

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

Development of cell carrier for cell therapy
using dedifferentiated fat cells

野呂知加子^{1, 2, 4)}, 三浦大輝²⁾, 清水颯太²⁾, 秋田大輔³⁾, 風間智彦⁴⁾, 萩倉一博⁴⁾,
松本太郎⁴⁾

Chikako YOSHIDA-NORO^{1) 2) 4)}, Daiki MIURA²⁾, Souta SHIMIZU²⁾, Daisuke AKITA³⁾,
Tomohiko KAZAMA⁴⁾, Kazuhiro HAGIKURA⁴⁾, Taro MATSUMOTO⁴⁾

¹⁾日本大学生産工学部応用分子化学科, ²⁾日本大学大学院生産工学研究科応用分子化学専攻,
³⁾日本大学歯学部歯学部歯科補綴学, ⁴⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

脱分化脂肪細胞 DFAT (dedifferentiated fat) は、間葉系幹細胞(MSC)特有の高い増殖能、多分化性および増殖因子等サイトカインの分泌活性が備わっている均一性の高い幹細胞集団である。閉塞性下肢虚血症モデルにおいて、DFAT 細胞移植は、サイトカイン分泌により患部の血管新生を促し、有効な治療となることが示唆されている。従来、細胞懸濁液を注射器で局所に複数回打つ方法がとられているが、この方法では移植後の細胞の挙動が不明のため、何らかのキャリアに細胞を結合させて移植し、局所に導入細胞を一定期間留め、サイトカインを産生させる方法がより効率的と考えられる。そこで、我々は細胞移植治療のための細胞キャリアの検討と評価を行っている。

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る方法について検討を行った。2 種類の細胞キャリア上で培養した DFAT 細胞について、細胞接着度、細胞増殖度、細胞死について検討し、サイトカイン産生など、細胞特性について解析した。

【背景および目的】

動脈硬化や糖尿病などの合併症として起こる閉塞性下肢虚血症において、幹細胞移植による血管新生誘導は有効な治療となる。体性幹細胞のひとつである間葉系幹細胞(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、組織の再生力を高める効果をもつサイトカインを分泌することから、細胞再生移植治療の材料として注目されている。現在多くの臨床試験等で行われている方法は、MSC を静脈注射し、その細胞の多くは肺に集まってサイトカイン等を分泌するので、全身の再生能力が高まるという方法である。しかし、移植後の細胞の挙動は不明で、体内のどこに分布し、どの程度の期間サイトカインを分泌し続けるかについて追跡が困難である。また、細胞数を多く注射すると、肺塞栓になる副作用が報告されている。従って、MSC を再生が必要な損傷部位付近に導入し、局所に留めた方が、効果的な治療が期待できる。

MSC は骨髄由来の細胞が多く使われているが、ドナーへの侵襲性が高いため、他の細胞源として、脂肪組織由来幹細胞 (Adipose tissue-derived Stem Cells:ASC) がよく用いられている。ASC は脂肪組織をプロテアーゼ等で解離し、遠心分離して得られた沈殿細胞由来の培養細胞であり、血管細胞等他の細胞種が混在している可能性がある。これに対して、脱分化脂肪細胞

DFAT (dedifferentiated fat) 細胞¹⁾は、脂肪量が多いため遠心分離で上に浮いてくる成熟脂肪細胞を脱分化させて得られる幹細胞であり、細胞の均一性が高い。ドナーの年齢性別にかかわらず樹立可能であり、増殖性が高いところから多くの細胞が得られ、移植細胞源として適している。培養下では脂肪、軟骨、骨、血管、平滑筋、肝臓、神経等、様々な組織に分化することが確認されている。さらに、MSCと同様のサイトカイン放出・免疫抑制・組織分化能等の性質を持つことが、これまでの研究より判明している。マウスの下肢虚血モデルに DFAT 細胞を移植する(局所への細胞懸濁液の複数回の注射)と、血流改善が起こることが確かめられている。移植細胞の一部は血管新生に参加するが、ほとんどの効果は DFAT 細胞の産生するサイトカインによるレシピエントの血管再生によるものと考えられた。

本研究では、DFAT 細胞を再生が必要な損傷部位付近に導入して局所に留めるための細胞保持担体(マイクロキャリア)について検討した。2 種類の細胞キャリア上で培養した DFAT 細胞について、キャリア表面上細胞の増殖・生存状態およびサイトカイン産生能等の細胞特性を解析、評価することにより、キャリア移植法を確立することを目的とする。

