

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06177

研究課題名(和文)細胞周期依存性の細胞接着変化を活用した間葉系幹細胞の高効率培養法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a highly efficient culture method for mesenchymal stem cells based on cell adhesion-dependent cell cycle changes

研究代表者

米永 一理 (YONENAGA, Kazumichi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60756774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト関節軟骨を用いて効率的な培養法を検証した。結果、生存細胞の最大収量とコラゲナーゼ浸漬時間の関係は、コラゲナーゼ濃度が0.6%以下で24時間、1.2%で6時間、2.4%で4時間であった。この時0.3%以下では残存軟骨片を認めた。アポトーシスアッセイではコラゲナーゼ濃度が上昇するにつれて細胞へのダメージは増加する傾向にあった。また、いずれのコラゲナーゼ濃度でも、播種濃度を3,000 cells/cm²とし、1週間の培養で最大収量を得ることができた。よって、関節軟骨の単離では0.6% コラゲナーゼを用いて、24時間浸漬し、さらに播種濃度は3,000 cells/cm²が最適である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined protocols for the digestion of articular and auricular cartilages and determined the optimal conditions for articular cartilage digestion. The maximum numbers of viable cells were obtained after digestion in 0.15, 0.3, or 0.6% collagenase for 24 h, in 1.2% collagenase for 6 h, or in 2.4% collagenase for 4 h. In tissues incubated in 0.15 or 0.3% collagenase, even at 24 h, possibly reflecting incomplete digestion of cartilage. Cell damage appeared to be greater when collagenase concentrations were high. We recommend a 24-h incubation in 0.6% collagenase as the optimal condition for chondrocyte isolation from articular cartilage. Moreover, we found that the optimum cell-seeding density is approximately 3,000 cells/cm². Conditions determined in this study would maximize the yield of isolated articular chondrocytes and enable the generation of a large quantity of cultured cells.

研究分野：歯学

キーワード：再生医療 培養 組織 浮遊細胞 トランスレーショナルリサーチ 歯学

1. 研究開始当初の背景

口腔・顎・顔面領域は、解剖学的に硬組織と軟組織が複雑に組み合わされている。歯牙と歯周組織の再生だけでなく、先天異常や悪性疾患切除などによる再建は、機能的かつ審美的な回復・改善が求められている。そのような中で現在、先天異常や、組織損傷に対する組織再生医療工学の研究・開発が進んでいる。われわれの領域では、組織再生の原料として、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells : MSC) を利用した研究が進んできている。MSC は歯髄、臍帯血、脂肪組織など生体の様々な組織で確認されているものの、患者から抽出する MSC は、主に骨髄由来の細胞 (Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow : hMSC-BM) が使われてきている。この hMSC-BM は骨髄細胞の中で接着性を有するものとして分離される細胞集団であり、この細胞の多分化能を利用した再生組織の誘導が実現しつつある。つまり、hMSC-BM は骨芽細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、脂肪細胞などあらゆる間葉系細胞に分化する能力があり、ES 細胞などと比べて、倫理的問題が少なく、また腫瘍化の可能性も低いため、再生医療の研究や臨床応用で使用しやすい特徴がある。しかしながら、骨髄中から抽出できる hMSC-BM は僅かであり、幹細胞のもつ自己複製能を利用し *in vitro* で増殖させることが多い。つまり、hMSC-BM を利用するためには培養操作のより効率的な確立が必要である。

