



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	不織布担体を用いた間葉系幹細胞の増殖培養におけるプロセス工学的研究
Author(s)	傅, 博
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第14474号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14474
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81309
Type	doctoral thesis
File Information	FU_Bo.pdf



不織布担体を用いた間葉系幹細胞の
増殖培養における
プロセス工学的研究

傳 博
北海道大学
2021 年

目 次

第 1 章 序論	1
1-1. 再生医療と幹細胞	2
1-2. 間葉系幹細胞の大量培養と不織布	5
1-3. 間葉系幹細胞の品質	9
1-4. 細胞外マトリックス (ECM) と間葉系幹細胞	11
1-5. 本研究の目的	12
1-6. 本論文の構成	13
第 2 章 間葉系幹細胞の不織布担体への播種方法の検討	14
2-1. 緒言	15
2-2. 材料と方法	16
2-3. 結果と考察	23
2-3-1. 細胞懸濁液量が細胞接着に与える影響	23
2-3-2. 播種細胞密度が増殖倍率に与える影響	24
2-3-3. 不織布に播種した細胞の分布	27
2-3-4. 不織布内での細胞分布をより均一にする試み	28
2-3-5. 培地追加添加が不織布中の細胞分布に与える影響	31
2-3-6. 培地追加添加時間の検討	34
2-3-7. SEM 観察	36
2-4. 結言	39
第 3 章 不織布担体に接着・増殖した間葉系幹細胞の品質評価	41
3-1. 緒言	42
3-2. 材料と方法	43
3-3. 結果と考察	55
3-3-1. 不織布培養した細胞の表面抗原解析	55
3-3-2. 不織布で培養した細胞の多分化能評価	58
3-3-3. 不織布とディッシュで増殖した細胞サイズの比較	61

3-4. 結言	63
第 4 章 不織布担体で増殖した間葉系幹細胞が高い骨分化能を有する要因	64
4-1. 緒言	65
4-2. 材料と方法	66
4-3. 結果と考察	72
4-3-1. ECM タンパク質量定量法の検討	72
4-3-2. ディッシュと不織布で培養した MSC の ECM 量の経時変化	75
4-3-3. 培地由来のタンパク質のディッシュと不織布への吸着	77
4-3-4. ECM 量の MSC 骨分化能への影響	79
4-4. 結言	82
第 5 章 総括	83
参考文献	87
謝辞	102

第 1 章

序論

1-1. 再生医療と幹細胞

再生医療とは、図 1-1 に示したように、患者自身や他人から採取した成熟細胞や幹細胞あるいは、これらから作成した組織を患者に移植することにより、機能不全・機能障害に陥った組織を修復する治療法である (1, 2)。

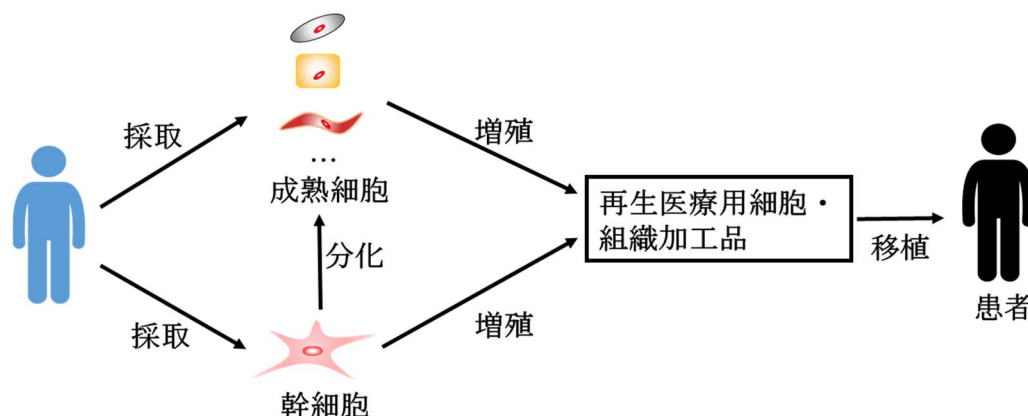


図 1-1 再生医療のプロセス

各種の成熟細胞や幹細胞の分離及び人体への移植が可能になったことにより、様々な細胞を用いた再生医療研究が展開されている。例えば、皮膚細胞を用いた火傷の治療、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell, MSC) を利用した関節軟骨損傷 (3-5) の治療、胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell, ES 細胞) を用いたパーキンソン病の治療 (6, 7) 及び心筋の損傷の治療 (8)、人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell, iPS 細胞) を利用した網膜の加齢黄斑変性症の治療 (9) などである。

これらの細胞の中で、肝臓細胞、皮膚細胞のような成熟細胞は体表や臓器表面にあり、採取しやすいが、これ以上分化せず、増殖しても寿命が短い。一方、幹細胞 (Stem cell) は、増殖して自分と同じ細胞を多数作れる自己複製能 (Self-renewal) と、別の複数種類の細胞に分化する多分化能 (Multi-potent) を合わせ

持っている細胞である(12)。したがって、幹細胞は成熟細胞と比べて得られる細胞の量的制限が少なく、再生医療において用い易い細胞源である。

一方、幹細胞には、胚性幹細胞 (ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の多能性幹細胞と、造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cell, HSC)、間葉系幹細胞などの体性幹細胞の 2 種類がある (図 1-2)。

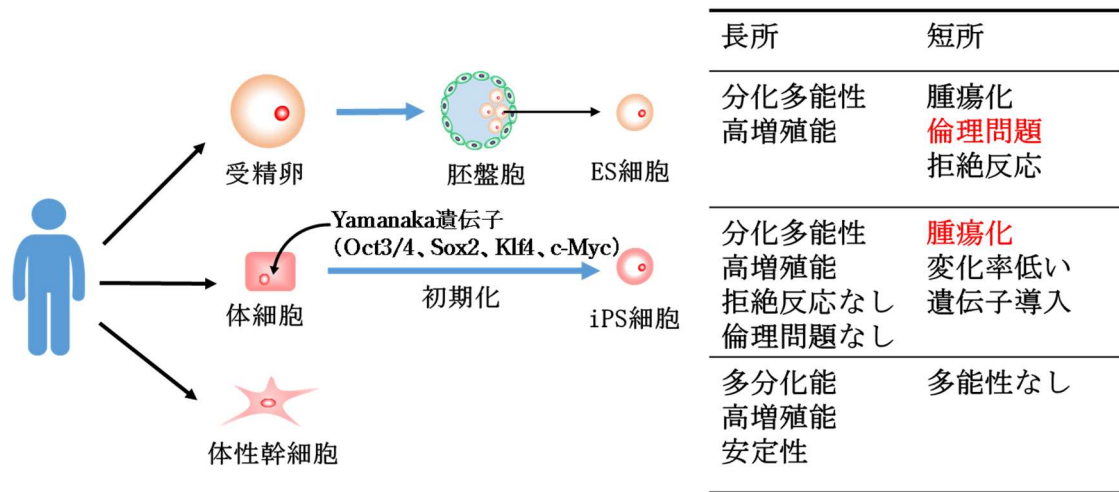


図 1-2 幹細胞

ES 細胞は発生の初期の胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性幹細胞である (13)。したがって、ES 細胞を作成するには、胚盤胞を破壊する必要があるため、生命の萌芽を滅失してしまう倫理的問題が大きい (14, 15)。そのためもあり、ES 細胞の臨床研究はあまり進んでいない。そこで、倫理的な問題が少なく、分化多能性を有する iPS 細胞に注目が集まっている。すなわち、iPS 細胞は、成熟細胞 (体細胞) に 4 つの Yamanaka 遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) を導入することにより、分化多能性を獲得した細胞である (16)。したがって iPS 細胞は自分の成熟細胞を用いて作成できるので、倫理的な問題をほぼ回避できる利点があるが、iPS 細胞を成熟細胞 (例えば、心筋細胞) へ分化させて移植す

る場合に、未分化な iPS 細胞が少しでも残っていて移植されると、高い割合で腫瘍化することが大きな問題である (16, 17)。これに対して、分化多能性はないものの多分化能と自己複製能 (増殖能) を有する体性幹細胞は生体内にすでに存在しており、体性幹細胞は生体新陳代謝の維持と組織損傷の修復を担うため、安定性があり、腫瘍化などの危険性がほとんどないと考えられている。体性幹細胞の代表として造血幹細胞、間葉系幹細胞を使った臨床研究の実績が多い (18-21)。特に、間葉系幹細胞 (MSC) は、2017 年まで主として欧米で商品化されている 22 品目の体性幹細胞医療製品の中でも 19 品目を占めていた。(39, 40、表 1-1)。

表 1-1 造血幹細胞、間葉系幹細胞の再生医療等製品の例(40)

再生医療等製品	製造販売者	細胞	適用
テムセル HS 注	JCR ファーマ	他家 MSC	急性 GVHD
Osteocel Plus	NuVasive	他家 MSC／骨前駆細胞を含む骨髄細胞	骨修復
Trinity ELITE	Orthofix International	他家 MSC、骨形成前駆細胞	筋骨格欠損
Grafix	Osiris Therapeutics	MSC、線維芽細胞、上皮細胞	創傷治癒
Strimvelis	Glaxo Smith Kline	遺伝子を導入した自家造血幹細胞	アデノシンデアミン欠損による重症免疫不全症
NEURONATA-R inj	Medipost	自家骨髄由来 MSC	変形性関節症

最初の MSC は、1976 年に Friedenstein らにより、骨髄から分離された骨や

軟骨細胞へ分化できる細胞である (21, 22)。さらに、1980 年代になって、他のグループは、この MSC が骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋芽細胞など間葉系組織の細胞に分化できる多能性があることを確認した(24, 25)。現在までに骨髄以外の脂肪組織、臍帯血、滑膜、羊水、末梢血など様々な組織から MSC が採取可能なことも明らかになっている (26-28)。さらに、MSC は中胚葉に由来する間葉系組織の細胞だけでなく、胚葉を越えて外胚葉に由来する神経細胞 (29)や内胚葉に由来する肝細胞 (30)にも分化できることが報告されている。さらに、詳しいメカニズムはまだ不明であるが、MSC は T 細胞、B 細胞、樹状細胞、NK 細胞など免疫細胞の活性を抑制することにより、獲得免疫と自然免疫システムを直接調節する能力があると言われている (31-38)。

このように、ES 細胞や iPS 細胞と異なり倫理的問題がなく、腫瘍化の可能性も限りなく低い MSC は高い増殖能と多分化能を持つだけでなく、免疫調整効果も有し、様々な組織に存在して採取しやすい利点もあることから(43, 44)、最も有望な再生医療用の細胞源として考えられている。

1-2. 間葉系幹細胞の大量培養と不織布

一般に、再生医療では、患者本人の細胞を加工して患者に移植する自家移植 (Autologous transplant)が、免疫拒絶反応を受けにくく安全なため、当初は主流であったが、多ロット少量生産のため、利益が少なく、工業的には適していない。これに対して、患者とは異なる人から採取した他家の細胞を大量に増殖して、多数の患者に移植する同種移植 (Allogeneic transplant)は、小ロット大量生産であり、工業化に適しているが、移植後に免疫拒絶を受ける危険があ

る。しかし、前節でも述べたように、MSC は免疫拒絶を受けにくく、免疫調整能力があるので、小児急性移植片対宿主病 (Acute graft-versus-host disease , aGVHD) など自己免疫疾患への免疫抑制剤として同種移植は可能である (41, 42)。また、関節軟骨のような血管やリンパ管が存在しない組織には、同種細胞を用いても拒絶反応が起こりにくいため、MSC を分化させて作製した軟骨の同種移植も可能である。従って、工業的事業として成立する可能性が高い再生医療としては、MSC 自体及び MSC 由来の軟骨細胞を用いた同種移植と考えられている。

ところで、MSC の自家移植が 1 人分の細胞を用意すれば充分であるのに対して、事業としての同種移植では同じ性質の細胞を複数人分用意する必要がある。そこで、同一ロットの MSC を大量培養する必要がある。例えば、本研究室の佐藤康史らは、他家 MSC から作製した軟骨シートを軟骨欠損部分に移植する治療法を目指し、ヒト骨髄由来の MSC を体外増殖し、軟骨細胞への分化と三次元化をスキャフォールドフリーで行うことで、直径約 6 mm、厚さ約 0.8 mm の大きさの軟骨様細胞シートを作製することに成功した(4)。この軟骨シート 1 枚の作成には約 1.86×10^6 個の MSC が必要であった。ここで患者 1 人にシート 5 枚が必要であれば、患者 1000 人なら、MSC は 9.3×10^9 cells (約 1×10^{10} 個) 必要である。また、aGVHD の治療では、患者 1 人が 4 週間の治療期間に 4.8×10^8 個 (6×10^7 cells / 回 $\times$ 2 回/週 $\times$ 4 週) の MSC を静脈注射する必要がある。つまり、患者 1000 人なら、 4.8×10^{11} 個の MSC が必要になる (41)。したがって、MSC を用いた同種移植では最低でも 1×10^{10} 個の MSC が必要と考えられた (図 1-3)。

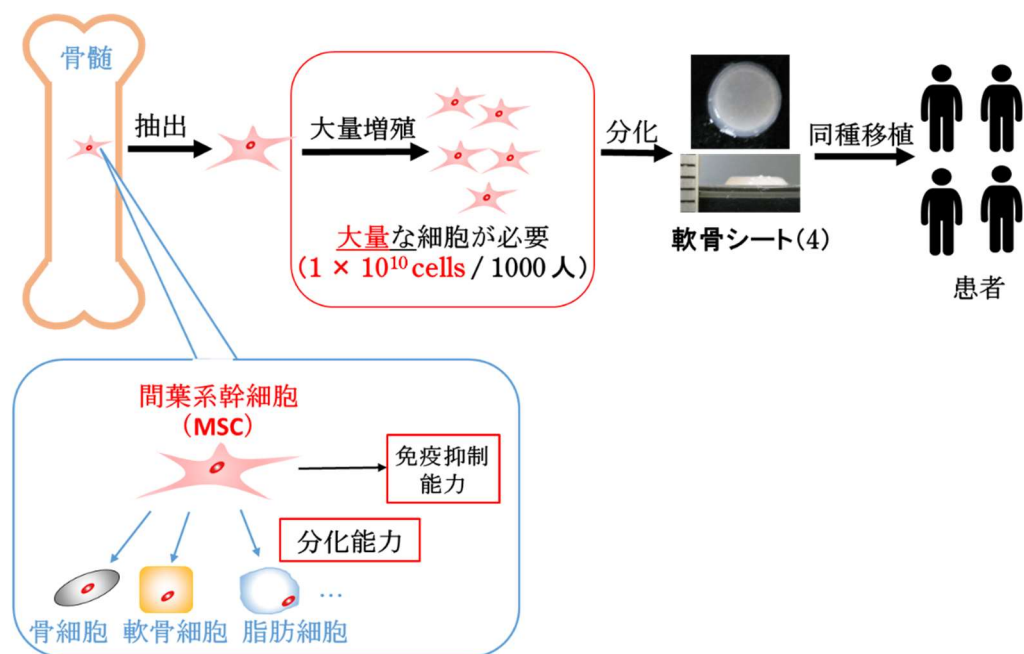


図 1-3 同種移植

ここで、通常の実験室で使用されている直径 10 cm のポリスチレンディッシュ 1 枚で平面培養できる MSC の数が約 5.5×10^5 個であることを考えると、約 1×10^{10} 個の大量の細胞を提供するには約 18,000 枚のディッシュが必要なので、容易でないことが分かる。

次に、 1×10^{10} 個の MSC を 1 ロット (1 回の培養) で獲得するにはどのような培養方法が適しているかを考えてみる。まず、ディッシュを用いたような平面培養法は前述のように非常に非効率的である。例えば、100 φ ディッシュの約 100 倍の接着面積 (約 6300 cm²) を有する平面培養器のセルフファクトリー™ (体積 : 13860 cm³/台) を用いたとしても、159 台も必要となり、非効率的であるのは変わらない。この問題の解決のため、マイクロキャリアビーズの外表面での接着培養を利用した三次元培養法が考えられた (45, 46)。標準的なマイクロキャリアである Cytodex 1 (DEAE 修飾されたデキストラン製、直径 : 190

