

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17238

研究課題名(和文) 浮遊細胞を利用した脂肪幹細胞の高効率培養法の開発

研究課題名(英文) Development of a highly efficient culture method using floating cells

研究代表者

米永 一理 (Yonenaga, Kazumichi)

東京大学・医学部附属病院・届出診療員

研究者番号：60756774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞接着変化を活用したより効率的な細胞培養方法を開発することを目的とした。検討項目は、1)細胞の至適な播種濃度の検討、2)浮遊細胞の発生メカニズムの解明、3)浮遊細胞を用いた効率的な培養法の検討、4)より効率的な細胞の単離・抽出・培養法の開発とした。結果、1)では、至適な細胞播種濃度でも浮遊細胞が発生し、浮遊細胞の有用性が示唆された。2)では、細胞周期のパラメータを割り出し、解析を行い、浮遊細胞が発生するメカニズムを引き続き調査中である。3)では、浮遊細胞の構造変化はなく、発現している表面抗原に違いがないことが示唆された。4)では、浮遊細胞の利用が組織再生においても有用性であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞の細胞源として、脂肪組織由来幹細胞(ASC Adipose-derived Stem Cell)は患者の腹部や大腿部などから、余剰脂肪組織を手術にて摘出し、脂肪細胞をコラゲナーゼ処理、および遠心分離をすることなどで単離・抽出し、単層培地にて培養することで細胞数を確保している。しかしながら、脂肪組織から脂肪細胞を単離し、ASCを抽出する過程に不確かさがある。またASCを抽出し安全性の高い細胞を確保するためには、安定的な細胞培養技術が必要不可欠である。本研究では、臨床応用のためのプロトコル作りの一環として、細胞接着変化を活用したより効率的な細胞の培養方法を検討した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a more effective cell culture method applying changes to cell adhesion behaviors. The sub-topics of investigation were 1) optimal cell seeding density, 2) mechanism of appearance of suspended cells, 3) efficient culturing methods using suspended cells, and 4) developing more effective methods of isolation, extraction and culture of cells. In 1), suspended cells appeared even at optimal cell seeding density, suggesting the effectiveness of suspended cells. In 2), we found the parameters of cell cycles and performed analysis. We are currently continuing to study the mechanism of suspended cells appearance. Our findings in 3) suggested that there were no structural changes to suspended cells nor changes to the expressed surface antigens. In 4), we confirmed that the use of suspended cells are effective for tissue regeneration as well.

研究分野：歯学

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

われわれは、間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: MSC)の細胞源として、脂肪組織由来幹細胞(ASC Adipose-derived Stem Cell)に注目している。ASCは、本邦で、細胞付加型脂肪移植(Cell Assisted Lipotransfer)として実用化されている。これは主に体の軟組織の増大を目的とした医療技術であり、現在、口腔・顎・顔面領域の再建においても、一部臨床応用がされている。ASCは患者の腹部や大腿部などから、余剰脂肪組織を手術にて摘出し、脂肪細胞をコラゲナーゼ処理、および遠心分離をすることなどで単離・抽出し、単層培地にて培養することで細胞数を確保している。採取の方法は、吸引細管を用いて主に行われており、比較的多くの脂肪組織を確保できる特徴がある。一方で、そこから単離される脂肪細胞の質は個人差が大きく、組織残屑、粘度、採取できる脂肪の量、オイル化の程度など一定性がないことを経験している。よって脂肪組織から脂肪細胞を単離し、ASCを抽出する過程に不確かさがある。またASCを抽出し安全性の高い細胞を確保するためには、安定的な細胞培養技術も必要である。

2. 研究の目的

そこで今回、ASCを研究対象とし、臨床応用のためのプロトコール作りの一環として、細胞接着変化を活用したより効率的な細胞の培養方法を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 至適な細胞播種濃度検討

細胞の初代培養時の最適な細胞播種密度を評価するため、30,000、10,000、3,000、1,000、300、100細胞/cm²の密度で播種した。これを1週間培養後、細胞を回収し、最も収量の多い細胞播種密度がどの濃度であるかを、自動測定器 NucleoCounter® (ChemoMetec, Allerød, Denmark)を用いて明らかにした。さらにこの時各濃度においてどの程度浮遊細胞が発生しているかを培養24h後に測定した。これにより、安定して確実に細胞を確保できる濃度を決定した。

2) 浮遊細胞の発生メカニズムの解明

浮遊細胞は細胞分裂時に発生していると予想されたため、培養24h毎に接着細胞と浮遊細胞を回収し、1週間に渡って、細胞分裂の細胞周期を、BD社製ACS Vantage SEフローサイトメトリーを用いてDNA量分析にて行おこなった。蛍光色素として、生細胞のDNAを染色させることができる色素Hoechst 33342 (AdipoGen, MA, USA)を用いた。このフローサイトメータのDNA量ヒストグラムから細胞周期の各パラメータを取り出し、解析を行い浮遊細胞が発生するメカニズムを解明した。これにより、効率的な浮遊細胞回収時期を決定した。

