/dfat.html>
- 3) Taro Matsumoto et al., J. Cell. Physiol. 215: 210-222, 2008.