μm のビーズ、表面積：4400 cm^2/g)は 3 g/L で攪拌培養すれば、 1×10^9 cells/L が培養可能なので、10 L の培養器を用いた 1 回の培養で 1×10^{10} 個の MSC を培養することが計算上可能である (47, 48)。しかし、マイクロキャリアの攪拌により生じるシアストレスで細胞が剥離しやすく、回収率と増殖率が低いなどの欠点があることが当研究室でも明らかにされた(48)。また、担体表面に接着させる表面型マイクロキャリア (CytoDEX 1) の他に、マイクロキャリアビーズの内部に細胞を接着させる多孔性マイクロキャリアがあり、広い接着面積を有し、細胞が剥離しにくいことを期待された。しかし、多孔性マイクロキャリアである Cytopore では、担体に接着した細胞がほとんど見られず、伸展できていないことが観察された。この要因として、細長い MSC は Cytopore 表面の曲がりくねる細孔に入れなかったためと考えられた (48)。

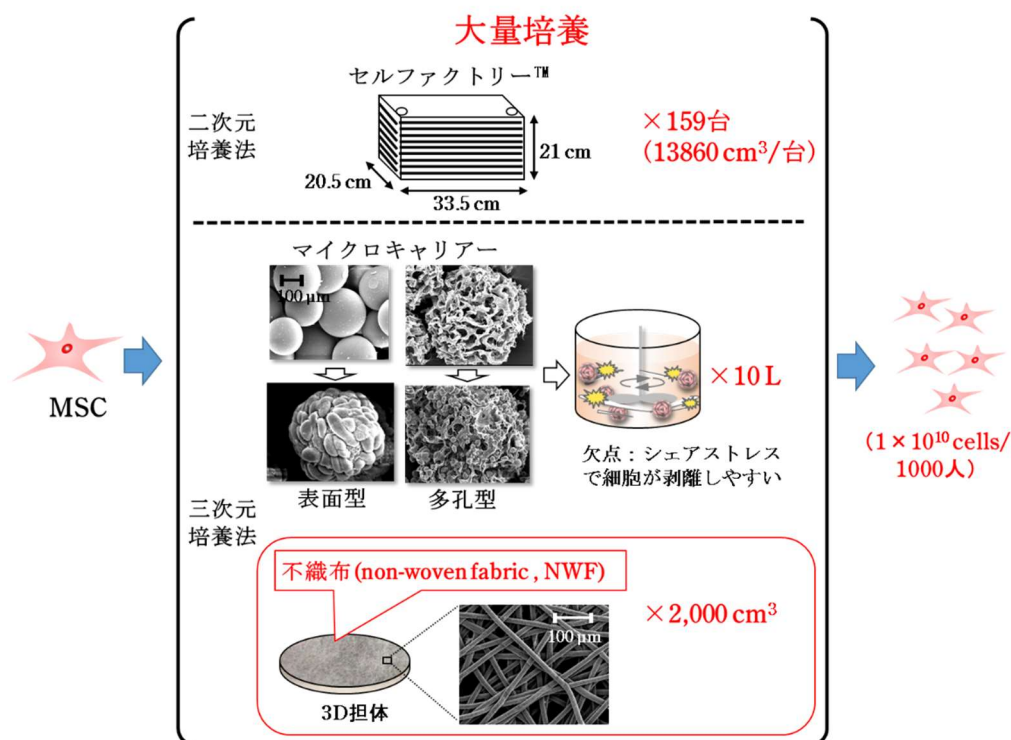


図 1-4 大量培養

そこで、我々はマイクロキャリアに代わる MSC の大量培養用の担体として内部には多数の直線上の繊維を有する多孔性細胞培養担体の不織布に着目した(図 1-4)。

不織布は織物や編物と異なり、一本ごとに分散した繊維を熱で接着して形成され、空隙を多く含む構造がある 3 次元の繊維集合体である。不織布には以下に挙げる特徴がある。繊維の長さ方向には細胞が伸長できる長い平らな面があること、体積当たりには高い表面積(旭化成製 Y-15050 の表面積: $1360 \text{ cm}^2/\text{g}$)を有すること、また繊維と繊維との間に細胞が架橋できる空間と培地が流れる空隙があることなどである。さらに不織布を用いて、静置培養できたという報告もある。これらの理由により、不織布内部で MSC を高密度に増殖させることができ、さらに、MSC が内部にあり、培地の流動によるシアストレスの影響を受けにくいので、不織布を担体として増殖した MSC は剥離しにくいと推測された。実際に、本研究室は、不織布を用いて、MSC と同じく間葉系の接着細胞であるマウスの骨髄ストローマ細胞 (SR-4987) の増殖培養に成功し、繊維芽細胞状の細胞が不織布で成長している様子を走査型電子顕微鏡で観察した(49, 50)。さらに、その際に MSC を培養する不織布担体の材質について検討した結果、ポリエステル製の不織布(旭化成製 Y-15050)が最も細胞の増殖が良いことがわかった。したがって、ポリエステル製不織布は MSC の培養においても最も可能性の高い候補と考えられた。

1-3. 間葉系幹細胞の品質

再生医療等製品として MSC を大量培養する場合、培養中に MSC の品質を維

持しておくことは重要である。骨髓由来 MSC は元々血液細胞を豊富に含む骨髓腔に存在する。骨髓腔中で MSC の幹細胞性を維持できるのは、無機ヒドロキシアパタイト (HA) の 3D 構造、細網細胞やストローマ細胞など支持細胞、造血幹細胞や骨芽細胞など共存する細胞、コラーゲンやラミニンなど細胞外マトリックス (ECM) 及び様々なサイトカインからなる複雑な幹細胞ニッチのおかげであると言われている (52-54)。それ以外、骨髓腔中のひずみ ($<2000\mu\epsilon$) とシアストレス (0.8–3 Pa) など物理環境も MSC 形態と接着に影響すると報告されている (55)。また、骨髓腔中の低酸素環境 (約 5%) は HIF-TWIST 経路を介して MSC の老化を抑制し、幹細胞性を維持することが報告されている (56)。しかし、ディッシュを用いた普通の平面培養では、このような複雑なニッチ環境が存在しないためであるせいか、平面培養した MSC は徐々に幹細胞性を失ってしまうことが報告されている (57-61)。そこで、不織布を用いた新しい培養法で増殖させた MSC の品質が維持されているかどうか評価することは重要である。

現在厳密に MSC を同定する特有の単一マーカーはないが (62-66)、2006 年に International Society of Cellular Therapy (ISCT) が提案したヒト MSC を定義するための基準では必要最低条件を満たす細胞表面抗原マーカーとして CD90、CD105、CD73 が陽性、CD45、CD34、CD14 あるいは CD11b、CD79 α あるいは CD19、HLA-DR が陰性の細胞としている (67)。また、これとは別に CD166 も MSC 表面抗原マーカーとして使われている (68, 69)。したがって、MSC の品質評価の指標の一つとして細胞表面抗原マーカーの発現を利用できる。

一方 MSC は 1-1 で述べたように中胚葉系の骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋芽細胞、外胚葉系の神経細胞及び内胚葉系の肝細胞などの成熟細胞に分化できることが報告されている (24, 25, 29, 30)。体内において MSC の特定の成熟細胞への分化は、サイトカイン、成長因子、細胞外マトリックス、転写因子など様々な要素が共同的に制御すると考えられている。In vitro における分化誘導物質 (70-73) としては、デキサメタゾン+インスリン+3-イソブチル-1-メチルキサンチン (脂肪細胞分化誘導)、アスコルビン酸+デキサメタゾン (骨細胞分化誘導)、TGF- β 1+アスコルビン酸+デキサメタゾン (軟骨細胞分化誘導) を例として挙げることができる。上述の ISCT が提案した定義には、これらの成熟細胞への分化能を有することも含まれるので、MSC の分化能が維持されていることも MSC 品質評価の指標の一つである。

1-4. 細胞外マトリックス (ECM) と間葉系幹細胞

生体内において組織中の細胞間の空隙は様々なタンパク質 (eg: フィブロネクチン、I 型コラーゲン、ラミニン) がメインの成分としての非細胞性の不溶性物質により充填されており、これらの物質を総称して細胞外マトリックス (Extracellular Matrix, ECM) と呼んでいる (74)。ECM は細胞の生存に益した物理環境を提供するだけでなく、細胞活動を制御するサイトカインを含有又はそれらと結合して様々な作用を細胞に及ぼしている (53, 54)。ECM を構成しているタンパク質自身も細胞に影響するシグナル源として報告された。例えば、ECM は MSC 表面のインテグリン (受容体) と結合することにより、細胞骨格や細胞内シグナル伝達分子を集積させ、FAK/PI3K/Akt のようなシグナル経路を

経て細胞の分化、遊走性、自己複製などの細胞活動に影響を与えることが知られている(75)。培養細胞では一般に培養中に細胞から ECM が分泌され、細胞周囲に蓄積する(図 1-5)。

Lai ら、Sudhakararao ら、Rakian らの 3 つのグループは、細胞が除去された ECM (脱細胞 ECM)の上に培養した MSC は平面培養より高い幹細胞性を維持することを報告した(82-85)。すなわち、ECM は MSC の幹細胞性の維持に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。したがって、MSC の幹細胞性が維持されている場合、細胞周囲の ECM 量を調べることが重要である。

ECM(ラミニン, フィブロネクチンなど)

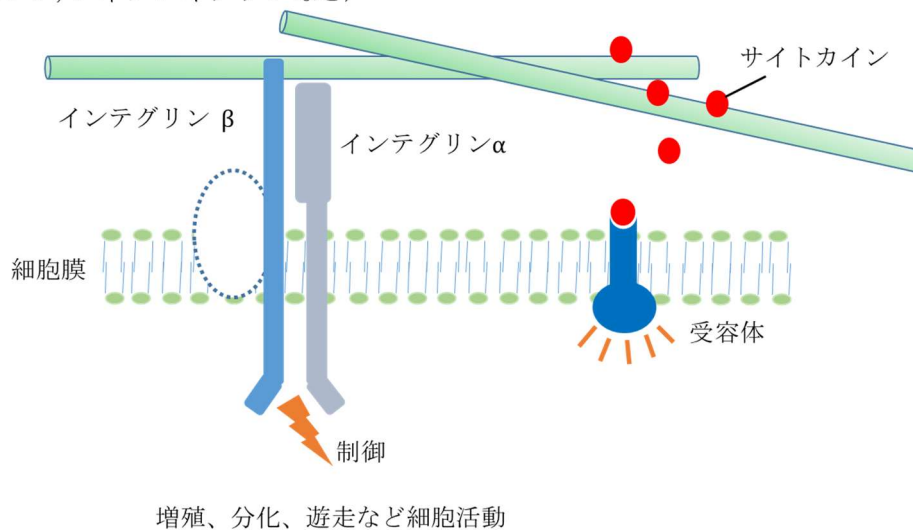


図 1-5. ECM と細胞活動

1-5. 本研究の目的

本研究では、MSC と不織布担体を用いた再生医療等製品の大量製造への応用を目指している、しかし、細胞を不織布に播種する方法についての報告はほ

とんどない。そこで、本研究では MSC の培養成績（接着効率、増殖倍率）に影響を与えると考えられる不織布担体への MSC の播種方法を検討し、不織布への最適な播種方法を明らかにすることを目的とした。さらに、本方法で培養した細胞の MSC としての品質を明らかにし、その品質が得られた要因を調べることを目的とした。

1-6. 本論文の構成

本論文は 5 章から構成されている。

第 1 章では、本研究の背景と目的について述べた。

第 2 章では、不織布を利用して間葉系幹細胞を大量培養する際に、高接着効率、高増殖倍率を得るに適した、不織布への細胞播種法について検討した。

第 3 章では、ディッシュ及び不織布を用いて培養された細胞の品質評価項目として表面抗原と分化能を比較し、不織布で培養した細胞の方がディッシュの場合より優れていることを示した。

第 4 章では、不織布で培養した細胞の品質がディッシュで培養した細胞の品質に比べて高い要因について検討した。

第 5 章では、総括として、本研究で明らかとなった成果をまとめた。

第 2 章

間葉系幹細胞の不織布 担体への播種方法の検討

2-1. 緒言

第 1 章で述べたように、MSC は再生治療の細胞源として非常に有用であるが、工業的事業として成立する可能性が高い再生医療としての同種移植を実現するためには、MSC を最低 1×10^{10} cells /ロットまで増殖する培養法が必要になる。そこで、我々は体積あたり広い表面積を有し、静置培養できる多孔性の細胞培養担体として不織布に着目した。しかし、不織布に細胞を播種する方法に関する研究はほとんどない。

そこで、2 章ではポリエステル不織布を利用して高接着効率と高い増殖倍率を得るため、播種法について検討することを目的とした。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 細胞

2-2-1-1. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC)

ドナー (ドナーA : 76 歳・女性、ドナーB : 65 歳・女性) から注射針を用いて採取した骨髄液 (約 10 ml) から、以下の方法により分離した骨髄由来接着性細胞を MSC として用いた (Lot No. HK-28, HK-33)。チュルク液 (372-12、ナカライテスク、京都、日本) を用いて骨髄液中の単核細胞数を数え、単核細胞密度が 6.0×10^5 cells/cm² になるように 100 φ ディッシュ (55 cm²) (430167, Corning, NY, USA) に骨髄液を播種し、Table 2-1 に示した細胞増殖用培地を用いて 37℃、5%CO₂ 雰囲気下で培養を行った。播種後 1 日目にディッシュを PBS(－) で洗浄してから培地交換を行い、浮遊性細胞を吸引除去した。2 日目には培地交換のみを行い、同様に浮遊性細胞を吸引除去した。播種後約 10 日間培養すると、ディッシュの所々に偏って増殖した接着性細胞のコロニーが観測できる。そこでディッシュ内での偏った増殖を防ぐために、細胞を 1 度トリプシン-EDTA (T3924, Sigma, Burlington, MA, USA) で細胞を剥離し、再度元のディッシュに播種した。再播種後、細胞がプレコンフルエントになった時点でトリプシン-EDTA で細胞を剥離し、細胞懸濁液を回収した。回収した細胞懸濁液は遠心分離 (1000 rpm, 5 min, 4℃) し、上清を除去した後、10% Dimethyl sulphoxide (D2650, Sigma) を含む細胞増殖用培地を用いてアンプル化し、液体窒素中で凍結保存した。

2-2-1-2. GFP 組み換えラット脂肪由来間葉系幹細胞 (GFP-MSC)

自治医科大学分子病態治療研究センターから購入した GFP 組換えレイス系ラ

ット (11) (NBRP Rat No.0297, LEW-Tg (CAG-EGFP)1Ys、雌、体重：342 g) の脂肪組織由来の間葉系幹細胞(MSC)を用いた。

2-2-2. MSC 増殖用培地 (10%FBS 含有 DMEM-LG)

2 種類の MSC の増殖培養には、以下の MSC 増殖用培地を用いた。10.0 g/l DMEM-LG (31600-034, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、3.7 g/l NaHCO₃ (191-01305, Wako, 大阪、日本)、10 ml/l ペニシリン・ストレプトマイシン (P7539, Sigma) となるように超純水 (W3500, Sigma) で 900 ml にメスアップした培地を濾過フィルター (595-4520, Nalgene, Waltham, MA, USA) で減圧濾過滅菌した。その後、ウシ胎児血清 (FBS) (26140-079, Gibco, Waltham, MA, USA) を 100 ml 加えた。培地の組成を Table 2-1 に示した。

Table 2-1 Composition of MSC growth medium

Component	Content
DMEM-LG (31600-034, Invitrogen)	9 g/l
NaHCO ₃ (191-01305, Wako)	3.33 g/l
Penicillin/Streptomycin (P7539, Sigma)	9 ml/l
Fetal bovine serum (26140-079, Gibco)	100 ml/l