3) 浮遊細胞を用いた効率的な培養法の検討

効率的な浮遊細胞回収時期にあわせて浮遊細胞と接着細胞を回収し、細胞そのものの構造的変化がないか、発現している表面抗原に有意な違いがないかをフローサイトメトリーを用いて検証した。また感染症の問題、癌化の問題なども可能性としては考えられるため、回収した浮遊細胞と接着細胞の癌化・アポトーシス・炎症所見の検証をおこない、各群のP53、KL6、TNF等の発現やアポトーシスアッセイなどを調べ、安全性の評価を行なった。さらに、幹細胞のマーカーとして報告されているCD34、Kit、Sca等の遺伝子発現をrealtime RT-PCR法を用いて評価した。ここまでで、確立された結果を基に、ASC培養を実際に行なった。特に接着細胞と浮遊細胞を混和して培養することに対する安全性確認のため、播種した細胞は、接着細胞のみを培養した場合、接着細胞および浮遊細胞を同等に混合し培養した場合、浮遊細胞のみを培養した場合とし、3つの群に分けた。これらを再播種し、分化誘導後、アルカリフォスファターゼ、von Kossa染色、Oil Red O染色、TB染色を用いて分化状況を確認後、I型コラーゲンI鎖、II型コラーゲンI鎖の遺伝子発現を評価した。さらに、ペレット培養、RT-PCR分析、GAGの測定、ELISA法を用いた一本鎖DNAの定量によるアポトーシスの検出を行い、浮遊細胞の有用性を検討した。

4) より効率的な単離・抽出・培養法の開発

浮遊細胞が、組織再生において有用性があり、安全であるかの解明へと繋げていくために、浮遊細胞と接着細胞から骨芽細胞に分化させた細胞塊を10mm大とし、ヌードマウス(オス)の背部左右に移植した。移植4週間後、8週間後に移植片を回収し、組織学的(HE染色)および生化学的(アルカリフォスファターゼ活性、オステオカルシン含有量)に統計的に比較検討した。この実験系を計3回施行した。さらに細胞接着性の減少が生体内での細胞増殖との関連があるのか、癌化等との関係性がないか等を観察し、その際の細胞分裂周期を確認した。

4 . 研究成果

結果、浮遊細胞は、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が明らかとなった。これにより、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が示唆された。つまり、この浮遊細胞を有効活用した培養法を行うことができる。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、細胞増殖の細胞分裂時に一部浮遊細胞となるものがあることが考えられる。また、細胞分裂は細胞周期によるものであり、特にM期では、細胞分裂の際に細胞接着性が低下することが、浮遊細胞の出現に関与していると考えられる。細胞周期には、増殖関連抗原が関与しており、この中でも各期に一致して発現するサイクリンは、細胞周期に関係なく存在する Cyclin independent kinase (Cdk) と複合体を形成する事により、Cdk が活性化されて、細胞周期を開始する。増殖関連抗原は、細胞周期の過程で一過性に発現し、その発現は増細胞周期関連抗原である Ki-67、p105、p120、そして増殖細胞核内抗原 (PCNA) は、いずれも細胞増殖に関連していることが示された。

本研究を踏まえ、引き続き、再生医療で、安定した培養を提供するためのプロトコール作成の一環として、各組織から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することを目指す。

< 引用文献 >

- 1) Yonenaga K, Nishizawa S, Nakagawa T, Fujihara Y, Asawa Y, Hikita A, Takato T, Hoshi K. Optimal conditions of collagenase treatment for isolation of articular chondrocytes from aged human tissues. *Regenerative Therapy*. 2017 6:9-14
- 2) Hoshi K, Fujihara Y, Saijo H, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Uto S, Inaki R, Matsuyama M, Sakamoto T, Watanabe M, Sugiyama M, Yonenaga K, Hikita A, Takato T. Implant-type Tissue-engineered Cartilage for Secondary Correction of Cleft Lip-nose Patients: An Exploratory First-in-human Trial. *J Clin Trials*. 2017 7(3)
- 3) Hoshi K, Fujihara Y, Saijo H, Kurabayashi K, Suenaga H, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Uto S, Inaki R, Matsuyama M, Sakamoto T, Watanabe W, Sugiyama M, Yonenaga K, Hikita A, Takato T. Three-dimensional Changes of Noses after Transplantation of Implant-type Tissue-engineered Cartilage for Secondary Correction of Cleft Lip-nose Patients. *Regenerative Therapy*. 2017 7:72-79
- 4) Torigoe K, Tanaka HF, Yonenaga K, Ohkochi H, Miyasaka M, Sato R, Kuzumaki T, Yoshida K, Yoshida T. Mechanisms of collagen fibril alignment in tendon injury: From tendon regeneration to artificial tendon. *J Orthop Res*. 2011 29(12):1944-1950.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----