

間葉系幹細胞による細胞治療のための細胞キャリアの開発

日大生産工(院) ○清水 颯太 日大生産工 野呂 知加子
日大・医学 松本 太郎 日大・歯学 秋田大輔

1 まえがき

近年の細胞治療では間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSC)¹⁾を用いた手法が用いられている. 日本大学医学部で開発された脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT)²⁾はMSCと同様に細胞の再生促成因子サイトカインを放出する³⁾⁴⁾ため, 細胞治療への応用が期待されている. 従来の細胞治療では体内への注射が一般的である⁵⁾が, 細胞の分布が不明瞭であり, 肺にトラップされたものが詰まって死亡した例も報告されている. そこで, 我々は高い保持能力を持ち, 細胞の分化能とサイトカイン放出能を損なわない細胞の生体内キャリアの開発を提案する.

本報告では, PLGA(poly lactic-co-glycolic acid)素材のプレートへの表面コーティングの有無による能力の変化を示す.

2 実験方法

PLGA プレート表面にコーティングを行うため, 1.5mL チューブにプレートを入れ, 濾過滅菌後の 90%エタノール 1mL で消毒を行った. その後, 滅菌水で 30min×3 回の浸水処理を行い, リジン, ゼラチンコーティングを施すものはそれぞれの水溶液を 30min で 1 回, 20min で 3 回のコーティングを行った. その後, DMEM 培地(FBS10%, PS1%)で 20min×3 回の浸水処理をし, プレートを 24well プレートに移した. そこに 5.0×10^5 cell/mL の細胞懸濁液を 100 μ L 播種した⁶⁾. 3 日間の培養観察の後, 電気泳動で 28S/18S rRNA による品質の確認を行い, 確認の後に RNA の抽出を行った. 抽出した RNA の濃度を分光光度計で測定した後, 濃度を 25ng/mL に調整し, cDNA の合成を行った. その後, Q-PCR による遺伝子発現解析を行い, コーティングの有無による発現量の比較を行った. 対象とした遺伝子は

Gapdh(内在性コントロール), Vegfa, Vegfb, Hgf, Pdgfa, Tgfa の 6 種類である.

3 実験結果及び考察

核染色による顕微鏡観察では, プレート上での細胞の増殖を確認できた. 以下のFig.1に示す.

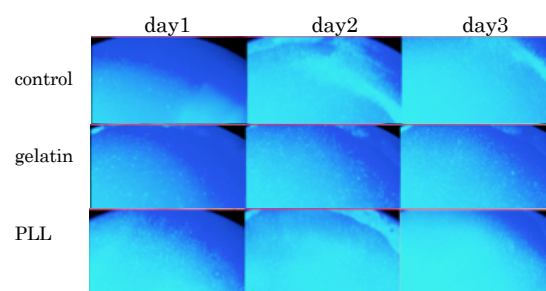


Fig.1 Nuc Blueによる核染色

Q-PCRによる遺伝子発現解析の結果を以下のFig. 2に示す. ターゲット遺伝子のVegfa, Vegfb, Hgf, Tgfb1の4種の発現が確認できた (Pdgfa, Tgfaについては発現が確認されなかった).

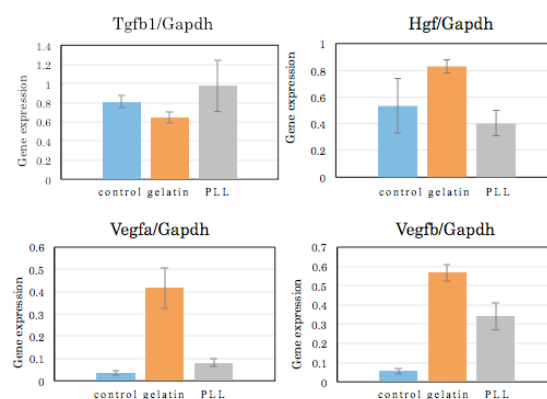


Fig.2 各遺伝子の発現量の比較

Development of carriers for cell therapy by mesenchymal stem cells

Sota SHIMIZU, Chikako YOSHIDA-NORO, Taro MATSUMOTO and Daisuke AKITA

Fig.2で示したように、Vegfa及びVegfbはPLL及びgelatinのどちらでもコーティング無しよりも高い発現が得られた。特にgelatinコーティングについては両遺伝子の発現量が他より優位であり、Hgfについても同じことが言える。一方でPLLコーティングのものはHgfの発現量がcontrolよりも低い。この3つの遺伝子発現量を確認する限りではPLLよりもgelatinコーティングの方が細胞の高いサイトカイン産生を促していると言えるが、Tgfaを見ると誤差範囲を加味してもPLLの方が高い発現量を示している。総合的に考えるとPLLよりもgelatinの方がコーティング材として優れていると推測するのが妥当であると言える。

4 まとめ

本研究では細胞移植治療の際に細胞を保持し、サイトカインを放出する機能を有する細胞キャリアの素材について検討することを目的とした。その結果として、PLGAプレート上での培養が可能であり、サイトカインを放出する状態の細胞を保持することが可能であったことを確認した。また、プレートに施したコーティングによって細胞の接着性に有意な差があり、かつサイトカイン産生に関する遺伝子の発現に大きく関わることを確認した。本実験ではプレート状のPLGAを用いたが、現在はブロック状のPLGAを用いてより立体的な条件での培養を行っている。今後の実験では、考察で述べたように他遺伝子の発現の確認。また、素材の選定に関して自ら調整したPLGA素材を用いて、キャリアの形状での性能の差異を確認していくつもりである。

今後の研究がより発展し、3次元媒体での培養研究が進展すれば、より効果的な細胞の保持が実現し、細胞再生移植治療に大きく貢献できることであろう。

「参考文献」

- 1) Bianco P, Robey PG, Simmons PJ, 2008 , Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays , Cell Stem Cell, 2(4), p313-319
- 2) Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H , 2015 , Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting, J Plast Surg Hand Surg, 49(1), p25-31
- 3) Maruyama T , Fukuda N , Matsumoto T, Kano K, Endo M, Kazama M, Kazama T, Ikeda J, Matsuda H, Ueno T, Abe M, Okada K, Soma M, Matsumoto K, Kawachi H, 2015, Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6 , Stem Cell Research & Therapy, 6:80
- 4) Charles A. Dinarello , 2007 , Historical Review of Cytokines, Eur J Immunol, 37(1), p34-45
- 5) Kucic T, Copland IB, Cuerquis J, Coutu DL, Chalifour LE, Gagnon RF, Galipeau J , 2008 , Mesenchymal stromal cells genetically engineered to overexpress IGF-I enhance cell-based gene therapy of renal failure-induced anemia, Am J Physiol Renal Physiol, 295(2), p488-496
- 6) Teresa Mortera-Blanco, Athanasios Mantalaris, , Alexander Bismarck, Nayef Aqel, Nicki Panoskaltsis, 2011, Long-term cytokine-free expansion of cord blood mononuclear cells in three-dimensional scaffolds , Biomaterials, 32(35), p9263-9270