2-2-3. 不織布

2-2-3-1. 不織布の特性

ポリエステル製不織布 (Y-15050, 旭化成、東京、日本) を実験に用いた。この不織布の特性を Table 2-2 に示した。

Table 2-2 Characteristics of polyester nonwoven fabric Y-15050

Manufacturer	Asahi KASEI
Material	Polyester
Shape	Filamentous
Fiber Diameter (μm)	21
Surface area (cm^2/g)	200
Density (g/cm^3)	1.4

不織布ディスク (図 2-1)の空隙体積 (Void volume)は、式 (1)で計算した。式 (1)で V_{NWF} は不織布ディスクの体積 (繊維の体積+繊維間の空隙の体積)で、 V_{fiber} は不織布ディスク中の繊維の体積である。不織布ディスク一枚 (直径 : 15.1 mm ϕ , 厚さ : 0.1 mm)の繊維の総体積 (V_{fiber})は、不織布ディスクの重量 (W_{fiber})と繊維の密度 (ρ_{fiber})により、式 (3)で計算した。 R_{NWF} と H_{NWF} はそれぞれ不織布ディスクの半径 (7.55 mm)と厚さである。

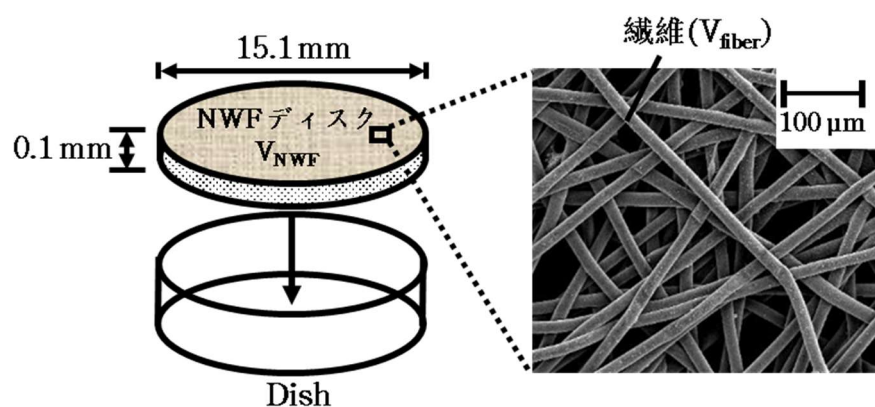


図 2-1 不織布培養系 不織布ディスクを 24 ウェルプレート of ディッシュに入れ、培養を行った。SEM を利用して不織布の中に大量の繊維が観察された。NWF ディスクの空隙体積は V_{NWF} であり、1 枚の不織布ディスクのすべての繊維体積は V_{fiber} である。

$$\text{Void volume } (\mu\text{L}) = V_{\text{NWF}}(\mu\text{L}) - V_{\text{fiber}} (\mu\text{L}) \quad (1)$$

$$\begin{aligned} V_{\text{NWF}}(\mu\text{L}) &= (R_{\text{NFW}})^2 \times \pi \times H_{\text{NWF}} \\ &= 0.76 (\text{cm})^2 \times 3.14 \times 0.01 (\text{cm}) = 18 (\mu\text{L}) \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} V_{\text{fiber}} (\mu\text{L}) &= W_{\text{fiber}} / \rho_{\text{fiber}} \\ &= 9 (\text{mg}) / 1.4 (\text{g/cm}^3) = 6.43 (\mu\text{L}) \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{Void volume } (\mu\text{L}) &= V_{\text{NWF}} - V_{\text{fiber}} \\ &= 18 (\mu\text{L}) - 6.43 (\mu\text{L}) = 11.57 (\mu\text{L}) \end{aligned} \quad (4)$$

1 枚の不織布ディスク中の繊維の表面積 (S_{fiber}) は式 (5) で計算した。式(5)で V_{fiber} は繊維の体積であり、 R_{fiber} は繊維の半径である。

$$\begin{aligned} S_{\text{fiber}} (\text{cm}^2) &= 2 \pi R_{\text{fiber}} \times V_{\text{fiber}} / \pi R_{\text{fiber}}^2 = 2V_{\text{fiber}} / R_{\text{fiber}} \\ &= 2 \times 6.43 (\mu\text{L}) / 10.5 (\mu\text{m}) \\ &= 12.24 (\text{cm}^2) \end{aligned} \quad (5)$$

2-2-3-2. 不織布の使用前処理

不織布を純水 (Elix 水) で水洗した後、60℃の乾燥機に約 6 h 入れ、水分を除去した。乾燥した不織布を浮遊培養用 24 ウェルプレート (MS-8024R, 住友ベークライト、東京、日本) のウェルの大きさと同じ 1.8cm² の円板状に細切した後、不織布 100 枚を 50 ml の PBS(-) の入った 100 ml 容ビンに入れ、オートクレ

ープ処理(HV-50, HIRAYAMA、埼玉、日本) (121℃, 20 min) を行った。その後、培養の開始直前、火炎滅菌したピンセットを用いて、不織布を培地ビンから取り出し、浮遊培養用 24 ウェルプレート of 各ウェルに 1 枚ずつ置き、さらに増殖用培地 1 ml を加え、1 h 放置した。1 h 後、培地を吸引除去した。

2-2-4. 培養方法

2-2-4-1. ディッシュ増殖前培養

MSC 増殖用培地 (Table 2-1) 10 ml を用いてアンプル内の保存細胞を、播種細胞密度が 0.15×10^4 cells/cm² となるように 100 φ ディッシュ (430167, Corning) に播種し、37℃、5%CO₂ 雰囲気下でプレコンフルエントになるまで静置培養を行った。プレコンフルエント到達後、トリプシン-EDTA (T3924, Sigma) を用いて細胞を剥がし、播種細胞密度が 0.15×10^4 cells/cm² となるように 100 φ ディッシュに継代し、必要な細胞数に到達するまで継代培養した。

2-2-4-2. 不織布増殖培養

不織布培養には、浮遊培養用 24 ウェルプレート (MS-8024R, 住友ベークライト) を用いた。2-2-4-1 にてディッシュ内で前培養した細胞がプレコンフルエントに到達した後、トリプシンで回収し、細胞懸濁液を調整した。次に、あらかじめ 2-2-3-2 で用意しておいた増殖用培地 (Table 2-1) を用いて、規定の細胞密度となるように所定の液量の細胞懸濁液を不織布に播種した後、37℃、5% CO₂ 雰囲気下で培養した。播種 8 h 後、24 ウェルプレートのウェル内に増殖用培地を 1 ml 加えた。培地を 7 日ごとに新しいものと交換した。

2-2-5. 分析方法

2-2-5-1. 細胞数計数

ディッシュ前培養における接着細胞数は、トリプシンでディッシュから剥離して得られた細胞をトリパンブルー染色し、血球計算盤で計数して求めた。不織布に接着している細胞数は、24 ウェルプレート内の不織布をピンセットで取り出し、エッペンチューブ(616201, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Oberösterreich, Austria)内の 500 μ l の脱核染色液(クリスタルバイオレット 1.0 g/l, クエン酸 21 g/l) に室温で 24 h 浸漬した後、染色された細胞核を血球計算盤で計数して求めた(86)。

2-2-5-2. 蛍光顕微鏡観察

不織布ディスク中の細胞を可視化するために、2-2-4-2.に従い、GFP-MSC を所定条件で不織布に播種し、培養した後、蛍光顕微鏡 (IX 70, OLYMPUS、東京、日本)で観察した。具体的には、培養後の不織布を蛍光顕微鏡のステージに載せ、40 倍で蛍光観察し(励起波長 395 nm)、必要に応じて観察画像を記録した。不織布ディスクの中央 (A)と外周付近の 2 つの領域 (B、C)の 3 視野について、時間経過に従い蛍光写真を撮った。そして、各時間における視野 A, B, C のそれぞれの細胞数 (蛍光ドット)を計数した。さらに、細胞密度のばらつきの指標として標準偏差を算出した。

2-2-5-3. SEM

細胞を培養した不織布ディスク 1 枚をエッペンチューブ (616201, Greiner Bio-One) に入れた後、2.5%グルタルアルデヒド溶液 (072-02262, Wako) を 1 ml 加え、室温で 1 h、その後 4℃で 1 h 処理した。次に、上清を除いた後、4℃の PBS(－) 1 ml を用いて、15 min 間隔で 4 回洗浄した。その間、99.5%エタノール (17065-0382, 純正化学、東京、日本) を用いて、50%、70%、80%、90%、95%まで段階希釈したエタノール溶液を作成した。洗浄終了後、上清を除いた。次に、段階希釈したエタノールを 50%から 95%まで順に 1 ml 加え置換し、それぞれ 15 min 間ずつ処理した。その後、99.5%エタノール 1 ml を加え、3 回、15 min 間の置換を繰り返した。次に、酢酸イソペンチル (016-03646, Wako) 1 ml を用いて、15 min 間隔で 2 回処理を行った。次に、不織布を電子顕微鏡用ステージに固定した後、臨界点乾燥装置 (HCP-2, HITACHI、東京、日本) を用いて乾燥を行った。次に、イオンスパッタリング蒸着装置 (E-1010, HITACHI) を用いて不織布表面に白金の蒸着処理を行った。蒸着処理した不織布の表面を走査型電子顕微鏡 (JSM-6510LA , JEOL、東京、日本) を用いて観察した。

2-3. 結果と考察

2-3-1. 細胞懸濁液量が細胞接着に与える影響

細胞の不織布への接着効率を向上させるため、2-2-3-1.で算出した不織布の空隙体積 (11.57 μ l)を参考にして、播種時の細胞懸濁液量が細胞接着に与える影響について検討した。24 ウェルプレートにウェルに加えた不織布ディスクに、播種細胞密度が 1.23×10^3 cells/ cm² -NWF となるように、細胞懸濁液 (MSC, ドナーA、 $4.7 \sim 15 \times 10^4$ cells/ ml)10 $\sim$ 320 μ l を播種し。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で静置

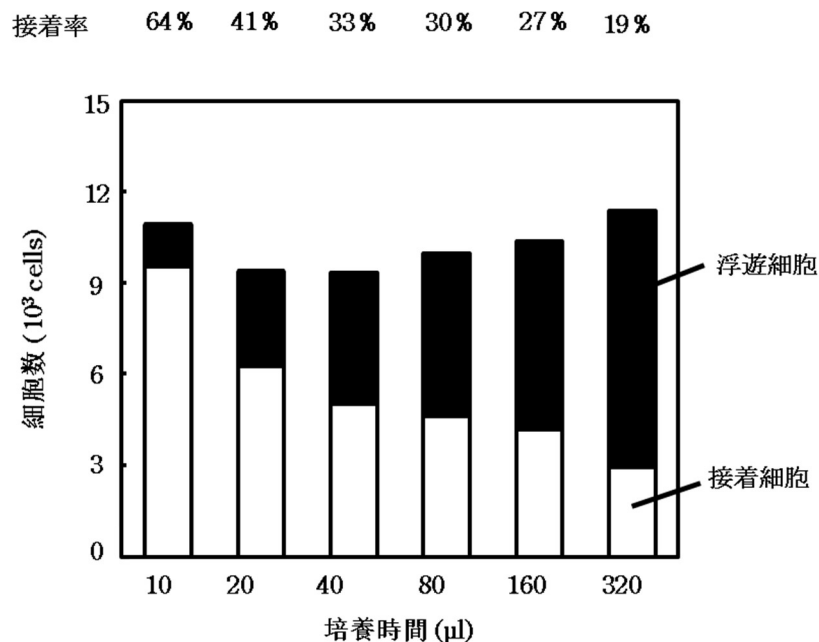


図. 2-2 播種液量が接着細胞数に与える影響 同じ播種密度 (ドナーA、 1.23×10^3 cells/ cm² -NWF) で不織布に細胞を接種し、24 時間インキュベートした後、不織布に接着した細胞数 (白) および浮遊細胞数 (黒) を数え、接着率を算出した。(n=3)

培養を開始した。播種から 8 h 後に培地を 1 ml 加え、さらに 16 h 培養を行った。その後、不織布に接着した細胞と浮遊細胞を各々脱核染色法とトリパンブルー法により計数し、播種細胞数に対する接着効率を算出した。各条件における不織布上への接着細胞数と播種 24 h 後の培地中の浮遊細胞数を図 2-2 に示した。

播種細胞液量が増えると、浮遊細胞の数が増加し、不織布ディスクに接着した細胞の数が減少した (図 2-2)。播種細胞液量が小さいほど接着効率が高く、播種細胞液量 10 μ l で、接着効率は試験した中で最大 64% に達した。

不織布ディスクの空隙体積の計算値は 11.57 μ l であった。つまり、播種細胞液量は不織布ディスクの空隙体積に近い時、最大の接着効率を得られた。この原因は、播種液量が空隙体積より小さい時、播種した細胞懸濁液が全て毛細管作用により不織布繊維間の隙間に吸い込まれたからだと考えられた。細胞懸濁液は 10 μ l を超えると、過剰な細胞懸濁液が不織布ディスク中に入らず、不織布ディスクに接着できないが、過剰な懸濁液中の細胞はウェルが非接着性のため、ウェル底面にも接着できなかったと考えられた。

したがって、播種細胞懸濁液量 10 μ l をその後の実験に用いることとした。

2-3-2. 播種細胞密度が増殖倍率に与える影響

次に、播種時の細胞密度が細胞の増殖倍率に与える影響について検討した。播種細胞液量を 2-3-1 で得られた 10 μ l と一定にし、播種液中細胞濃度を変えることにより、播種細胞密度 (MSC ドナーA) を 0.15、0.31、0.61、1.22、2.45、 4.9×10^3 cells/cm²-NWF と種々に変えて約 40 日間培養し、得られる増殖倍率

を調べた。培地交換は 7 日毎に行った。脱核染色法により求めた不織布への接着細胞密度を図 2-3 に示した。

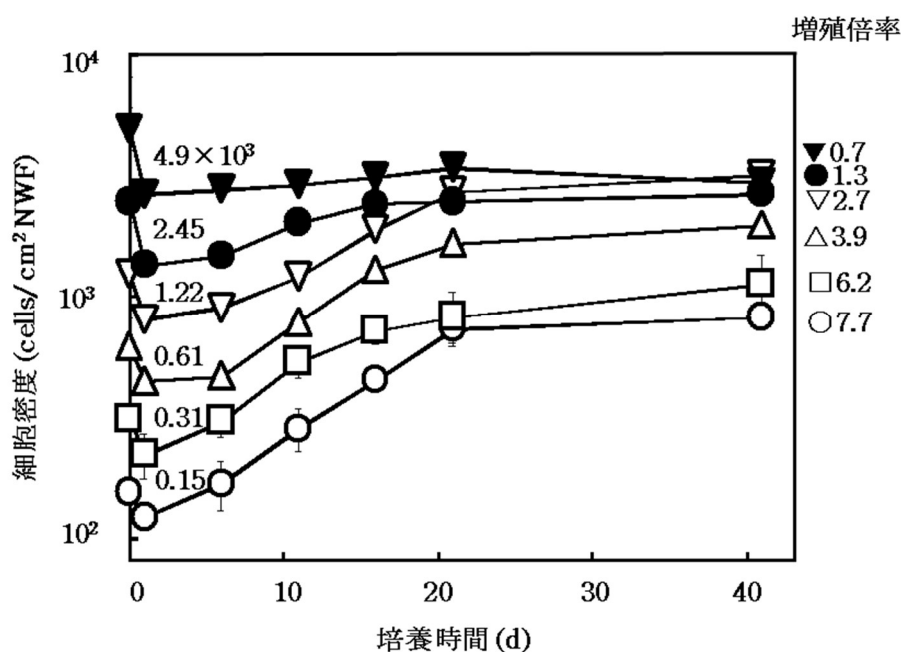


図 2-3 MSC の播種細胞密度が増殖倍率に与える影響 播種細胞密度 (MSC ドナーA)を 0.15 (白丸)、0.31 (白四角)、0.61 (白三角)、1.22 (白逆三角形)、2.45 (黒丸)、4.9 (黒逆三角形) $\times 10^3$ cells/ cm^2 -NWF と種々に変えて細胞を播種し、約 40 日間培養した。それぞれの増殖倍率も計算した。(n = 3、平均値 $\pm$ SD)