【方法】

本研究では、2 種類の細胞キャリアについて検討を行った。

1) デキストランビーズ

幹細胞移植治療を想定したマイクロキャリアとして、Cytodex 1、Cytodex 3 (GE Healthcare 社製)の 2 種を用いた(図1)。Cytodex は 100~300 μm の球形状の架橋デキストランビーズである。Cytodex 1 は、表面に N-N-diethyl amino ethyl group の試薬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、Cytodex 1 の表面にコラーゲンがコーティングされている。いずれも粉末形状であり、使用時に生理食塩水で膨潤させて用いる。細胞懸濁液 1-4x10⁵ を /2ml を Cytodex 0.002-0.01g/2ml と共に培養すると、キャリアに細胞が接着し増殖する。20~60rpm の攪拌下、インキュベータ内(37°C、CO₂ 濃度5%)で 7 日間培養(DMEM+10%牛血清 FBS+1%PS)し、Cytodex 1 および Cytodex 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、Cytodex 上の細胞のサイトカイン遺伝子発現について解析した。2 時間、1 日、2 日、4 日間培養したキャリア接着培養細胞をキャリアごと回収し、RNA を抽出した。この RNA を鋳型に cDNA を合成し、qPCR にて 5 種類の血管新生因子の(HGF, VEGF, PDGF-B, TGF-β, hbFGF) 遺伝子発現を測定した。DFAT は主としてヒト DFAT を用いた。

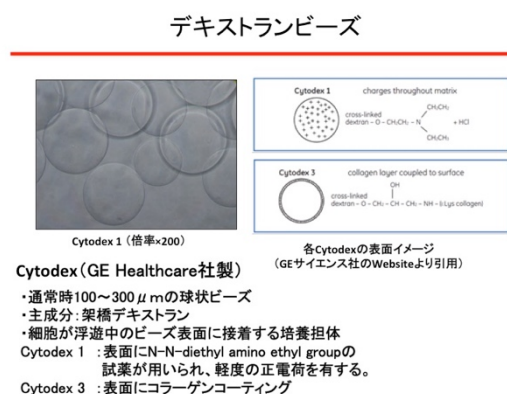


図 1. デキストランビーズ

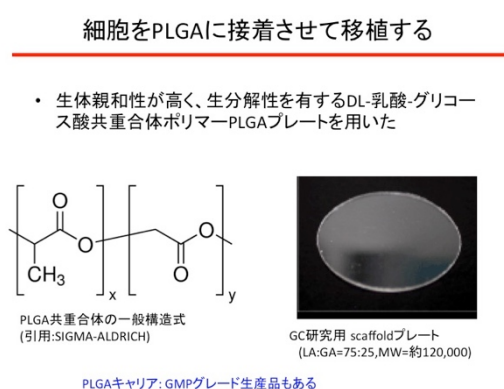


図 2. PLGA

2) PLGA (DL-乳酸 -グリコール酸共重合体)

生体適合性と生分解性があり、GMP グレードで製造されている PLGA (DL-乳酸-グリコール酸共重合体) (GC 研究用 scaffold プレート, LA:GA=75:25, MW=約 120,000 直径 5mm の透

明プレート)について細胞キャリアとしての適性を検討した(図2)。まず、培養皿(直径 3 cm)にオートクレーブ滅菌済ろ紙を敷き、その上に PLGA プレート (ほぼ透明) を置いて、70 %エタノールと滅菌水、培地の順に親水処理をした。次に PLGA プレート上に DFAT 細胞懸濁液を滴下し、数分放置して浸透させた。細胞を播種したプレートを別の培養皿に移して、7 日間培養(DMEM 培養液+10%FCS)を行い、細胞親和性や増殖性について検討した。さらに、PLGA プレート表面にゼラチンやポリ L リジン(PLL)等でコーティングをすることにより、DFAT の接着性・増殖性やサイトカイン産生能がどのように変化するかについて検討を行った。細胞接着性・増殖度は、位相差顕微鏡下および蛍光核染色色素 (NucBlue® Live Ready Probes® Reagent, Thermo Fisher) で処理した蛍光顕微鏡画像から細胞数をカウントして判定した。また、対象としたサイトカイン遺伝子は Vegfa, Vegfb, Hgf, Pdgfa, Tgfa 等であり、培養 3 日の細胞から RNA を抽出し、qPCR により遺伝子発現を判定した。DFAT はマウス DFAT-D1 を用いた。