2. 研究の目的

われわれのグループは、0.1g 程度の耳介軟骨から軟骨細胞を単離・培養して、3 次元形状と力学的強度を有するインプラント型再生軟骨の作製に成功している。その際に、従来法よりも大量の軟骨細胞 (1 億細胞以上) が必要であった。しかし、軟骨細胞は継代数が増えるほど、脱分化を起こし、基質産生能を失うことが知られており、また継代操作そのものも、再生組織の細菌汚染や取り違い事故のリスクを増加させた。したがって、必要最低限の細胞播種濃度で培養し、最大限の細胞数を獲得することで、継代数を極力減らす必要があった。そこで、われわれは、安定した耳介軟骨再生医療を提供するためのプロトコル作成の一環として、ヒト耳介軟骨からの軟骨細胞単離におけるコラゲナーゼ処理の濃度・時間、および単離後の播種濃度の最適化を図り、より効率的な細胞培養の方法を確立した (Yonenaga, et al 2010)。しかしながら、その際に至適な細胞播種濃度で培養したにも関わらず培養液交換時には、接着していない浮遊細胞が出現するを経験していた。そこでわれわれは、この浮遊細胞も通常の培養細胞と増殖能や遺伝子発現、及び炎症や腫瘍マーカー等の所見に違いがない事

を証明し、耳介軟骨細胞培養時の浮遊細胞は接着細胞と同等に扱うことができることを発見した。そして、この浮遊細胞を有効活用した培養法も確立した (Yonenaga, et al 2012)。

われわれが行ってきた軟骨再生医療での細胞培養方法と hMSC-BM の細胞培養方法は近似する点も多いが、hMSC-BM においては、培養時の増殖の効率化や品質の均一化等まだ評価・改善すべき点が多い。特に細胞増殖のメカニズムを利用した hMSC-BM の培養法を解明することは、様々な研究および臨床応用に寄与しうると考える。今回われわれは、hMSC-BM を重点的な研究対象とし、軟骨細胞研究で培った技術をもとに、細胞培養時の浮遊細胞の発生機序を解明し、より効率的な hMSC-BM の培養方法を確立するため、ヒト関節軟骨を用いて培養法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

< 組織分析 >

軟骨を 4% パラホルムアルデヒドに包埋し、凍結させた上で 10 μ m の切片を作成した。切片をトルイジンブルー O で染色した。EasyAccess (AD Science Co., Tokyo, Japan) を用いて細胞数およびマトリックス面積を分析した。

< 軟骨細胞単離 >

東京大学病院倫理委員会 (倫理許可番号 622) によって承認の下、3 人の変形性関節症患者の残存関節軟骨が手術中に採取した。サンプリングは、ヘルシンキ宣言の原則に従って行なった。3 人の患者は、74-84 歳の女性 (平均年齢、80 歳) であった。軟骨組織は 250 ~ 1,000 μ m に細切した。Clostridium histolyticum 由来のコラゲナーゼ (製品カタログ番号 : 038-10531; 和光純薬工業、大阪、日本) を、5 つの異なる濃度 (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, および 2.4%) とし使用した。この際単一のロットからのコラゲナーゼ溶液を試験全体にわたって使用した (291U/mL)、約 3mL のコラゲナーゼ溶液を 5mL チューブ (BD Falcon, Bedford, MA, USA) に移し、20 本のチューブを調製した (各濃度について 4 本のチューブ)。約 0.1g の重量の軟骨片を各チューブに添加し、チューブを 37 の水浴中で 150 サイクル/分で攪拌しながらインキュベートした。各コラゲナーゼ濃度について、2, 4, 6, および 24 時間後に NucleoCounter (ChemoMetec, Allerod, Denmark) を用いて、各コラゲナーゼ濃度について、細胞の総数、生存細胞数および細胞生存率を測定した。

< 軟骨細胞培養 >

生存細胞を、コラーゲンタイプ 1 でコーティングされた 6.4mm のプラスチック培養皿 (96 ウェルプレート) に播種した。細胞を 30,000, 10,000, 3,000, 1,000, 300, および 100 細胞/cm² の密度で播種し、初代培養の播種密度を決定した。その後、アポトーシス分析の

ために、コラーゲンタイプ1でコーティングした35mmプラスチック培養皿で培養した。培地として、Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)、5%ヒト血清 (Sigma Chemical Co.)、100ng/mL 線維芽細胞成長因子-2 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) および5µg/mL インスリン (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) を用いた。

< Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるアポトーシス解析 >

96穴マイクロプレートの各ウェルに、5,000個の細胞を移し、200gで5分間遠心分離した。培地を除去し、200µLのリン酸緩衝化生理食塩水中の80%メタノールを各ウェルに加えた。マイクロプレートを室温で30分間インキュベートし、次いで上清を除去した。続いて、マイクロプレートを室温で1~2時間インキュベートした。細胞のアポトーシスを、ssDNA アポトーシス ELISA キット (CHEMICON® International Inc., Billerica, MA, USA) を使用し、吸光度は、標準マイクロプレートリーダー (ARVO SX 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) を用いて405nmで測定した。

< 統計 >

グループあたり3つのサンプルから得られたデータを、MS Excel (Microsoft Co., Bellevue, WA, USA) でのt検定によって分析した。結果を平均±標準偏差として表した。

4. 研究成果

結果、生存細胞の最大収量 (~1×10⁵ cells/0.1g) とコラーゲナーゼ浸漬時間の関係は、コラーゲナーゼ濃度が0.15, 0.3, 0.6%で24時間、1.2%で6時間、2.4%で4時間であった(図1)。この時0.15, 0.3%では残存軟骨片を認めた。アポトーシスアッセイではコラーゲナーゼ濃度や浸漬時間に有意差はなかったが、コラーゲナーゼ濃度が上昇するにつれて細胞へのダメージは増加する傾向にあった。また、いずれのコラーゲナーゼ濃度でも、播種濃度を3,000 cells/cm² とし、1週間培養した場合が最大の収量を得ることができた(図2)。よって、関節軟骨の単離では0.6% collagenase を用いて、24時間浸漬し、さらに播種濃度は3,000 cells/cm² が最適であることが明らかとなった。これらの単離・播種の条件によりヒト関節軟骨細胞の最大収量を確保できることが示唆された。

本研究でも浮遊細胞が出現したが、この浮遊細胞の出現する機序として、1つは至適な播種濃度で培養を開始したとしても、すべての細胞が培養皿に接着するわけではないことによる。また、細胞増殖のためには、オートクリン・パラクリンの作用があると言われているが、その際に一部浮遊細胞となるものがあることが考えられる。前者においては、

以前の研究より、播種濃度を低くすると、細胞増殖はするものの時間がかかることを証明しており(Yonenaga, et al 2010)、浮遊細胞を減らす目的で播種濃度を低下させることは効率的な細胞培養のためには推奨できない。また後者においては、細胞周期のM期では、細胞分裂に際に細胞接着性が低下することが知られており、それにより浮遊細胞が出現していると考えられる。

本研究により、様々な細胞培養において、質の高い細胞の収量を上げるプロトコルを作成することは安定的な再生医療を提供するにあたり重要であることが示唆された。本研究を踏まえ、今後hMSC-BMの細胞接着能と、細胞周期を鑑みた培養方法の確立が有