図 2-3 より播種細胞密度を 4.9×10^3 cells/ cm^2 -NWF から 2.45、 1.22×10^3 cells/ cm^2 -NWF と下げても、増殖の結果、ほぼ同一な細胞密度(約 3.3×10^3

cells/cm²-NWF)に到達し、最大増殖倍率は 2.7 倍だった。さらに、播種細胞密度をそれぞれ 0.61、0.31、0.15×10³ cells/cm²-NWF と下げた場合は、到達細胞密度は 2.43、1.93、1.18×10³ cells/cm²-NWF に下がった。しかし、増殖倍率は3.9、6.2、7.7 倍と上がった。これら6条件の中では、播種細胞密度が0.15×10³ cells/cm²-NWF の条件で、最も高い増殖倍率(約 7.7 倍)を示した (図 2-3)。

全ての条件で到達細胞密度が 3.3×10³ cells/ cm²-NWF を越えなかったので、3.3×10³ cells/ cm² -NWF が接触阻害を示しているコンフルエント細胞密度と考えた(図 2-3)。播種密度が 1.22 ×10³cells/ cm² -NWF 以下の場合には到達細胞密度も下がり、最大の増殖倍率は 7.7 倍しかなかった。この倍率は大量培養の観点から非常に低い値である。その原因として、10 μl の細胞懸濁液を不織布に播種する播種法では、液量が少ないことから不織布内での細胞の分散が不均一なことが推測された (図 2-4)。

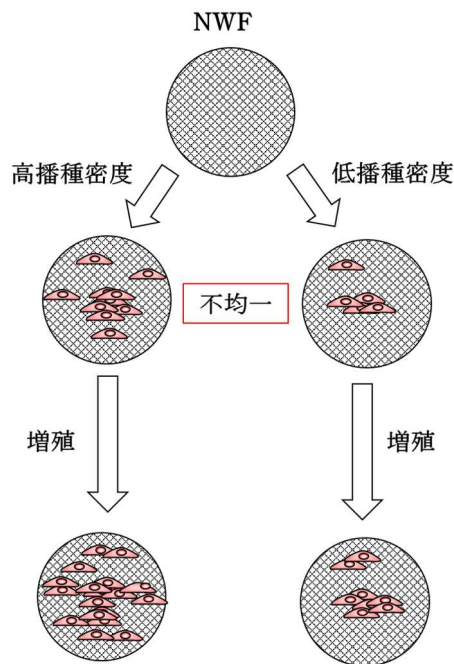


図 2-4 不織布ディスク内の細胞分布の推測

すなわち、細胞が不均一的に播種されると、不織布上の全ての繊維表面において細胞増殖することができないからである。言いかえると、不織布繊維表面の一部でのみしかコンフルエントに達しなかったから、不織布全体として到達細胞密度が高くならなかったと考えた。

次にこの考えを確かめるために、不織布において播種した細胞の分布を調べてみた。

2-3-3. 不織布に播種した細胞の分布

不織布全体として到達細胞密度が高くなり、増殖倍率が低かった要因のひとつが不織布に播種した細胞の不均一分布であることを明らかにするために、GFPを発現しているラットのMSC (GFP-MSC)を利用して不織布内の細胞分布を調べた。

24 ウェルプレートに不織布を1枚入れた後、播種密度が $0.61 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ -NWF となるように不織布ディスクの中心に 10 μl の細胞懸濁液を滴下した。その直後、蛍光顕微鏡で不織布の中心部 (A)と周辺部(B, C)3ヶ所の蛍光写真を撮った(図 2-5)。その結果、3ヶ所とも蛍光ドットは一定密度認められたが、明らかに、BとCに比べてAのドットの密度が高かった。すなわち、細胞が不織布の中心部 (A)に高密度に集まり、周辺部の密度が低いと考えられた。このことから、不織布において播種し、接着した細胞の分布は不均一であることが確認された。この原因は、10 μl の細胞懸濁液を不織布ディスクの中心に播種すると、その液が毛細管作用により移動するが、不織布の空隙構造は曲がる多岐の毛細管のように見えるので、形がある細胞は不織布内を移動することに抵抗があり、

細胞の動く速度は培地液より遅く、不織布内での細胞の分布が不均一になったためであると考えられた。

そこで、次は細胞を均一的に播種可能な工夫をすることにより、増殖倍率を上げること検討した。

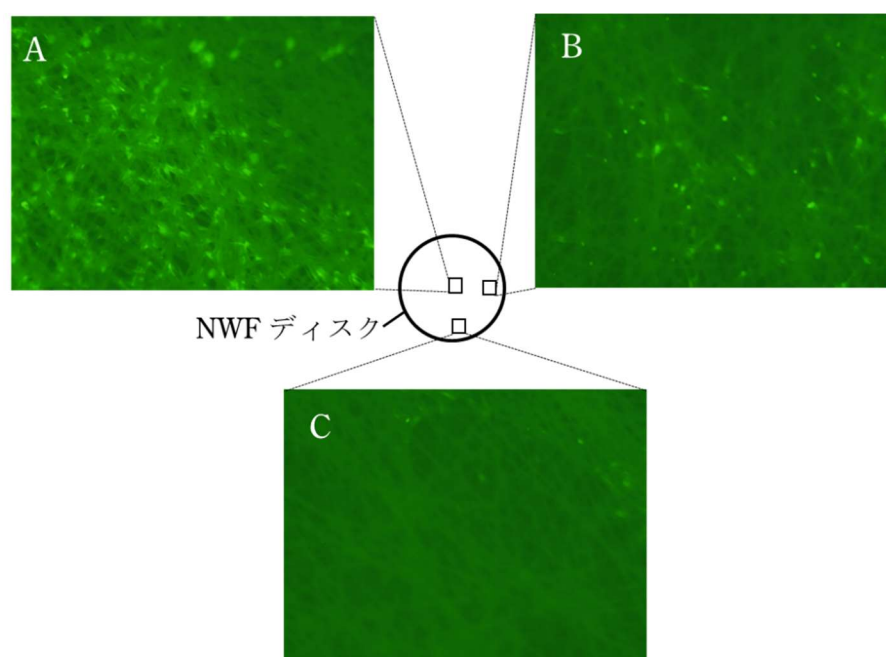


図 2-5 不織布ディスク中の細胞分布 不織布ディスクの中心に 10 μ l の細胞懸濁液を滴下した。その直後、蛍光顕微鏡で不織布の中心部 (A)と周辺部(B, C)3ヶ所を蛍光顕微鏡で観察し、写真を撮った。

2-3-4. 不織布内での細胞分布をより均一にする試み

播種直後の不織布中での細胞分布がより均一であれば、MSC 増殖倍率も上がると仮定して、播種方法の工夫を 3 つ検討した。①不織布ディスクの中心に MSC (ドナーB)を $0.61 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2\text{-NWF}$ となるように 10 μ l 細胞懸濁液を

播種した。播種 1 h 後、さらに 10 μ l の培地を不織布ディスクの中心部に追加
添加し、追加した培地の流動により、中心部に集まる細胞が周辺部に移動さ
れ、より均一化することを期待した。②10 μ l の細胞懸濁液を 5 μ l $\times$ 2 に分け、
不織布の異なる 2 箇所 (直径の三等分点)に播種し(播種密度： 0.61×10^3
cells/cm²-NWF)、細胞の分布を広げることを期待した (分散播種)。③不織布デ
ィスクの中心に MSC を 0.61×10^3 cells/cm²-NWF となるように 10 μ l 細胞懸濁
液を播種した。播種後、不織布を入れた 24 ウェルプレート を、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂
インキュベーターに入れた振動機に設置し、20 min 振動培養した (振動速度：
250 spm、振幅：40 mm)。振動により、細胞分布が均一化されることを期待
した。また、コントロールとして、播種密度が 1.22×10^3 cells/cm²-NWF (ポジ
ティブコントロール)と 0.61×10^3 cells/cm²-NWF (ネガティブコントロール)に
なるように 10 μ l の MSC 細胞懸濁液を不織布に播種した。全ての条件で処理
した不織布を 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で培養した。播種から 8 h 後に全ての不織布に
培地を 1 ml 加え、さらに 21 日間培養した。培地交換は 7 日毎に行った。脱核
染色法で求めた不織布接着細胞密度を図 2-6 に示した。

その結果、全ての条件で 14 日以降、細胞増殖が見られなかった。ポジティブ
とネガティブコントロールは 2.3.2 の結果と同じく、播種密度が 1.22×10^3
cells/cm²-NWF (図 2-6 open circles)から 0.61×10^3 cells/cm²-NWF (図 2-6
closed circles)に下げると、到達細胞密度は 3.34×10^3 cells/cm²-NWF から
 2.96×10^3 cells/cm²-NWF へ低下した。播種した 1 h 後に培地 10 μ l を追加する
と (図 2-6 closed triangles)、到達細胞密度は有意に高くなり、 4.25×10^3
cells/cm²-NWF になった。それに対して、振動培養 (図 2-6 open squares)の到

達細胞密度は 3.13×10^3 cells/cm²-NWF であり、ネガティブコントロールと有意差がなかった。分散播種 (図 2-6 open triangles) の到達細胞密度は 2.35×10^3 cells/cm²-NWF に低下し、ネガティブコントロールと比べても低い値だった。

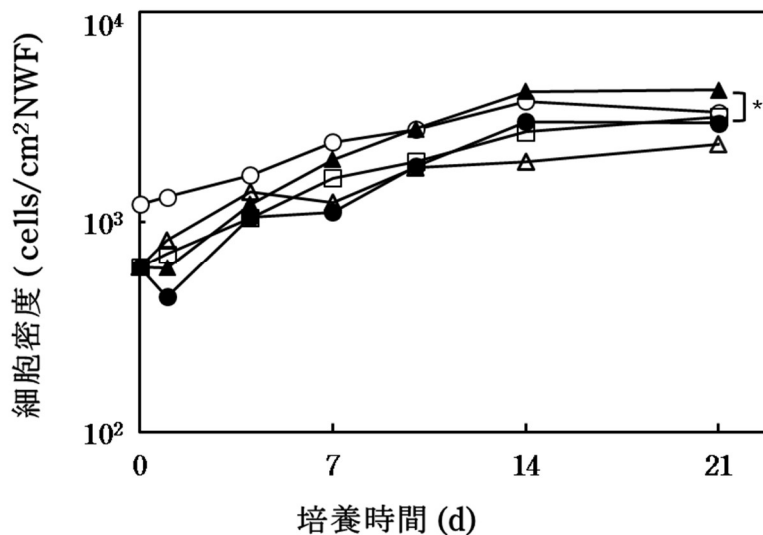


図 2-6 MSC の播種方法の増殖への影響 MSC (ドナーB) を各播種方法で播種密度が 0.61×10^3 cells/cm²-NWF (培地追加添加：黒三角、分散接種：白三角、振動培養：白四角、ネガティブコントロール：黒丸) および 1.22 (ポジティブコントロール：白丸) cells/cm²-NWF となるように不織布ディスクの中心に 10 μ l の細胞懸濁液を播種した。(n = 3、平均値 $\pm$ SD、* p < 0.05)

このように、振動培養と分散播種では期待した効果は認められなかった。その原因としては、分散播種の場合は、5 μ l 細胞懸濁液を 2 箇所に分けて播種するので、培地が不織布の全体に移動する時間は逆に半分になり、液流によって動く細胞の移動範囲が減少することが考えられた。また、GFP-MS C を利用し

て振動培養の条件での細胞分布を確認すると、振動速度が 250 spm、振幅が 40 mm の場合は細胞が全く動かないことがわかった (データ示さず)。

他方、培地追加添加により、到達細胞密度が上がることを示された。そこで、培地の追加添加によって細胞の分布が実際に均一化しているのかを確かめてみることにした。

2-3-5. 培地追加添加が不織布中の細胞分布に与える影響

播種した直後に培地を追加添加することにより、培地の流動によって細胞が移動したかどうか、また、それにより細胞の不織布中での分布が均一化したかどうかを、GFP 組み換え MSC (GFP-MSC) を用いて調べてみることにした。

24 ウェルプレートに 1 ウェルずつに不織布ディスクを 1 枚入れた。不織布ディスクの中心に GFP-MSC を 0.61×10^3 cells/cm²-NWF となるように 10 μ l 細胞懸濁液播種した。その直後 (2~3 min 後)、1 h 後のいずれかの時間に、不織布の中心に培地 10 μ l を追加した。そして、各時点で、蛍光顕微鏡で培地追加前後の ABC [図 2-7 (1)] 3 ヶ所の蛍光画像を蛍光顕微鏡で観察し、写真を撮った [図 2-7 (2)]。次に、この写真内の蛍光ドットで示された細胞数及び 3 ヶ所 (A, B, C) 間の細胞数の標準偏差 (SD) を計算した [図 2-7 (3)]。

图 2-7 (1)

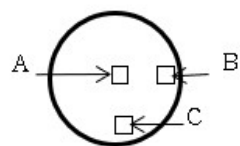


图 2-7 (2)

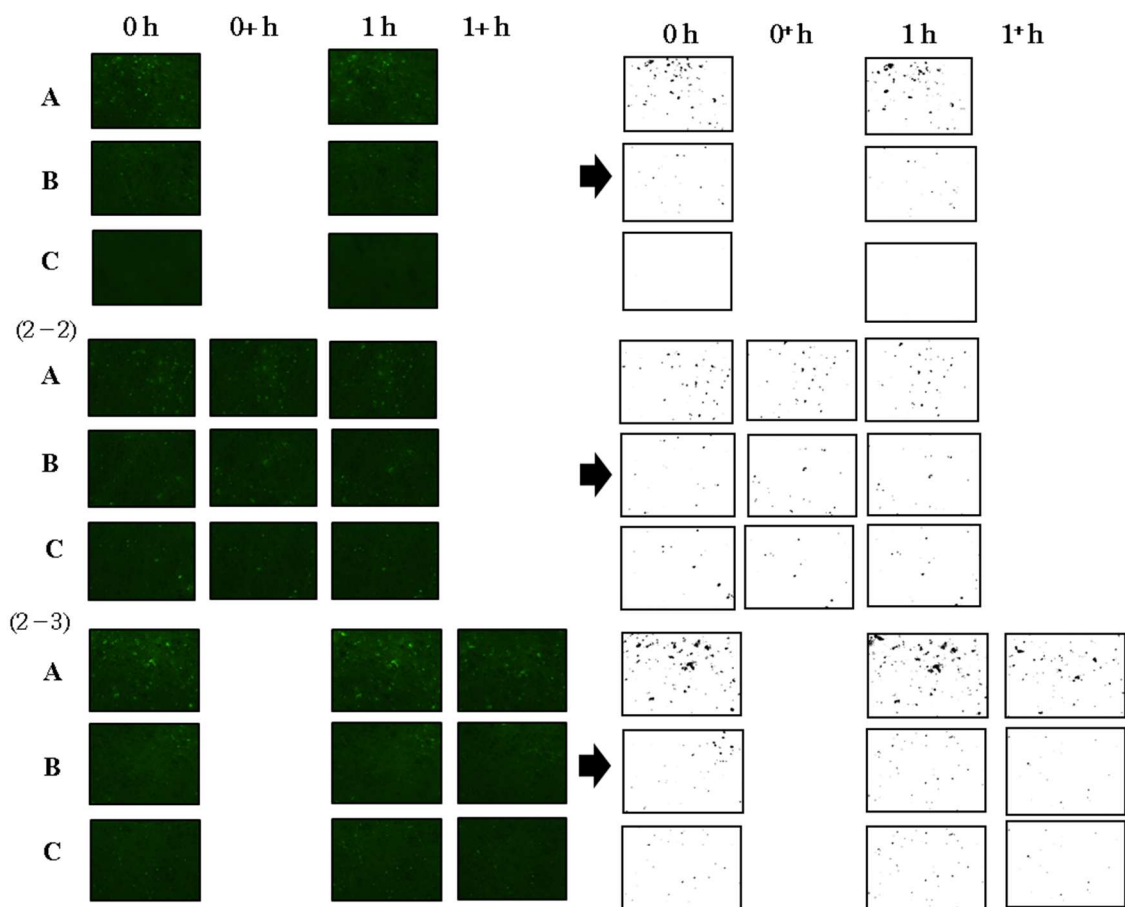


図 2-7 (3)

