

脱分化脂肪細胞による移植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

1. まえがき

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)は高い分化能とサイトカイン分泌活性を持つため細胞再生移植治療の材料として注目されている。脱分化成熟脂肪細胞 DFAT

(dedifferentiated fat)は MSC と類似した高い増殖能、多分化能や増殖因子サイトカイン分泌活性があり、血管新生のための治療に有効であることが示唆されている。従来の治療法では細胞の局部注射という手法がとられているが、移植後の細胞の挙動が不明なため、細胞をキャリアと結合させて移植する方法が効率的と考えられている。

本研究では DFAT 細胞を生体適合性および生分解性のある素材に接着・増殖させ、損傷局所に移植して、一定期間サイトカイン産生させた結果について報告する。

2. 実験方法および測定方法

先行実験ではキャリアとしてデキストランビーズを用いて検討した。このキャリアは細胞を増やすことには適していたが、そのまま生体内に移植するモデルとしてコラーゲンゲル内移植を行ったところ、細胞はすぐにゲル内に移動し、キャリア上に留まる時間が短かった。そこで本実験ではキャリアをポリ乳酸・グリコール酸共重合体(poly lactic-co-glycolic acid: PLGA)プレート(GC 社製)に変更し、ゼラチンやリジンコーティングを行ってから細胞を播種することで、接着性を高め、滞在時間が長くなるかどうかについて検討した。細胞キャリア上で培養した DFAT 細胞については、キャリアへの接着性の確認や、リアルタイム PCR を用いてサイトカイン産生能などの細胞特性の解析を行った。また、生体移植後のキャリアからの細胞の脱離の有無を検討するため、生体内組織をイメージしたコラーゲンゲル内移植にてモデル試験を行った。

3. 実験結果および検討

Nuc Blue™を用いた核染色でプレート上の細胞を観察したところ、各コーティングにおいて細胞の接着と成長が確認出来た。この際、

成長速度や細胞密度に有意な差はみられず、接着性の促進効果は得られなかった。

5 日間の培養後に Q-PCR による遺伝子発現解析を行った結果を Fig.1 に示す。

対象とした遺伝子は Vegfa, Vegfb, Tgfa, Hgf, Pdgfa, Tgfb1, Fgf2 の 7 種で、発現が確認出来たものが Vegfa, Vegfb, Hgf, Tgfb の 4 種類であり、Vegfa と Vegfb は血管内皮増殖因子、Hgf は肝細胞増殖因子、Tgfb1 はトランスフォーミング増殖因子である。

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比較する限りでは 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能を促していると言える。Tgfa については PLL で最も発現が大きい、他の 3 遺伝子と比較するとコーティング間での発現量の差が最も少なくなっている。上述の点より、PLL よりも gelatin の方がコーティング材として優れていると言える。

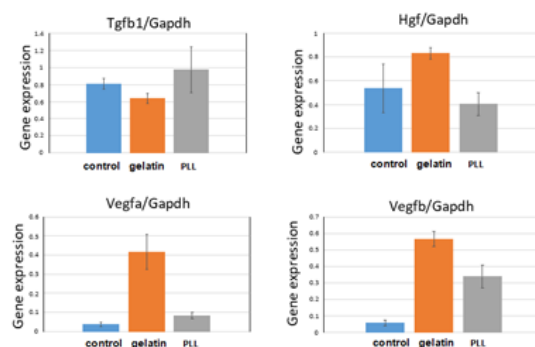


Fig.1 Q-PCR による遺伝子発現解析の結果

プレートに播種した DFAT を培養皿内で 1 日培養した後、コラーゲンゲル内に移植して数日間培養した。その時の様子を Fig.2 および Fig.3 に示す。Fig.2 はプレート中央部の細胞を核染色した様子で、Fig.3 はプレート端の様子である。Fig.3 に関しては、破線の右側がプレート、左側がゲルである。

どのコーティングに関しても培養期間中はプレート上の細胞量が大きく変化していない。また、プレートの中央と端のどちらにおいても全ての細胞が同位相内で確認出来ており、上下方向への移動は確認出来なかった。上述した点から、コラーゲンゲルへの細胞の脱離は起こっていないと言える。このことから、生体内に移植した場合でもプレートから細胞の脱離が起こらないことが予想される。

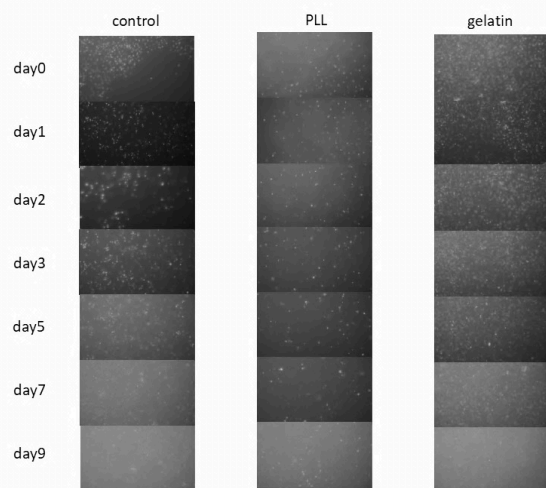


Fig.2 ゲル内のプレート中央の DFAT の様子

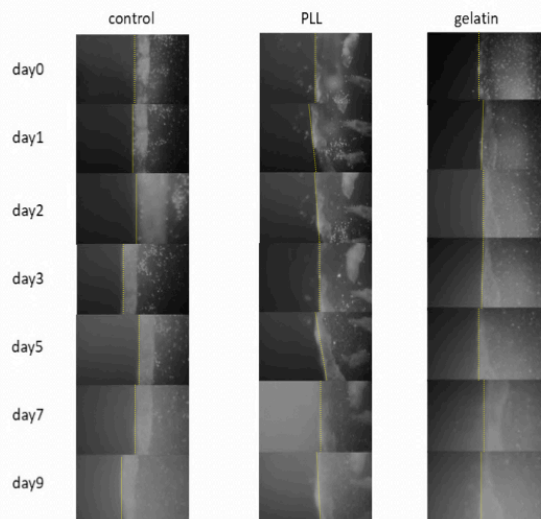


Fig.3 ゲル内のプレート端の DFAT の様子

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損なわない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、サイトカイン放出活性を維持した細胞を保持することが可能である事を確認した。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。更に、細胞を生体内移植した際にキャリア上から脱離する可能性が低く、長期間の保持が可能である事を確認した。

今後はゲル内で長期培養した際のサイトカイン関連遺伝子の確認や、別素材での培養を検討している。

現在使用している PLGA プレートは 2 次元キャリアであるが、研究が発展し 3 次元キャリアでの培養が進展すれば、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であろう。

参考文献

- 1) Bianco P, Robey PG, Simmons PJ, Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays , Cell Stem Cell, 2(4), 2008 , p313-319
- 2) Duan R, Barbieri D, Luo X, Weng J, de Bruijn JD, Yuan H, Submicron-surface structured tricalcium phosphate ceramic enhances the bone regeneration in canine spine environment , J Orthop Res, 34(11), 2016, p1865-1873
- 3) Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M, The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells, Calcif Tissue Int, 72(2), 2003, p135-142
- 4) Zuk PA1, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, Mol Biol Cell, 13(12), 2002, p4279-4295
- 5) Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H, 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, 9(1), 2015, 25-31
- 6) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Iribe Y, Tanaka T, Matsubara Y, Sakuma T, Fukuda N, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H, Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential, J Cell Physiol, 215(1), 2008, 210-222