【結果】

1) デキストランビーズ

ヒト DFAT を、Cytodex 1 と Cytodex 3 それぞれとに混合培養を行ったところ、どちらのキャリアにも細胞が接着し、増殖した。細胞を 7 日間培養し、3 種類の方法で染色(アポトーシス染色、Ki67 増殖指標免疫染色、核染色)した。まず、3 日目の細胞を核染色し、生細胞の確認をしたところ(図 1)、どちらのキャリアにおいても細胞の生存が確認された。培養 5 日目、7 日目の細胞も同様に核染色、更にアポトーシス染色、および増殖状態を確認するために Ki67 抗体を用いた染色を行った(図 2)。5 日目と 7 日目のどちらのキャリアにも生細胞が存在しており、ヒト DFAT 細胞は 7 日間 Cytodex 1 と Cytodex 3 で接着・増殖することがわかった。しかし、キャリア培養 7 日目の染色結果を詳細に検討したところ、生細胞の減少がみられた。ただ、アポトーシス染色の陽性がみられていないため、細胞は死滅したのではなく、キャリア培養 5 日目から 7 日目にかけてキャリアを離脱したと考えられた。また、Ki67 抗体を利用した増殖細胞の免疫染色の結果においても陽性が確認されたが、培養日数が進むにつれて陽性細胞は減少した。

一方、7 日目のキャリア表面の生細胞の数を比べたところ、Cytodex 3 の方が Cytodex 1 よりも、多く細胞を保持していた。この結果から、コーラゲンコートした Cytodex3 方がより細胞保持能力が高いことがわかった。

以上の結果から、Cytodex に DFAT 細胞が接着・増殖することが明らかとなり、また、細胞が十分に接着した期間が 5 日ということがわかった。そこで、それぞれのキャリアで 2 時間、1 日、2 日、4 日間培養した細胞が、血管新生因子の産生を行っているのかについて、RNA 抽出と qPCR から測定した。その結果 4 種類(VEGF、HGF、hbFGF、TGF-β)の遺伝子発現が認められた(図 5)が、PDGF-B は本実験における培養環境と PCR のサイクル数では観測されなかった。

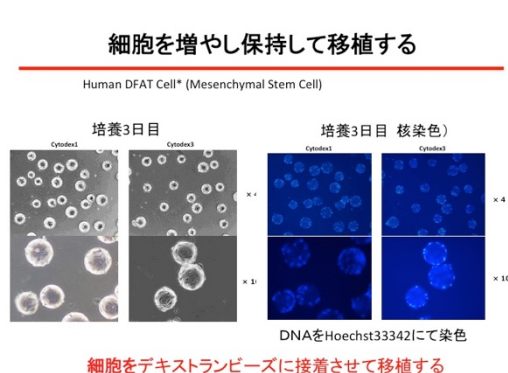


図 3 ビーズ上の細胞増殖

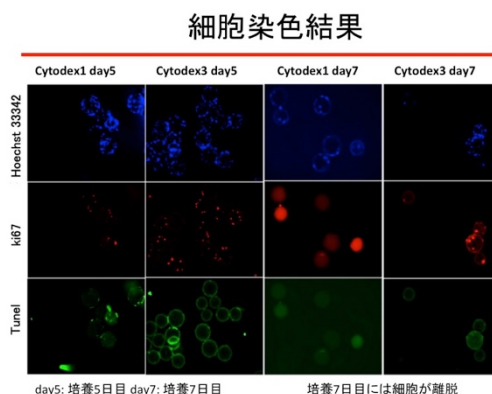


図 4 細胞染色結果

遺伝子発現解析

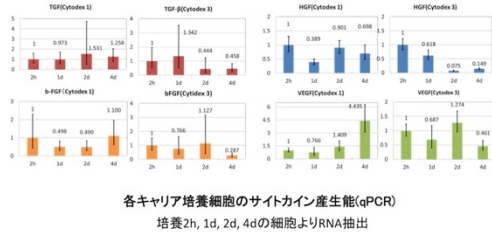


図 5 遺伝子発現解析結果

Cytodex1上に培養したDFATの コラーゲンゲル内挙動

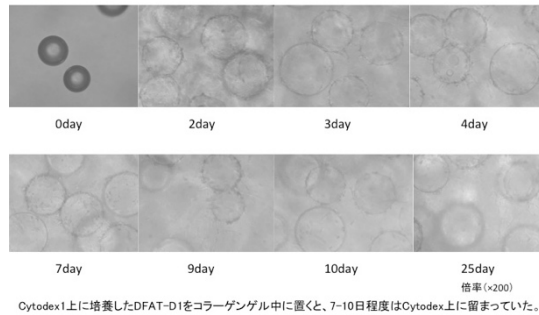


図 6 ビーズをコラーゲンゲルに移植

一方、生体への移植のモデルとして、十分に DFAT 細胞が接着した状態の Cytodex1 を、コラーゲンゲル内に埋め込んだ実験では (図 6)、細胞は 7-10 日程度 Cytodex 上に保持されていたが、その後は脱出してコラーゲンゲル内に遊走、散逸した。従ってこの方法では、生体内でビーズ上に細胞を保持できる時間は、10 日程度と考えられた。