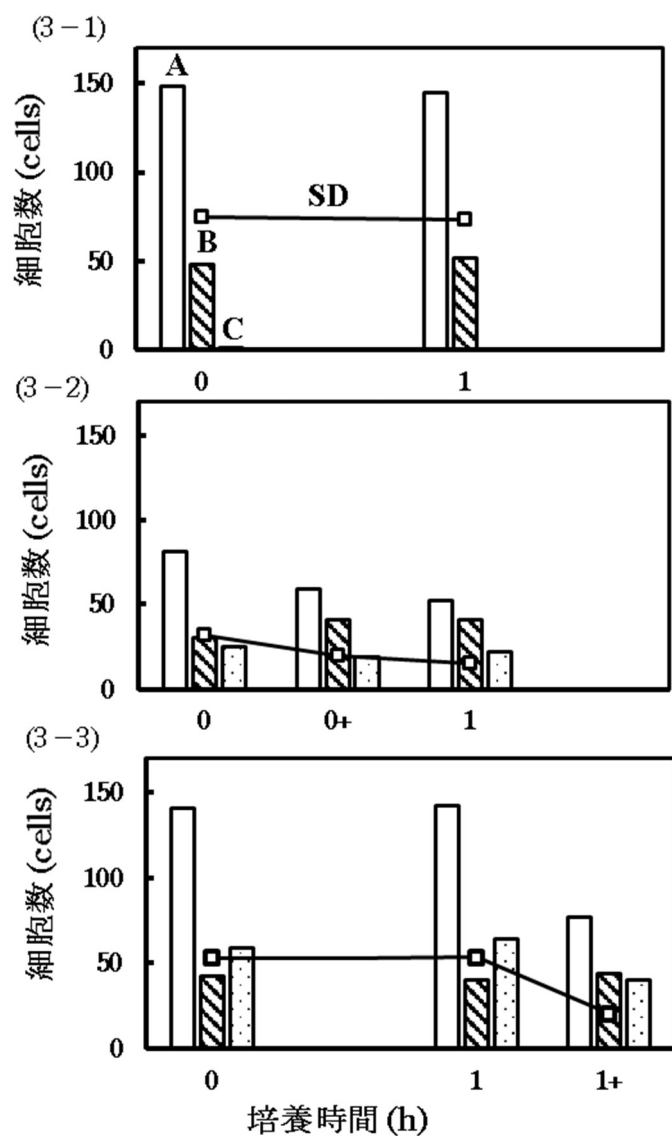


図 2-7 培地追加添加が不織布中の細胞分布に与える影響 不織布ディスクの中心に GFP-MSC を 0.61×10^3 cells/cm²-NWF となるように 10 μ l の細胞懸濁液を播種した。その直後 (2~3 min 後)、1 h 後のいずれかの時間に、不織布の中心に培地 10 μ l を追加した。各時点で、不織布ディスク (1) の中心部 (A) と周辺部 2 ヶ所 (B、C) 合計 3 ヶ所の蛍光画像を蛍光顕微鏡で観察し、写真を撮った。(2-1) は、培地を追加せず、0 時間と 1 時間での A、B、C の写真であ

る。(2-2) と (2-3) は播種後 0 時間及び 1 時間後、培地を追加添加前後の A、B、C の 3 ヶ所の写真である。写真内の蛍光ドットで示された細胞数及び 3 ヶ所 (A, B, C)間の細胞の数の標準偏差 (SD)を計算した (3-1)、(3-2)、(3-3)。

培地を追加添加しない条件において、1 h 後も、ABC の 3 ヶ所の細胞の分布は変わりなかった[図 2-7 (2-1), (3-1)]。それに対して、播種直後あるいは 1 h 後、培地追加添加すると、A のところの細胞量が減って、B が増えており、細胞の分布が広がる様子が観察された[図 2-7 (2-2), (2-3)]。さらに、ABC 3 ヶ所の写真で蛍光ドットにより細胞数を測定し、ABC 3 ヶ所間の細胞数のばらつきを標準偏差 SD を指標として示した。培地追加添加しない場合はばらつき (SD)は時間により変わらなかったが[図 2-7 (3-1)]、0 h 後や 1 h 後に培地添加した場合では添加後、SD が減少したことが認められた[図 2-7 (3-2), (3-3)]。これらのことから、培地追加添加により、播種直後に中心に集まった細胞が外周部へ移動し、不織布内の細胞分布がより均一化された可能性が考えられた。

2-3-6.培地追加添加時間の検討

前節の培地追加添加は播種密度が $0.61 \text{ cells/cm}^2\text{-NWF}$ での結果であるので、播種密度をさらに $0.15 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2\text{-NWF}$ に下げた条件で、細胞分布を均一化して到達細胞密度が高くなる最適な追加添加の時間を検討した。

$0.15 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2\text{-NWF}$ になるように $10 \mu\text{l}$ の MSC 懸濁液 (ドナーB)をウェル中の不織布に播種した。0、1 又は 2 h 後、 $10 \mu\text{l}$ の培地を不織布の中心に

追加し、37°C、5%CO₂ 下で培養した。さらに、コントロールとして培地を追加添加せず、 1.22×10^3 cells/cm²-NWF と 0.15×10^3 cells/cm²-NWF の播種密度で不織布の中心部に播種した。播種から 8 h 後に全ての不織布に培地を 1 ml 加え、さらに 28 日培養した。培地交換は 7 日毎に行った。7 日毎に脱核染色法により求めた不織布上の培養細胞密度の経時変化を図 2-8 に示した。

培地を追加添加せず、播種密度が 1.22×10^3 cells/cm²-NWF (図 2-8 open circles) から 0.15×10^3 cells/cm²-NWF (図 2-8 open squares) に下げると、到達細胞密度は 5.11×10^3 cells/cm²-NWF から 2.48×10^3 cells/cm²-NWF へと低下してしまった。

一方、0 (open triangles)、1 (open inverted triangles)、2 h (closed triangles) のいずれかの時間後に培地を追加添加すると、どの添加時間でも、到達細胞密度は 6.03、7.45、 4.65×10^3 cells/cm²-NWF となり、増殖倍率も上がることが分かった。培養終了時で、この追加添加した 3 条件の中で増殖倍率が最も高かったのは 1 h 後培地を追加した条件であり、約 48 倍になった。

播種密度をさらに下げると、培地追加添加の効果はより顕著に表れた。今回播種密度は 0.15×10^3 cells/cm²-NWF の場合、増殖倍率は 16 倍から 48 倍まで上がった。一方、一般的には MSC は播種約 8 h 後までに接着すると言われている。そのため、0, 1, 2 h の追加添加時間では細胞がまだ接着していなくて、動ける状態なので、増殖倍率に差がなかったと考えられた。

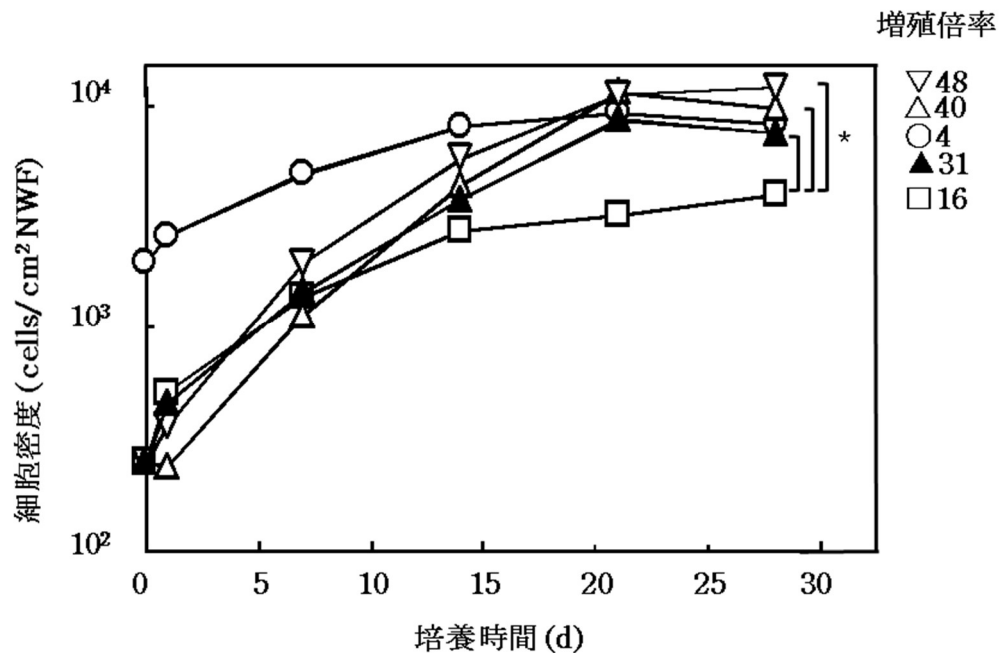


図 2-8 培地追加添加時間の MSC 増殖への影響 MSC (ドナーB) を播種密度が 0.15×10^3 cells/cm²-NWF (培地追加添加：白三角、黒三角、白逆三角形、ネガティブコントロール：白四角) および 1.22 (ポジティブコントロール：白丸) cells/cm²-NWF となるように不織布ディスクの中心に 10 μ l の細胞懸濁液を播種した。その後、0 時間後 (白三角)、1 時間後 (白逆三角形)、および 2 時間後 (黒三角) 10 μ l の培地を追加添加した。(* $p < 0.05$)。

2-3-7. SEM 観察

1 h 後培地追加の条件で培養した MSC の分布を観察するために、SEM 観察した。その条件で不織布に MSC (ドナーB、播種細胞密度： 0.15×10^3 cells/cm²-NWF) を播種し、21 日培養した後、2-2-5-3 に述べたように臨界点乾

乾燥装置を用いて不織布を乾燥し、白金で蒸着処理した。サンプルを電子顕微鏡のステージに載せて観察した結果を図 2-9 に示した。

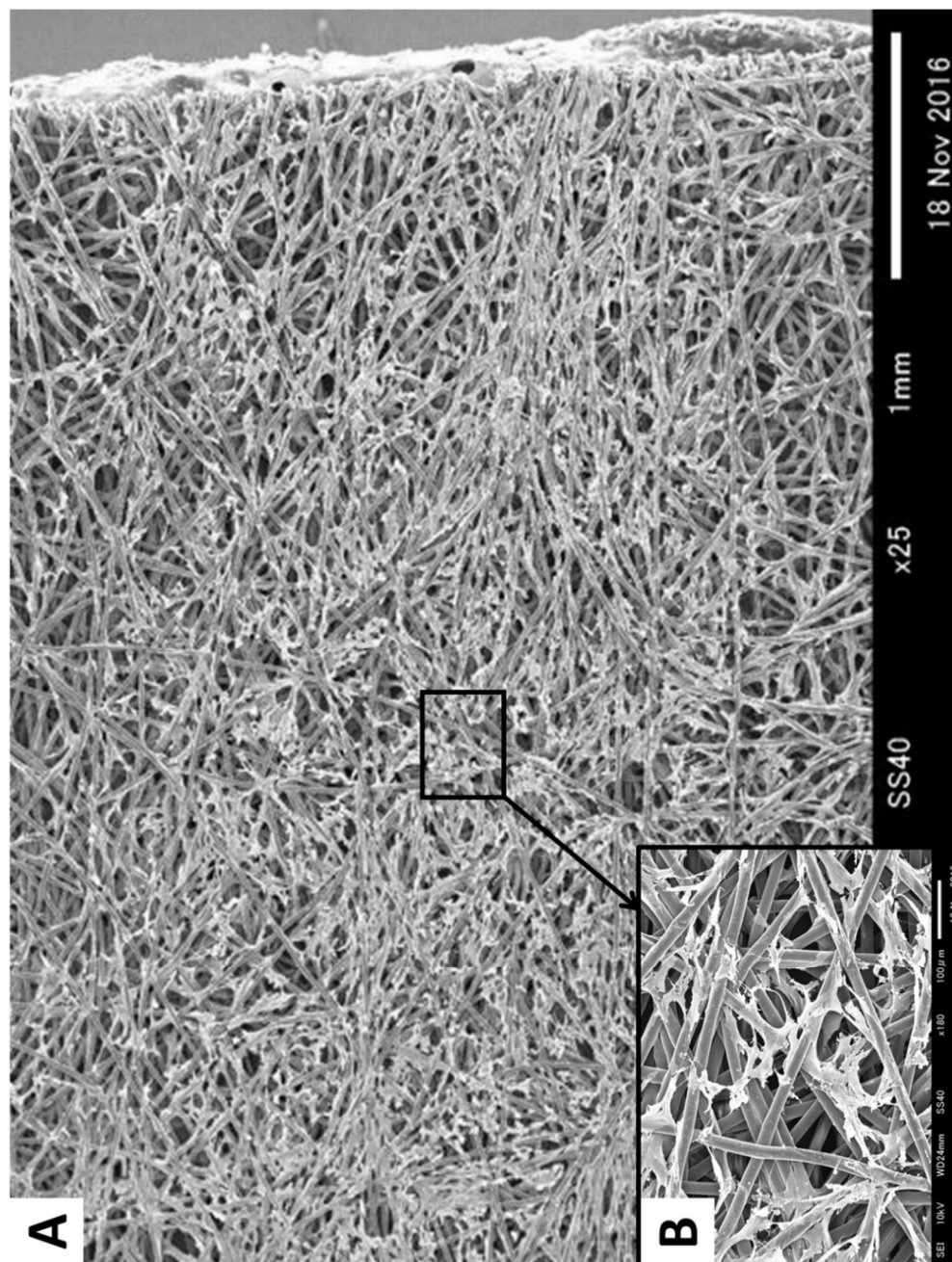


図 2-9 不織布で 21 日増殖培養した MSC の SEM 写真 不織布に MSC(ドナーB、播種細胞密度： 0.15×10^3 cells/cm²-NWF、1 時間後培地追加添加)を播種し、21 日培養した後、電子顕微鏡で観察した。

その結果、不織布の周辺部まで偏りなく細胞が増殖している様子が観察された (図 2-9 A)。ディッシュのような平面培養と異なり、不織布においては、繊維の表面に沿って接着している細胞は少なく、繊維と繊維の間に架橋している細胞が多いことが観察された (図 2-9B)。

2.4. 結言

本章では、不織布を利用して間葉系幹細胞 (MSC) を大量増殖するための第一段階として、MSC を不織布に播種する方法の検討を行った。その結果、MSC の不織布培養において、不織布への播種液量が不織布の空隙体積に近い $10\ \mu\text{L}$ の時に一番高い接着効率が確認された (図 2-2)。播種細胞密度 4.9、2.45、 $1.22 \times 10^3\ \text{cells/cm}^2\text{-NWF}$ で播種すると、ほぼ同じ細胞密度 (約 $3.3 \times 10^3\ \text{cells/cm}^2\text{-NWF}$) に達したことから、 $3.3 \times 10^3\ \text{cells/cm}^2\text{-NWF}$ は接触阻害が生じるコンフルエント密度と考えた (図 2-3)。一方、播種細胞密度を 0.61、0.31、 $0.15 \times 10^3\ \text{cells/cm}^2\text{-NWF}$ に下げると、到達細胞密度も 2.43、1.94、 $1.18 \times 10^3\ \text{cells/cm}^2\text{-NWF}$ と低下した (図 2-3)。その原因については、GFP-MSC を用いた実験結果 (図 2-5) より、不織布に播種した細胞の分布が不均一になり、一部は上記のコンフルエントに達したが、細胞が低い密度のところはコンフルエントに達しなかったから、不織布全体として到達細胞密度が低下したと考えられた。

