

幹細胞組織再生治療のための移植キャリアの検討

日大生産工(院) ○三浦 大輝

日大・医学 風間 智彦 萩倉 一博 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。幹細胞とは様々な器官・組織形成の元となる細胞であり、ヒトにおいても「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、損傷組織へ再生促進因子(サイトカイン)を放出することが報告されており、細胞再生移植医療分野において、この因子を利用した組織再生促進治療が期待されている。移植治療の方法の1つとしては、MSCを損傷部位付近に移植し、MSCが局所に留まることで、細胞から分泌されるサイトカイン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。しかし、移植した細胞が損傷部位から生体内を移動してしまう可能性もあるため、細胞を局所に留め安定的で長期的なサイトカインの放出が可能な細胞保持担体を利用した幹細胞の移植法が考えられている。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から調製された幹細胞である、DFAT(dedifferentiated fat cell)にMSCと似た再生促進因子の放出能力に注目し、このDFATを使用して、幹細胞移植治療を想定した細胞保持担体(マイクロキャリア)の検討とその評価を行った。

2 実験方法

幹細胞移植治療を想定した移植担体の1つとして、「Cytodex」(GEヘルスケアサイエンス)という培養担体ビーズを用い、一定期間のキャリア球表面上の細胞の生存状態や増殖について、観察を行った。

Cytodexとは、通常時100~300 μ mの球形状、球表面上に試薬がコーティングされた架橋デキストランビーズで、細胞と共に高密度状態で培養することでビーズに細胞が接着される。しかし、Cytodexはあくまで大量培養や増殖能

の低い細胞の培養専用のキャリアであり、移植用ではないため、将来似た性能を持つ移植用キャリアを想定して本実験では使用する。

Cytodex 1は、表面にN-N-diethyl amino ethyl groupがコーティングされ、軽度の正電荷を帯びている。また、Cytodex 3は、表面に酸変性コラーゲン層がコーティングされている。



Fig 1 膨潤させた Cytodex 1 (倍率×200)

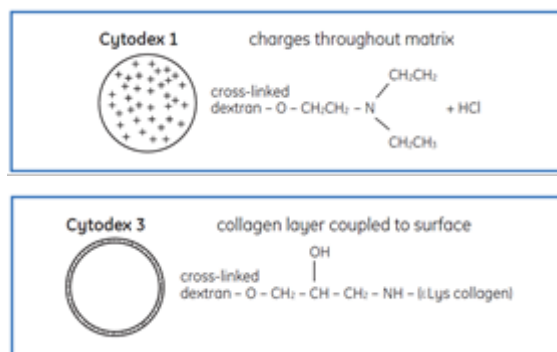


Fig 2 各 Cytodex の表面イメージ
(GE サイエンス社の Website より引用)

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 (0.5g/50ml、3時間、室温)。使用細胞であるヒト SC-DFAT は、細胞維持培養液 (DMEM+20%牛血清 FBS) にて培養した。Cytodex 培養時は、培

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

Daiki MIURA, Tomohiko KAZAMA, Kazuhiro HAGIKURA,
Taro MATSUMOTO and Chikako YOSHIDA-NORO

養時の培養液量から必要な Cytodex と細胞の量を決定した。

1~5g Cytodex /l, $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ cells/ml (以下は培養液量)

必要細胞量まで細胞を培養した後、1.5ml ふた付きチューブに必要量膨潤の各 Cytodex と細胞懸濁液を加えて接着した後、3cm ペトリディッシュに分け、7日間(37℃, 5%CO₂)培養した。その後培養した細胞(3,5,7日後)を染色し、Cytodex 1 および 3 の細胞保持能力(核染色 Hoechst33342)、細胞の増殖活性(Ki67)、アポトーシスの有無(Tunel 法)について検討した。また Tunel 法においては、染色の比較対象となるポジティブコントロールとして、DNase による意図的に死細胞を作り比較した。

3 実験結果および検討

Cytodexを使用して培養した結果、Fig 3のように、Cytodexの周りに細胞重なることなく接着することが顕微鏡にて観察された。

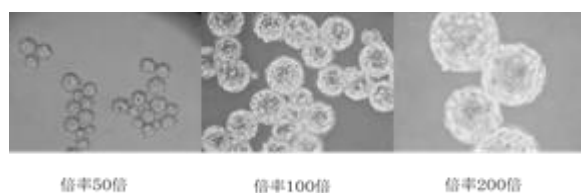


Fig 3 培養1日後、細胞が接着したCytodex 1

その後キャリアに接着した細胞を3種類の方法で染色(核染色、アポトーシス染色、Ki67免疫染色)し、キャリア表面上の生細胞とアポトーシス(死細胞)の確認と細胞の増殖活性を評価した結果、核の染色(=生細胞)が確認された。

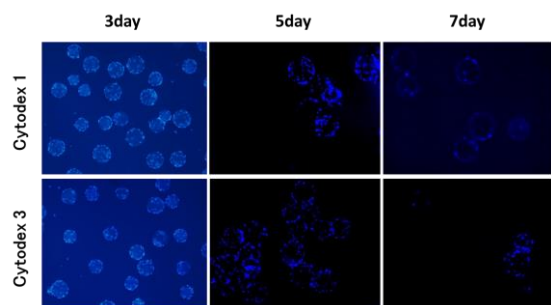


Fig 4 各培養日ごとの細胞の核染色結果

また、Ki67抗体を利用した免疫染色の結果においても染色が確認されたが、培養日数が進んだ細胞では染色される細胞が少なかった。

4 まとめ

各Cytodex 導入培養1日後の観察結果から、ヒトSC-DFATのCytodex 1および3への接着が確認された。また、キャリア培養細胞の染色結果から、Cytodex培養時においてヒトDFATは培養後7日目においても細胞が生存していることが核染色陽性とアポトーシス染色の陰性から証明された。また、核染色されたキャリア表面上の細胞の個数を観察したところ、培養1,3,5日後に比べ、7日後の細胞数が減少しているように見られた。この結果から、培養後5~6日でCytodex上の細胞が増殖できる限界に達し、細胞の離脱しているのではないかと考えられた。さらに、Ki67抗体による免疫染色の陽性細胞が同様に培養7日後の方が減少していたことも理由として考えられた。また、この現象はCytodex 3よりも1で顕著に見られた。

さらに、Cytodex表面上の細胞に平面皿培養細胞と同様の再生促進因子放出能力を保持しているか、Q-PCRによる遺伝子解析から評価、そして平面皿培養細胞との比較検討をしており、この結果についても発表する。

「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.
- 4) NUBIC 20070620
脱分化脂肪細胞を用いた再生医療実現に向けた取り組み
(医学部 先端医学系細胞再生・移植医学分野 准教授 松本 太郎)