2) PLGA (DL-乳酸 -グリコール酸共重合体)

PLGA プレート上に培養した DFAT 細胞を蛍光核染色色素 (NucRed® Live 647 ReadyProbes® Reagent, ThermoFisher) で処理し、蛍光顕微鏡 (キーエンス社 BZ-X700 オールインワン蛍光顕微鏡) 画像からセルカウントをしたところ (図7)、培養日数増加により細胞数が増加した (図8)。細胞接着性は、ゼラチンやPLLでコーティングを行った方がコーティング無よりも向上していた (図9)。細胞増殖度に関しても、同じくゼラチンやPLLでコーティング処理すると上昇することが分かった。サイトカイン産生に関しては、培養 3 日目の細胞から RNA を抽出して、qPCR を行った結果 (図 10)、Vegfa 及び Vegfb はゼラチンおよび PLL コーティングのどちらについても、コーティング無よりも高い発現が得られた。特にゼラチンコーティングについては両遺伝子の発現量が他より顕著であり、Hgf についてもゼラチンコートが優位であった。一方、Tgfa については PLL の方がゼラチンコートよりも有意に高い発現量を示した。

PLGAプレート上での培養結果

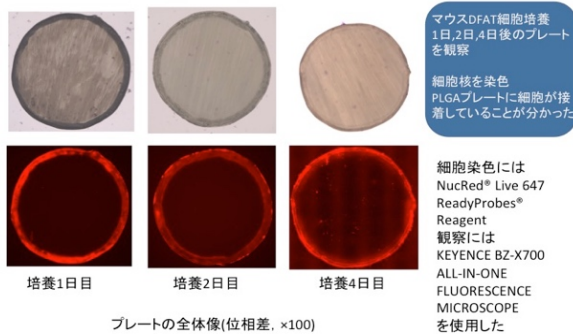


図 7. PLGA プレート上での培養

PLGAプレート上での細胞増殖

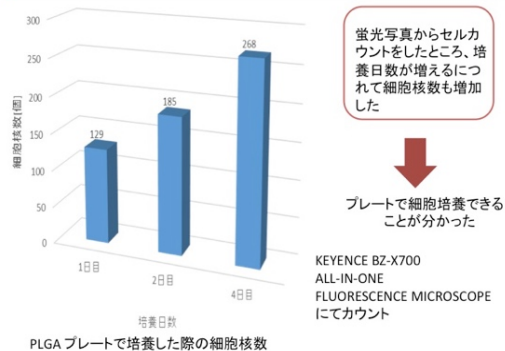


図 8. PLGA プレート上での細胞増殖

コーティングの効果



図 9. コーティングの効果(増殖)

コーティングの効果

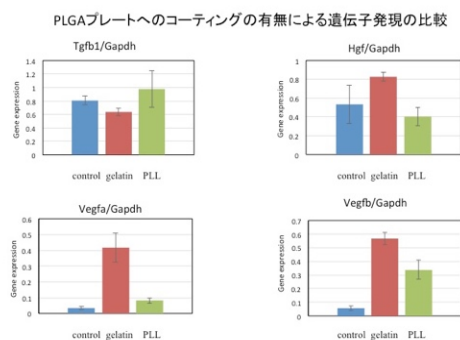


図 10. コーティングの効果(遺伝子発現)

以上の結果より、総合的には PLL よりもゼラチンの方がコーティング材として優れていることが示唆された。

【考察】

上記の結果から、ヒト DFAT 細胞は Cytodex 1 と Cytodex 3 上に 7 日間、接着/増殖することがわかった。7 日目になると脱落する細胞もあることから、初期に導入する細胞数にも依存するが、Cytodex 表面の培養は 5 日程度が至適であることが示唆された。コラーゲンコート処理の Cytodex 3 の方が Cytodex 1 よりも、多く細胞を保持していた。また、大量培養などに Cytodex を利用した文献においても、Cytodex 3 を利用した論文が多く、細胞保持を目的とした場合、Cytodex 3 の方が優れていると考えられた。