そこで、ヒト MSC を用いて、細胞を均一化することにより、増殖倍率を上げる検討を行った。 $0.61 \times 10^3\ \text{cells/cm}^2\text{-NWF}$ の播種密度で播種し、1 h 後に培地 $10\ \mu\text{L}$ を追加添加すると、到達細胞密度は培地を追加添加しない条件の $2.98 \times 10^3\ \text{cells/cm}^2\text{-NWF}$ からポジティブコントロール (播種密度： $1.22 \times 10^3\ \text{cells/cm}^2\text{-NWF}$) のコンフルエント密度 (播種密度： $3.34 \times 10^3\ \text{cells/cm}^2\text{-NWF}$) より高い $4.25 \times 10^3\ \text{cells/cm}^2\text{-NWF}$ になった (図 2-6)。

培地を追加添加する効果を確認するために、GFP-MSC を利用して、播種直後や 1 h 後に不織布中心部に培地 $10\ \mu\text{L}$ を追加添加すると、細胞の所在を示す

蛍光ドットが不織布の中心部 A から外周部 (B や C) へ移動し、細胞分布が均一化する傾向が観察された(図 2-7)。

さらに、hMSC を用いて播種密度を $0.15 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2\text{-NWF}$ に下げ、培地を 0, 1, 2 h 後追加し、最適の追加添加時間を検討した。この結果、21 日後、培地追加添加時間に関わらず、ほぼ上記の最大細胞密度に到達した。この中で、1 h 後、培地を 10 μL 追加する条件は最大で約 48 倍の増殖倍率が認められた(図 2-8)。また、この時、細胞は不織布の周辺部まで偏りなく、繊維と繊維の間に架橋しながら、増殖している様子が SEM で観察された(図 2-9)。

以上、不織布への播種細胞懸濁液量を不織布ディスクの空隙体積に近い 10 μL とし、播種 1 h 後に培地 10 μL を追加添加して細胞分布を均一化すると共に、播種密度を $0.15 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2\text{-NWF}$ まで下げることにより、接着効率約 64%及び増殖倍率約 48 倍という成績が得られることを明らかにした。

第 3 章

不織布担体に接着・増殖した
間葉系幹細胞の品質評価

3-1. 緒言

第 2 章で、細胞播種液量が不織布の空隙体積 (約 10 μ L) に近い 10 μ L の時、一番高い 64% の接着率が得られた。また、播種 1 h 後に、少量 (10 μ L) の培地を不織布に追加添加すると、不織布中の細胞分布が均一化され、追加添加のない場合とは異なり、増殖倍率が 48 倍まで上がった。このようにして、不織布において高接着効率と高増殖倍率を得られる播種培養法を明らかにした。しかし、新しい培養法で培養した細胞の品質 (MSC としての特性を維持していること) を評価することは重要である。

そこで、第 3 章では 1-3. で述べた細胞表面抗原マーカーの同定と成熟細胞への分化能を MSC の品質指標として調べることにした。具体的には、不織布を用いて第 2 章の条件で培養した細胞において、細胞表面抗原マーカーのうち、CD90 と CD166 の陽性率を確認することにした。また、その細胞の骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を確認することにした。そして、その陽性率と分化能を従来のディッシュ培養した細胞の場合と比較することにした。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 細胞

3-2-1-1. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC)

ドナーB (65 歳・女性)から採取した骨髄液から 2-2-1-1.に示した方法で取得した。

3-2-1-2. 正常ヒト骨芽細胞

Lonza 社 (Basel, Switzerland)から購入した正常ヒト骨芽細胞 (代数 2 代、CC-3207) を用いた。

3-2-1-3. 正常ヒト前駆脂肪細胞

Lonza 社から購入した正常ヒト前駆脂肪細胞 (皮下脂肪由来、代数 2 代、PT-5020) を用いた。

3-2-1-4. 正常ヒト軟骨細胞

Lonza 社から購入した正常ヒト軟骨細胞 (代数 2 代、CC-2550) を用いた。

3-2-2. 培地

3-2-2-1. 増殖培地

10%FBS 含有 DMEM-LG は 2-2-2.と同様に作製した。

3-2-2-2. 骨分化培地

MSC の骨分化培養には、以下の骨分化培地を用いた。10.0 g/l DMEM-LG (31600-034, Invitrogen)、3.7 g/l NaHCO₃ (191-01305, Wako)、10 ml/l ペニシリン・ストレプトマイシン (P7539, Sigma)、55.6 μM L-アスコルビン酸リン

酸エステルマグネシウム塩(013-12061, Wako)、11.1 mM グリセロール 2-リン酸二ナトリウム (G9891, Sigma)、0.11 μ M デキサメタゾン (194561, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) となるように超純水 (W3500, Sigma) で 900 ml にメスアップした培地を濾過フィルター (595-4520, Nalgene) で減圧濾過滅菌した。その後、ウシ胎児血清 (FBS) (26140-079, Gibco) を 100 ml 加えた。培地の組成を Table 3-1 に示した。

Table 3-1. Composition of osteogenic differentiation medium for MSC

Component	Content
DMEM-LG (31600-034, Invitrogen)	9 g/l
NaHCO ₃ (191-01305, Wako)	3.33 g/l
Penicillin/Streptomycin (P7539, Sigma)	9 ml/l
L-Ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate (013-12061, Wako)	14.5 mg/l
Glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate (G9891, Sigma)	2.16 g/l
Dexamethasone (194561, MP Biomedicals)	39 μ g/l
Fetal bovine serum (26140-079, Gibco)	100 ml/l

3-2-2-3. 脂肪分化培地

MSC の脂肪分化には、以下の脂肪分化培地を用いた。10.0 g/l DMEM-LG (31600-034, Invitrogen) 、 3.7 g/l NaHCO₃ (191-01305, Wako) 、 10 ml/l ペニシリン・ストレプトマイシン (P7539, Sigma) 、 168 μ M インドメタシン (093-02473, Wako) 、 0.55 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (I5879, Sigma) 、 11 μ g/ml インスリン (090-03446, Wako) 、 1.1 μ M デキサメタゾン (194561,

MP Biomedicals) となるように超純水 (W3500, Sigma) 900 ml にメスアップした培地を濾過フィルターで減圧濾過滅菌した。その後、ウシ胎児血清 (FBS) (26140-079, Gibco) を 100 ml 加えた。培地の組成を Table 3-2 に示した。

Table 3-2. Composition of adipogenic differentiation medium for MSC

Component	Content
DMEM-LG (31600-034, Invitrogen)	9 g/l
NaHCO ₃ (191-01305, Wako)	3.33 g/l
Penicillin/Streptomycin (P7539, Sigma)	9 ml/l
Indomethacin (093-02473, Wako)	54 mg/l
3-Isobutyl-1-methylxanthine (I5879, Sigma)	0.11 mg/l
Human recombinant insulin (090-03446, Wako)	10 mg/l
Dexamethasone (194561, MP Biomedicals)	0.39 mg/l
Fetal bovine serum (26140-079, Gibco)	100 ml/l

3-2-2-4. 軟骨分化培地

MSC の軟骨分化培養には、以下の軟骨分化培地を用いた。9.2 g/l DMEM-LG (31600-034, Invitrogen)、1.75 g/l グルコース (041-00595, Wako)、3.52 g/l NaHCO₃ (191-01305, Wako)、9 ml/l ペニシリン・ストレプトマイシン (P7539, Sigma)、25 mg/l アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩 (013-12061, Wako)、50 mg/l ピルビン酸ナトリウム塩 (298-06, ナカライテスク)、20 mg/l プロリン (194728, MP Biomedicals)、19.5 µg/l デキサメタゾン (194561, MP Biomedicals) となるように超純水 (W3500, Sigma) 900 ml にメスアップした培地を濾過フィルター (595-4520, Nalgene) で減圧濾過滅菌した。その後、5 ml/l ITSTTM+Premix (6.25 µg/ml インスリン, 6.25 µg/ml トランスフェリン, 6.25

ng/ml 亜セレン酸, 1.25 mg/ml ウシ血清アルブミン, 5.35 µg/ml リノール酸)
(354352, BD Biosciences) 、 5 µg/l TGF- β 3 (243-B3, R&D Systems,
Minneapolis, MN, USA) 、 50 µg/l IGF- I (100-11, PeproTech, Rocky Hill,
NJ, USA) を加えた。培地の組成を Table 3-3 に示した。

Table 3-3. Composition of chondrogenic differentiation medium for MSC

Component	Content
DMEM-LG (31600-034, Invitrogen)	9.2 g/l
Glucose (041-00595, Wako)	1.75 g/l
NaHCO ₃ (191-01305, Wako)	3.52 g/l
Penicillin/Streptomycin (P7539, Sigma)	9 ml/l
L-Ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate (013-12061, Wako)	25 mg/l
Pyruvic acid sodium salt (298-06, Nacalai tesgue)	50 mg/l
L-Proline (194728, MP Biomedicals)	20 mg/l
Dexamethasone (194561, MP Biomedicals)	19.5 µg/l
ITS™ + Premix (354352, BD Biosciences)	5 ml/l
Transforming growth factor -β3 (243-B3, R&D Systems)	5 µg/l
Insuline-like growth factor - I (100-11, Peprotech)	50 µg/l

3-2-2-5. 正常ヒト骨芽細胞用培地

正常ヒト骨芽細胞培養には、Lonza 社から購入したブレットキット OGM
(CC-3207) を用いた。

3-2-2-6. 正常ヒト前駆脂肪細胞用培地

正常ヒト前駆脂肪細胞培養には、以下の正常ヒト前駆脂肪細胞用培地を用い

た。Lonza 社から購入したブレットキット PBM-2 (PT-8202) に 10%ウシ胎児血清 (FBS) (26140-079, Gibco)、9 ml/l ペニシリン・ストレプトマイシン (P7539, Sigma)、584 g/l L-グルタミン (194678, MP Biomedicals Inc) となるように添加した。培地の組成を Table 3-4 に示した。

Table 3-4. Composition of chondrogenic growth medium

Component	Content
PBM-2 (PT-8202)	891 ml/l
Glutamine (194678, MP Biomedicals Inc)	584 g/l
Penicillin/Streptomycin (P7539, Sigma)	9 ml/l
Fetal bovine serum (26140-079, Gibco)	100 ml/l

3-2-2-7. 正常ヒト軟骨細胞用培地

正常ヒト軟骨細胞には Lonza 社から購入したブレットキット CGM (CC-3216) を用いた。

3-2-3. 培養方法

3-2-3-1. MSC ディッシュ増殖培養

MSC 増殖用培地 10 ml を用いてアンプル内の保存細胞を、播種細胞密度が 1.5×10^3 cells/cm² となるように 100 φ ディッシュ (430167, Corning) に播種し、37°C、5%CO₂ 雰囲気下でプレコンフルエントになるまで前培養を行った。

前培養した 100 φ ディッシュの細胞がプレコンフルエント到達後、トリプシン-EDTA (T3924, Sigma) を用いて細胞を剥がし、播種細胞密度が 0.1×10^3 cells/cm² となるように 100 φ ディッシュに播種し、培養した。

3-2-3-2. MSC 不織布増殖培養

不織布培養には、浮遊培養用 24 ウェルプレート (MS-8024R, 住友ベークライト) を用いた。3-2-3-1 にて前培養した 100 φ ディッシュ内の細胞がプレコンフルエントに到達した後、あらかじめ 2-2-3-2. で用意しておいた不織布に増殖用培地を用いて $0.15 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ -NWF となるように不織布に 10 μl の細胞懸濁液不織布で播種し、37°C、5%CO₂ 雰囲気下で培養した。播種 1 h 後に NWF 中心に培地 10 μl を追加添加し、さらに 7 h 後、浮遊培養用プレートのウェル内に増殖用培地を 1 ml 加え 21 日培養した。培地を 7 日ごとに新しいものと交換した。

3-2-3-3. MSC の剥離

ディッシュに接着した細胞の剥離についても同じトリプシン・EDTA を使用した。プレコンフルエントに到達したことを確認後、PBS(－) 10 ml を用いて洗浄し、トリプシン・EDTA を 1 ml 加え、5%CO₂、37°C インキュベーター内で 10 min 間静置した。その後、MSC 増殖用培地 3 ml を加えてトリプシンを失活させた後、5 ml ピペットを用いて細胞を懸濁させ、最後に細胞懸濁液を全量回収した。

不織布に接着した細胞の剥離にもトリプシン・EDTA を用いた。細胞を増殖させた不織布を火炎滅菌したピンセットを用いて、同条件で培養した 24 ウェルプレート 1 枚分の不織布 24 枚を 100 φ ディッシュに移し、さらに 20 ml の PBS(－)を加え、合計 3 回洗浄した。その後 PBS(－)を全量抜き取り、トリプシン・EDTA を 5 ml 加えて、5%CO₂、37°C インキュベーター内で 10 min 間静置した。その後、100 φ ディッシュ内に MSC 増殖用培地 (Table 2-1) 15 ml を

加えてトリプシン反応を失活させた後、5 ml ピペットを用いて細胞を懸濁させ、最後に細胞懸濁液を全量回収した。

3-2-4. フローサイトメーターによる MSC 表面抗原解析

CD90 と CD166 陽性率は、フローサイトメトリーで測定した。抗体は 1% BSA が含む PBS を用いて希釈した。不織布とディッシュのそれぞれから回収した細胞懸濁液を細胞濃度 1×10^6 cells/ml、液量約 1 ml になるように調整した後、1.5 ml エッペンチューブ 2 本に分けた。NWF とディッシュから回収した細胞懸濁液に各々に対して、1 次抗体としてマウス抗ヒト CD90 IgG1 抗体 (CBL415, Sigma)、2 次抗体として FITC 標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体 (AP124F, Sigma) を用いて、0°C で 45 min 間反応させ、細胞を染色した。さらに、各細胞懸濁液にマウス IgG1 (0107-01, Beckman Coulter) を加えて 0°C で 45 min 間ブロックした。次は、PE 標識マウス抗ヒト CD166 IgG1 抗体 (A22361, Beckman Coulter) を用いて細胞に 0°C で 45 min 間二重染色した。免疫染色した細胞をフローサイトメーター (EPICS XL, Beckman Coulter) を用いて、FITC と PE の励起波長である 488 nm のレーザー光で分析した。ここでは、CD90 用のアイソタイプコントロールとしてマウス IgG1 (IM0571, Beckman Coulter)、及び CD166 用のアイソタイプコントロールとして PE 標識マウス IgG1 (A07796, Beckman Coulter) を使用した。

3-2-5. 間葉系幹細胞の多分化能評価

3-2-5-1. 骨分化誘導と評価

3-2-5-1-1. 骨分化誘導

不織布又はディッシュから剥離した細胞を 24 ウェルプレートに播種密度 1.5×10^3 cells/cm² になるように細胞懸濁液を播種した後、5%CO₂、37°C インキュベーターで培養し、コンフルエントまで増殖させた。この時、MSC 増殖用培地 (Table 2-1) を使用した。コンフルエントまで増殖したら、骨分化培地 (Table 3-1) に交換し 14 日間培養した。この間、3 日毎に軟骨分化培地を培地交換した。コントロールとして正常ヒト骨芽細胞 (CC-2538, Lonza) を用いた。この細胞のアンブルを開封し、24 ウェルプレートに播種密度 1.5×10^3 cells/cm² になるように播種し、5% CO₂、37°C インキュベーターで培養し、コンフルエントまで増殖させた。この時、ブレットキット OGM (CC-3207, Lonza) 培地 を使用した。コンフルエントまで増殖したら、骨分化培地 (Table 3-1) に交換し 14 日間培養した。この間、3 日毎に骨分化培地を培地交換した。