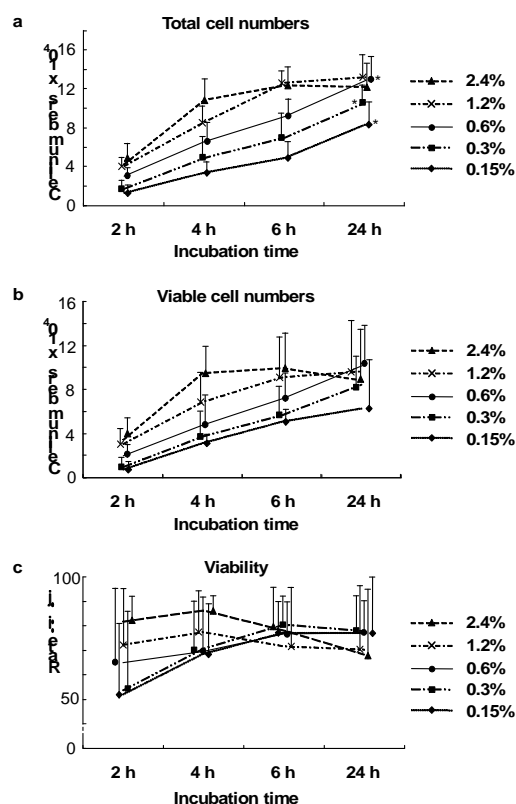


図1 コラーゲナーゼ処理後の細胞数及び生存率

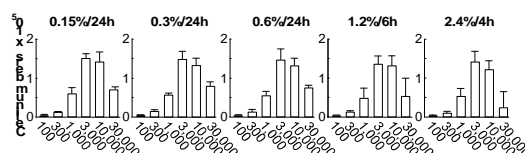


図2 播種濃度と培養1週間後の細胞数の関係

用と考える。

< 引用文献 >

Yonenaga K, Nishizawa S, Fujihara Y, Asawa Y, Sanshiro K, Nagata S, et al. The optimal conditions of chondrocyte isolation and its seeding in the preparation for cartilage tissue

engineering. Tissue Eng Part C Methods 2010;16:1461-9.

Yonenaga K, Nishizawa S, Akizawa M, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, et al. Utility of NucleoCounter for the chondrocyte count in the collagenase digest of human native cartilage. Cytotechnology 2010;62:539-45.

Yonenaga K, Nishizawa S, Fujihara Y, Asawa Y, Kanazawa S, Nagata S, et al. Application of floating cells for improved harvest in human chondrocyte culture. Biomed Res. 2012;33:281-9.

Iwata K, Asawa Y, Fujihara Y, Tanaka Y, Nishizawa S, Nakagawa T, et al. The effects of rapid- or intermediate-acting insulin on the proliferation and differentiation of cultured chondrocytes. Curr Aging Sci. 2010;3:26-33.

Tanaka Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, et al. The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage. Biomaterials 2010;31:4506-16.

Fujihara Y, Asawa Y, Takato T, Hoshi K. Tissue reactions to engineered cartilage based on poly-L-lactic acid scaffolds. Tissue Eng Part A. 2009;15:1565-77.

Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Immunological response to tissue-engineered cartilage derived from auricular chondrocytes and a PLLA scaffold in transgenic mice. Biomaterials 2010;31:1227-34.

Nishizawa S, Yamaoka H, Matsui M, Hirabayashi S, Hoshi K, Koshima I, et al. Selection and effect of ointment bases for preparing collagenase inhibitor ointment using high-performance liquid chromatography and Franz cell apparatus. Ann Plast Surg. 2009;62:187-193.

Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, Asawa Y, Nishizawa S, Nagata S, et al. Administration of the insulin into the scaffold atelocollagen for tissue-engineered cartilage. J Biomed Mater Res A. 2011;97:186-92.

Matsudaira K, Seichi A, Kunogi J, Yamazaki T, Kobayashi A, Anamizu Y, et al. The efficacy of prostaglandin E1 derivative in patients with lumbar spinal stenosis. Spine 2009;34:115-20.

Asawa Y, Ogasawara T, Takahashi T, Yamaoka H, Nishizawa S, Matsudaira K, et al. Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three-dimensional condition for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A. 2009;15:1109-18.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yonenaga K, et, al. Protocol for collagenase digestion of articular cartilage based on differences in the biological characteristics of articular and auricular cartilage. Regenerative Therapy 2017 6 9-14 (査読有)
<https://www.journals.elsevier.com/regenerative-therapy/>

〔学会発表〕(計 1 件)

Yonenaga K, et, al. Utility of floating cells in human chondrocyte culture Frontiers2016 Symposium EPFL / U Tokyo Dec. 6-7 2016 Poster Lausanne (Swiss)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

米永 一理 (YONENAGA, Kazumichi)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 60756774