血管新生因子の産生については、qPCR の結果、VEGF, HGF, bFGF, TGF- β の遺伝子発現が認められた(図 5)が、PDGF-B の発現は観測されなかった。この結果は、通常培養時における Hunam-DFAT の結果と同様の傾向であった。移植下組織中など低酸素下では、これらのサイトカインの産生が増強することが知られているので、低酸素培養下の検討がさらに必要である。

生体移植のモデルとして、十分に DFAT 細胞が接着した状態の Cytodex1 を、コラーゲンゲル内に埋め込んだ実験から、生体内でビーズ上に DFAT 細胞を保持できる時間は、10 日程度と考えられた。別の実験でウシ血管内皮細胞を同様に Cytodex 上で培養し、Cytodex をコラーゲンゲル内包埋した場合は、細胞は Cytodex 上に留まり、コラーゲンゲル内へ移動しなかったところから、間葉系幹細胞はコラーゲンゲルに親和性が高いと考えられた。

先行研究によれば 移植のための大量の細胞を得るために、Cytodex による MSC 増幅は多く行われている²⁾³⁾。デキストラン自体は生体適合性であるが、残念ながら Cytodex 製造業者は、今のところこれをヒトへの移植に適合する基準 (GMP grade) で作成する予定がないということである。

そこで次に、すでに GMP grade で製造している例がある細胞キャリアについて検討を行った。ゼラチンベースの MedGel、アルギン酸ナトリウム、ポリ乳酸 Poly (D,L-lactide-co-glycolide; PLGA)) などである。このうち PLGA について、詳細な実験を行った。

PLGA プレート上に培養した DFAT を核染色し、画像からセルカウントをしたところ、培養日数が増えるにつれて細胞核数も増加した。また、プレートをゼラチンやポリリジンでコーティング処理により細胞が接着しやすくなることが分かった。さらに、培養後のプレートから RNA を抽出し、RT-PCR により細胞分化や増殖因子の遺伝子発現について検討した。Vegfa 及び Vegfb はコーティング無よりも有の方が高い発現が得られた。特にゼラチンコーティングが優位であった。

用いた GC 社の PLGA は GMP grade 製造ではないが、別の Evonik Röhm GmbH (Sigma-Aldrich) 社の製品には GMP grade 製造のものがあるので、こちらの方も検討を行う予定である。

さらに、プレートという平板ではなく、3D の PLGA 足場を準備中であり、3D プリンターによる成型、金型を用いた成型について、検討中である。また、Cytodex1 と同様に生体移植モデル実験(コラーゲンゲル内への移植)も検討している。

【結語】

ヒト DFAT は Cytodex 表面で培養が可能なが示された。細胞は 5 日間キャリア表面上で増殖したが、播種細胞数にもよるが、7 日目には細胞の離脱と細胞死が観察された。

サイトカイン産生について、VEGF、HGF、hbFGF、TGF- β の4つの血管新生関連因子の遺伝子発現がみとめられた。血管を誘発する VEGF の産生は培養日数(4 日目まで)に伴い、増加傾向がみられた。長期培養下、および組織内を想定した低酸素下における産生について検討する必要がある。

Cytodex1 上に培養した DFAT をコラーゲンゲル内包埋すると、DFAT のゲル内への遊走が観察されたが、包埋後 10 日程度までは細胞が Cytodex 上に残っていた。

以上の結果から、DFAT を Cytodex 上で増殖させ、細胞数を確保した上で、Cytodex ごと体内局所に移植すれば、細胞懸濁液をそのまま注射するよりも、局所に長い時間留まり、サイトカインを産生する可能性が高いと考えられた。

一方、PLGA に関しては、マウス DFAT は PLGA プレートに接着し、培養日数が増えるにつれて細胞核数も増加した。また、プレートをゼラチンやポリリジンでコーティング処理により細胞が接着しやすくなることが分かった。さらに、培養 3 日後の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR により細胞分化や増殖因子の遺伝子発現について検討した。Vegfa 及び Vegfb はコーティング無よりも有の方が高い発現が得られた。特にゼラチンコーティングが優位であった。

【参考文献】

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, *et al.* Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210-222.
- 2) Schop D *et al.* Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Mar-Apr;2(2-3):126-35. doi: 10.1002/term.73
- 3) Panchalingam KM *et al.* Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Mar-Apr;2(2-3):126-35. doi: 10.1002/term.73.
- 4) Lee YS *et al.* Development of porous PLGA/PEI_{1.8k} biodegradable microspheres for the delivery of Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *J Control Release.* 2015 May 10; 205: 128–133
- 5) Akita D *et al.* Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration. *Front Physiol.* 2016; 7:50. Published online 2016 Feb 23. doi: 10.3389/fphys.2016.00050