3-2-5-1-2. アリザリンレッド S 染色

1%アリザリンレッド S (011-01192, Wako) 溶液を調製し、0.025%水酸化アンモニウムを用いて pH を 5.1 に調整した。5.6.2.1 のサンプルの培地を除去し、PBS(－)で 3 回洗浄した。95%エタノール (17065-0382, JUNSEI) を加え、室温で 30 min 固定した。エタノールを除去し、PBS(－)で 2 回洗浄した。1%アリザリンレッド S 溶液で 5 min 染色させた。次に、1%アリザリンレッド S を吸引除去した、蒸留水で水が完全に透明になるまで洗浄した後、顕微鏡で観察した。

3-2-5-2. 脂肪分化誘導と評価

3-2-5-2-1. 脂肪分化誘導

不織布又はディッシュから剥離した細胞を 24 ウェルプレートに播種密度 1.5×10^3 cells/cm² になるように細胞懸濁液を加え、5%CO₂、37°C インキュベーターに入れ、コンフルエントまで増殖させた。この時、MSC 増殖用培地 (Table 2-1) を使用した。

コンフルエントまで増殖したら、脂肪分化培地 (Table 3-2) に交換し 14 日間培養した。この間、3 日毎に軟骨分化培地を培地交換した。

コントロールとして正常ヒト前駆脂肪細胞 (PT-5020, Lonza) を用いた。この細胞のアンブルを開封し、24 ウェルプレートに播種密度 1.5×10^3 cells/cm² になるように播種し、5%CO₂、37°C インキュベーターに入れ、コンフルエントまで増殖させた。この時、正常ヒト前駆脂肪細胞用培地 (Table 3-4) を使用した。コンフルエントまで増殖したら、脂肪分化培地 (Table 3-2) に交換し 14 日間培養した。3 日毎に脂肪分化培地を培地交換した。

3-2-5-2-2. Oil red O 染色

Oil red O (154-02072, Wako) 原液を 6 : 4 の割合で蒸留水とよく混合し、室温で 1 h 静置した後、シリンジフィルター (SLGP033RS, Sigma) で濾過した。5.6.3.1 のサンプルの培地を除去し、PBS(－)で 3 回洗浄した。4%PFA/PBS を加え、室温で 30 min 固定した。PFA を除去し、PBS(－)で 2 回洗浄した。濾過した Oil red O を加えた後、室温で 15 min 静置して染色させた。次に、Oil red O を吸引除去した、蒸留水で水が完全に透明になるまで洗浄した後、顕微鏡で観察した。

3-2-5-3.軟骨分化誘導と評価

3-2-5-3-1.軟骨分化誘導

不織布又はディッシュから剥離した細胞を 24 ウェルプレートに播種密度 0.15×10^4 cells/cm² になるように細胞懸濁液を加え、5%CO₂、37°Cインキュベーターに入れ、コンフルエントまで増殖させた。この時、MSC 増殖用培地 (Table 2-1) を使用した。コンフルエントまで増殖したら、トリプシン処理によって細胞を回収した。次に、遠心機 (H-30R、コクサン、東京、日本) で 1000 rpm、5 min 遠心した後、上清を捨てた。軟骨分化培地 (Table 3-3) を用いて 5.0×10^4 cells/ml の細胞懸濁液 0.5 ml を調製した後、遠心器 (H-30R, コクサン) で 1000 rpm、5 min 遠心した。遠心後、5% CO₂、37°Cインキュベーターに入れ、14 日間培養した。この間、3 日毎に軟骨分化培地を培地交換した。

コントロールとして正常ヒト前駆脂肪細胞 (PT-5020, Lonza) を用いた。この細胞のアンブルを開封し、100 φディッシュに播種密度 0.15×10^4 cells/cm² になるように播種し、5%CO₂、37°Cインキュベーターに入れ、コンフルエントまで増殖させた。この時、ブレットキット OGM (CC-3216, Lonza) を使用した。コンフルエントまで増殖したら、遠心分離によりペレット化し、軟骨分化培地 (Table 3-3) に交換し 14 日間培養した。この間、3 日毎に軟骨分化培地を培地交換した。

3-2-5-3-2. パラフィン包埋

3-2-5-4-1 でペレット培養した細胞、培地を吸引除去し、PBS(−)0.5 ml で 1 回洗浄した。4%PFA/PBS を加え、4°Cで 24 h 固定した。切片 (厚さ 4 μm) の作製を GLab 病理解析センター (札幌、日本) に依頼した。

3-2-5-3.3.脱パラフィン操作

パラフィンによって包埋されている切片の載ったプレパラートをガラスシャーレに入れ、プレパラート全体が浸る程度の量のキシレン (244-00086, Wako) を加えて、10 min 間浸した後、プレパラートを新しい容器に入れ、15 ml キシレンを加え、これらの操作を 3 回繰り返した。次に新しいガラスシャーレに無水エタノール (321-00025, Wako) を 15 ml 入れ、プレパラートを 10 min 浸し、この操作を 2 回繰り返した。99.5%エタノールを 15 ml 入れ、プレパラートを 10 min 浸し、この操作を 2 回繰り返した。最後に、流水で 3 min 間洗浄した。

3-2-5-3.4. アルシアンブルー染色

プレパラートをガラスシャーレに入れ、3%酢酸水溶液 (014-0261, Wako) を 20 ml 加え、3 min 間浸した後、蒸留水で洗浄した。酢酸を除き、アルシアンブルー染色液 (015-13805, Wako) を数滴滴下し、室温で 30 min 静置した。新しいガラスシャーレに適量の 3%酢酸水溶液を入れ、プレパラートを 3 min 洗浄し、この操作を 3 回繰り返した。最後、流水で 3 min 間洗浄した後、顕微鏡で観察した。

3-2-5-3.5. II型コラーゲン染色

切片に 0.2%Triton X-100 (DOU6302, Wako)/PBS 50 μ l 滴下し、室温で 5 min 待った。PBS 50 μ l で洗浄し、1%BSA/PBS 溶液を加え、室温で 30 min ブロッキングした。PBS 50 μ l で 3 回洗浄し、抗II型コラーゲン 1 次抗体としてのマウス抗ブタ (MAB1330, Sigma) を 30 μ l 入れ、室温で 1 h 反応させた。50 μ l PBS(－)で 3 回洗浄し、FITC 標識ヤギ抗マウス二次抗体 (F0257, Sigma) を 30 μ l 入れ、室温で 30 min 遮光反応させた。50 μ l PBS で 3 回洗浄し、50 μ l Elix

水 1 回洗浄し、遮光し風乾させた後、蛍光顕微鏡で観察した。

3-2-6. 細胞サイズの比較

不織布とディッシュのそれぞれから回収した細胞懸濁液を細胞濃度 1×10^6 cells/ml に調整した後、血球計算板に載せて位相差顕微鏡で観察し、画像を記録した。取得した画像から ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を利用して、各細胞の面積を測定した。

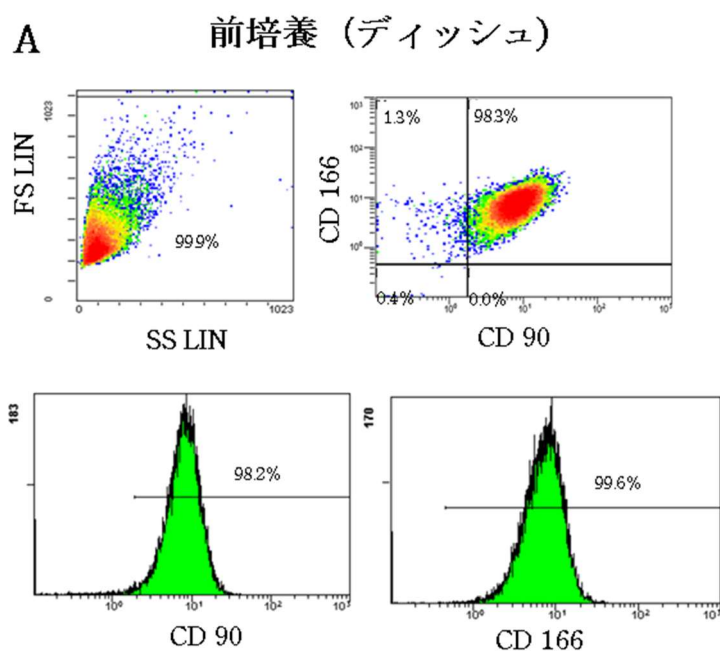
3-3. 結果と考察

3-3-1. 不織布培養した細胞の表面抗原解析

まず、MSC の品質項目のうち細胞表面抗原 (CD90、CD166) の陽性率を分析した。比較のために、ディッシュでの前培養終了時、不織布本培養終了時、及びディッシュ本培養終了時で測定した。このうち、不織布本培養とディッシュ本培養では、各々 $0.15 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ -NWF、 $0.15 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ の細胞密度で播種し、21 日間培養を行い、本培養終了時 ($5.75 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ -NWF、 $23.1 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$) に細胞を回収し、フローサイトメトリーで分析した。その結果を図 3-1 及び表 3-5 に示した。

表 3-5 CD90 と CD166 の陽性率

		CD90(+)	CD166(+)	CD90/CD166(+)
前培養	Dish	98.2%	99.6%	98.3%
	NWF	97.9%	98.3%	97.2%
本培養	Dish	67.9%	98.1%	67.9%
	NWF	97.9%	98.3%	97.2%



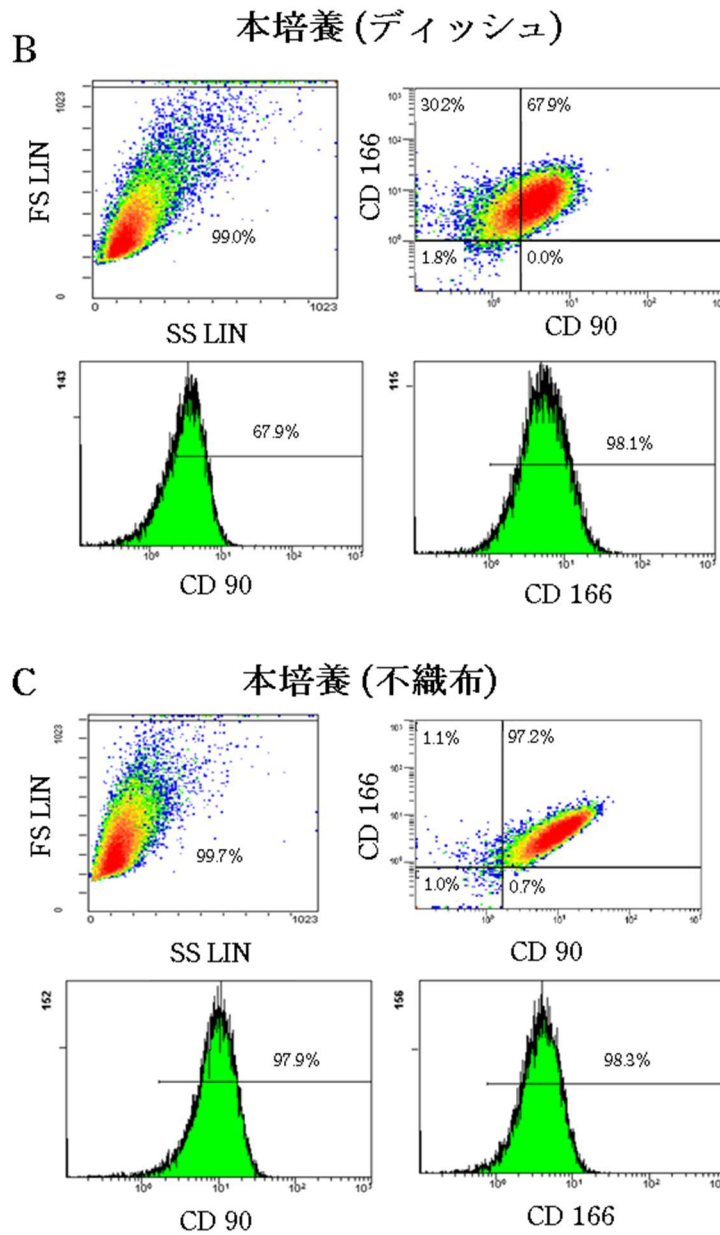


図 3-1 不織布培養した細胞の CD90 と CD166 陽性率の解析 ディッシュで前培養した細胞 (A)、ディッシュで本培養した細胞 (B)、不織布で本培養した細胞 (C) の CD90 および CD166 の陽性率をフローサイトメトリーにより解析した。

その結果、ディッシュでの前培養では、CD90、CD166 の単発現が 98.2%、99.6%、CD90・166 共発現が 98.3%であった (図 3-1A)。次に、ディッシュで 21 日間培養すると、培養した細胞の CD90、CD166 陽性率が 67.9%、98.1%、CD90・166 の共発現が 67.9%だった。ここでは特に CD90 の陽性率が前培養の値より顕著に下がった (図 3-1B)。それに対して、不織布で 21 日間培養した細胞の、CD90 (+)、CD166 (+)、CD90 / CD166 (+)の値はディッシュ本培養の場合より全て高く (それぞれ 97.9、98.3、97.2%)、ほぼ前培養の細胞と同じであった。すなわち、不織布培養において MSC の CD90 陽性率は高レベルに維持されたが、ディッシュで培養した細胞の CD90 陽性率は著しく減少した。

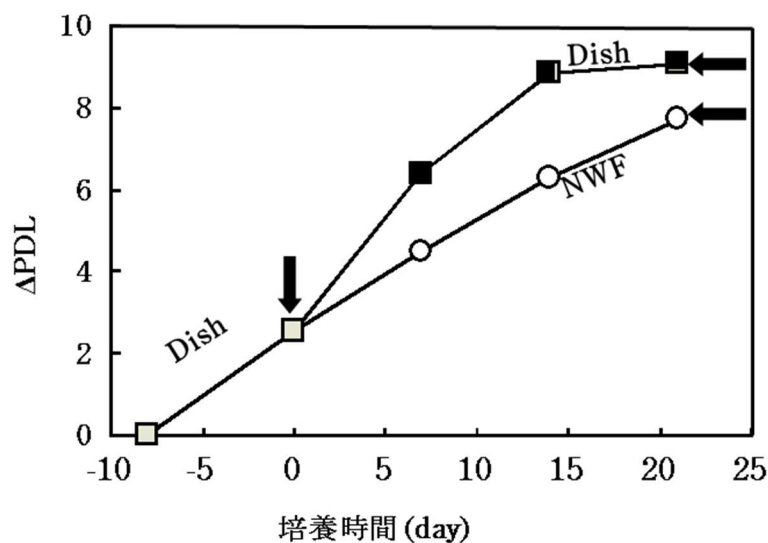


図 3-2 細胞分裂回数 (PDL) の経時変化 ディッシュで前培養 (白四角) した細胞を、ディッシュ (黒四角) や不織布 (白丸) に継代し、培養した。矢印はフローサイトメトリーのサンプルリング時点である。

図 3-2 に示すように、培養中にディッシュでは細胞が 9.1 回分裂したが、不織布の場合も 7.8 回とほぼ同じだったので、分裂回数の違いが CD90 陽性率の差の原因とは考えられなかった。MSC にとって CD90 は重要なマーカーであり、CD90 の陽性率が低下すると、MSC の幹細胞性が低下する傾向がある報告がある (90)。

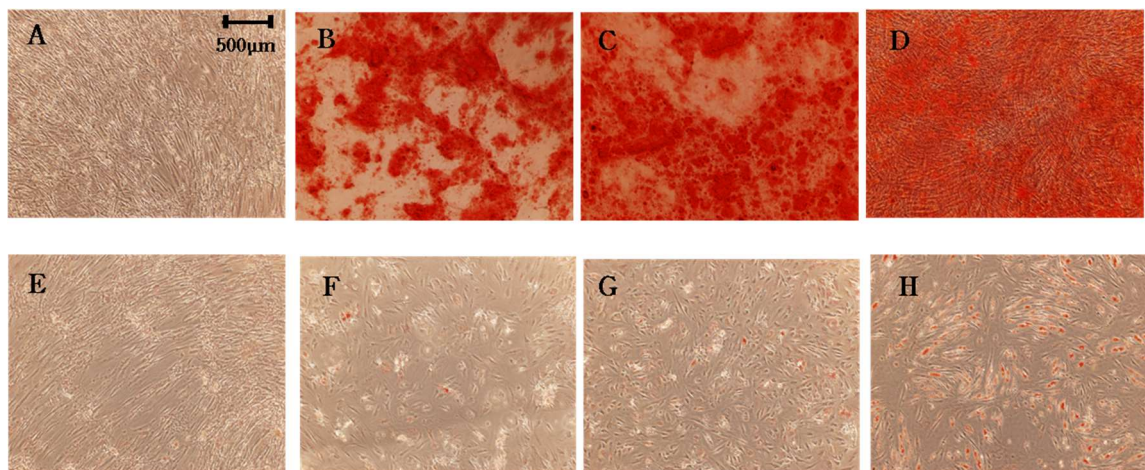
したがって、不織布担体で培養した場合は CD90 陽性率が高いことから、MSC の幹細胞性が維持されていて品質はほとんど低下していないと考えられた。

3-3-2 不織布で培養した細胞の多分化能評価

次に、MSC の品質項目として MSC の多分化能を調べた。ここでは、ディッシュと不織布で増殖した MSC の各成熟細胞への分化能を比較した。すなわち、ディッシュと不織布で 21 日間培養した細胞をトリプシン処理によって回収し、骨分化、脂肪分化、軟骨分化誘導培地を用いて分化誘導を試みた。ネガティブコントロールとポジティブコントロールとして分化誘導しなかった MSC と分化済みの各成熟細胞 (骨芽細胞、脂肪前駆細胞、軟骨細胞)を用いて培養した。14 日間分化誘導した後、骨分化誘導した細胞をアリザリンレッド S (図 3-3A-D)で染色し、脂肪分化誘導した細胞を Oil red O (図 3-3 E-H)で染色した。ペレット培養して軟骨分化誘導したペレットの切片をアルシアンブルー (図 3-3 I-K)によって染色した。または、2 型コラーゲン抗体を用いて免疫組織化学染色 (図 3-3L-N)した。染色結果は ImageJ を使用して染色された面積の割合を求め、骨分化誘導を図 3-3O に、脂肪分化誘導を図 3-3P に示した。

不織布で増殖した MSC (図 3-3C)は、ディッシュで増殖した MSC (図 3-3B)に比べて、アリザリンレッド S で染色された部分、すなわち、骨分化の特徴である石灰化マトリックスの面積が広いことが観察された。これらの不織布培養とディッシュ培養の染色面積の間に有意差があることが分かった (図 3-3 O)。一方、ディッシュ (図 3-3F)と不織布 (図 3-3G)で培養した細胞の Oil red O 染色の程度は同じくらいであるように観察された。オイルレッド O 染色された両者の細胞の割合も有意差がなかったので、脂肪分化能は類似していた。しかし、両者の細胞ともポジティブコントロール (図 3-3H)よりも染色細胞数をはるかに低いことがわかった。

次に、不織布で増殖した細胞のアルシアンブルー染色の濃度 (図 3-3J)は、ディッシュで増殖した細胞 (図 3-3I)よりも高いように観察された。しかし、両方の II 型コラーゲンの免疫組織化学染色の間には差が観察されなかった (図 3-3L と M)。したがって、両方の軟骨分化能は同様であると考えられた。



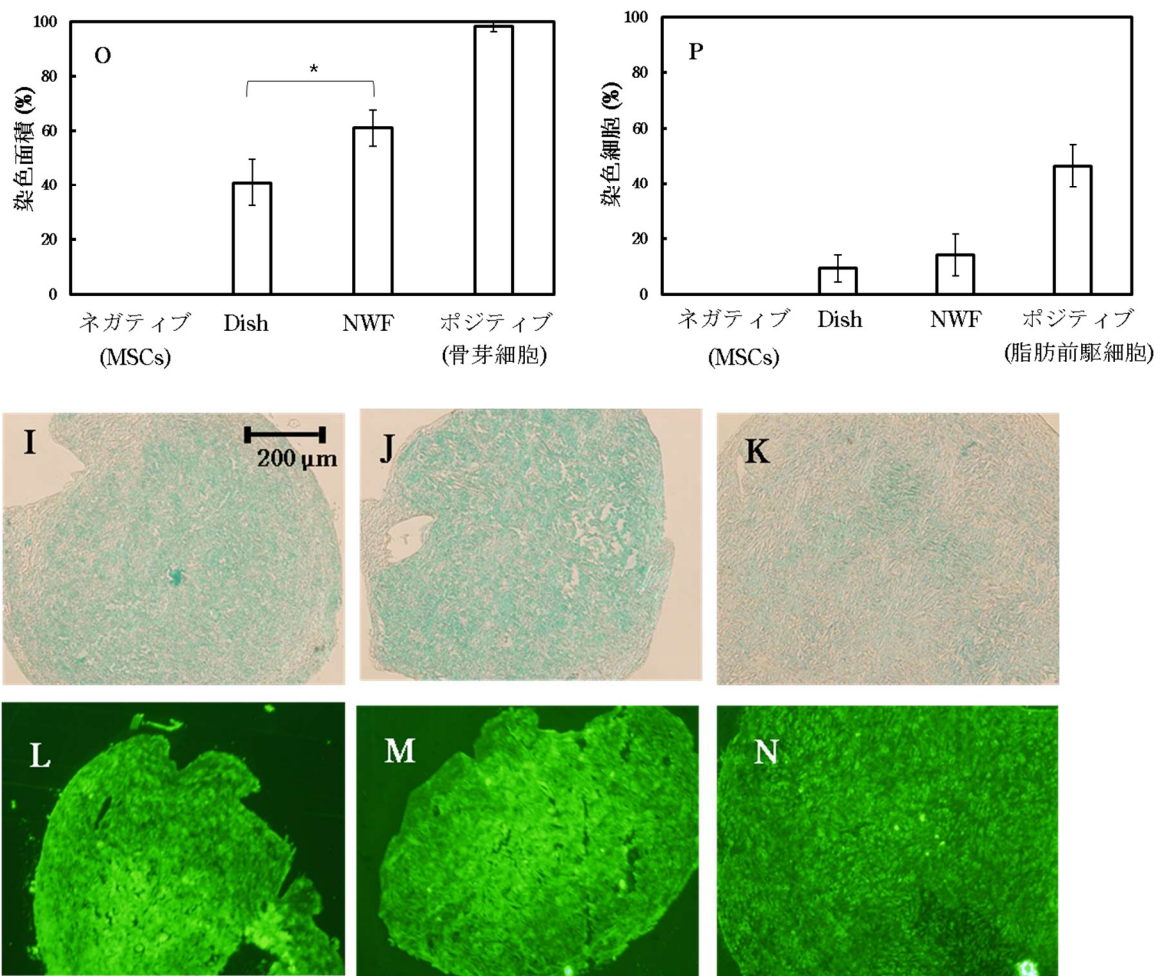


図 3-3 ディッシュと不織布で 21 日培養した細胞の多分化能評価 ディッシュと不織布で 21 日間培養した細胞を骨細胞 (B, C)、脂肪細胞 (F, G)、軟骨細胞 (I, J, L, M) に分化誘導した。ネガティブコントロールとポジティブコントロールとして分化誘導しなかった MSC (A, E) と分化済みの各成熟細胞 (骨芽細胞 : D、脂肪前駆細胞 : H、軟骨細胞 : K, N) を用いて培養した。アリザリンレッド、オイルレッド O、アルシアンブルー、II 型コラーゲン免疫組織化学染色により、各条件のサンプルを染色した。ImageJ を利用して染色された面積 (O) と染色された細胞の割合 (P) を測定した。(n = 3、平均値 ± SD、* p < 0.05)

以上をまとめると、不織布で増殖した細胞は、ディッシュで増殖した細胞と比べて高い骨分化能があるが、脂肪分化能と軟骨分化能に顕著な差はほとんどないと考えられた。この原因については第 4 章で詳しく検討する。

3-3-3. 不織布とディッシュで増殖した細胞サイズの比較

MSC の老化と共に、細胞が大きくなるという報告がある (87)。そこで、ディッシュと不織布で増殖した MSC のサイズを比較した。ディッシュと不織布で 21 日間培養した細胞をトリプシン処理によって回収し、血球計算盤に載せて画像を記録した。取得した画像は図 3-4 A と B で示した。画像解析から求めた細胞面積を用いて面積別の細胞数を図 3-4C に示した。また、求めた各細胞の平均面積と p 値を表 3-6 に示した。

図 3-4 に示すように、不織布で増殖した MSC はディッシュで増殖した MSC に比べて、面積が小さいことが分かった。また面積の違いに有意差があった (表 3-6)。したがって、不織布で増殖された細胞において、より老化が進んでいる可能性は低いと考えられた。

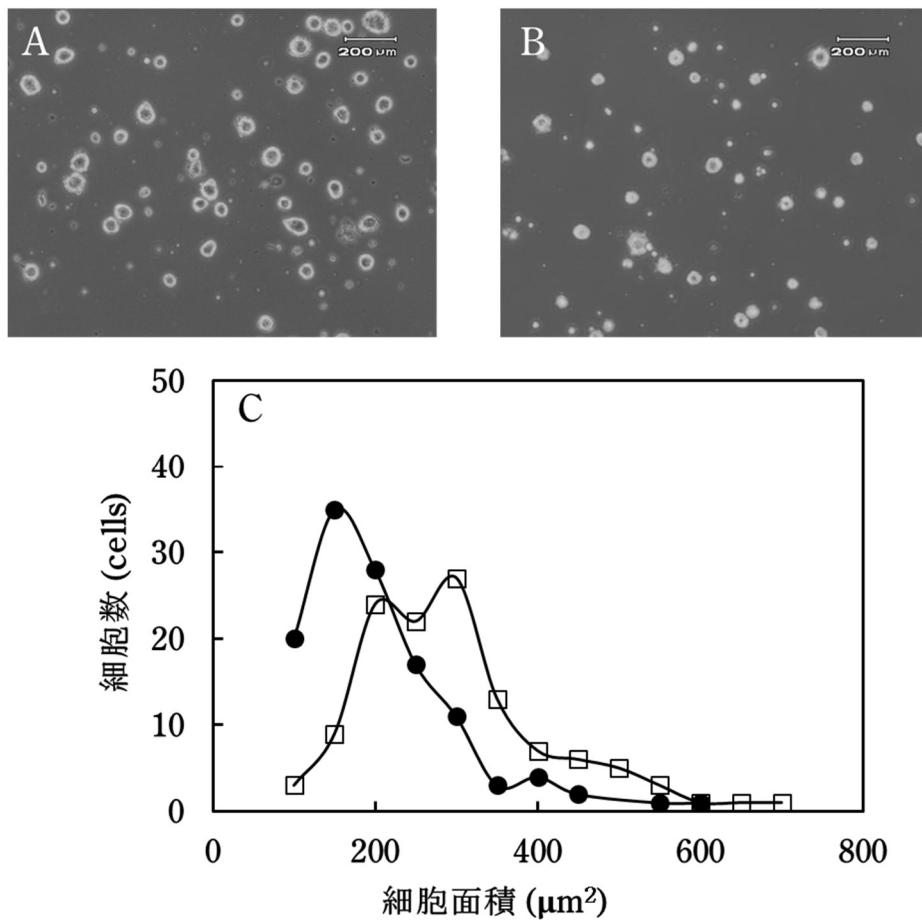


図 3-4 不織布とディッシュで 21 日増殖した細胞サイズの比較 ディッシュ (A) と不織布 (B) で増殖した細胞を顕微鏡で観察し、写真を撮った。ディッシュ (黒丸) と不織布 (白四角) で増殖した細胞の面積分布を C で示した。(n = 122)

表 3-6 Dish と NWF で培養した MSC のサイズ

	平均面積 (μm ²)	p 値
Dish	297.1	p<0.05
NWF	204.6	

3-4. 結言

第 2 章では、不織布を用いた MSC の培養において高接着効率、高増殖倍率を得るための培養法を明らかにした。しかし、新しく不織布で培養した MSC の品質を維持することは重要である。そこで、本章では不織布で培養した MSC において品質をディッシュ培養した MSC の品質と比較した。その結果、MSC の細胞表面抗原マーカーである CD90 の陽性率と骨分化能について、不織布を用いて培養した MSC の方がディッシュの場合より明らかに高く、品質が高いことがわかった。また、ディッシュと不織布で増殖した MSC のサイズを比較したところ、不織布で増殖した細胞の方が有意に小さいことから、老化が進んでいる可能性は低いと考えられた。

したがって、不織布で増殖した MSC は培養後も品質を維持していると考えられた。

第 4 章

不織布担体で増殖した
間葉系幹細胞が高い骨分化能を
有する要因

4-1. 緒言

第3章で、不織布で増殖したMSCの品質を細胞表面抗原マーカーのCD90、CD166の陽性率及び骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能に関して、ディッシュ底面で増殖したMSCと比較して評価した。その結果、不織布で培養したMSCはより高いCD90陽性率と高い骨分化能を持っていることを明らかにした。ここで、CD90はインテグリンと細胞外マトリックス (ECM)との結合に関連する膜タンパク質であり、CD90はRGD配列と似た構造を持ち、これを介してインテグリンとECMの結合に影響しているという報告がある(89)。一方、1-4で述べたように細胞周囲のECMがMSCの未分化状態を維持することが考えられている。そこで、不織布で培養したMSCが高いCD90陽性率と骨分化能を持っていて、幹細胞性を維持している要因として、ECMの量に関係しているのではないかと考えた。また、MSCのECMはほとんどタンパク質だから、ECMタンパク質量を比較することにより、ECM量を比較した。

そこで、第4章ではECMタンパク質定量法を検討し、不織布で増殖したMSCとディッシュで増殖したMSCについてECM量 (ECMタンパク質) を比較することを目的とした。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 細胞

4-2-1-1. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC)

ドナーB (65 歳・女性)から採取した骨髄液から 2-2-1-1.に示した方法で行った。

4-2-1-2. GFP 組み換えラット脂肪由来間葉系幹細胞 (GFP-MSC)

自治医科大学分子病態治療研究センターから購入した GFP 組換えレイス系ラット (NBRP Rat No.0297, LEW-Tg (CAG-EGFP)1Ys、雌、体重：342 g) の脂肪組織由来の間葉系幹細胞(MSC)を用いた。

4-2-2. 培地

4-2-2-1. 増殖培地

10%FBS 含有 DMEM-LG は 2-2-2 と同様に作製した。

4-2-2-2. 骨分化培地

骨分化培地用の培地は 3-2-2-2 と同様の培地を使用した。

4-2-3. 培養方法

4-2-3-1. MSC ディッシュ増殖培養

MSC 増殖用培地 10 ml を用いてアンプル内の保存細胞を、播種細胞密度が 1.5×10^3 cells/cm² となるように 100 φ ディッシュ (430167, Corning) に播種し、37℃、5%CO₂ 雰囲気下でプレコンフルエントになるまで前培養を行った。

前培養した 100 φ ディッシュの細胞がプレコンフルエント到達後、トリプシ

ン-EDTA (T3924, Sigma) を用いて細胞を剥がし、所定の細胞密度となるように接着性 6 ウェルプレート(表面積：9.5 cm²)に播種し、培養した。

4-2-3-2. MSC 不織布増殖培養

不織布培養には、浮遊培養用 24 ウェルプレート (MS-8024R, 住友ベークライト) を用いた。3-2-3-1 にて前培養した 100 φディッシュの細胞がプレコンフルエントに到達した後、あらかじめ 2-2-3-2. で用意しておいた不織布に増殖用培地を用いて所定の細胞密度となるように 10 μ l の細胞懸濁液を播種し、37℃、5%CO₂で培養した。播種 1 h 後に不織布中心に培地 10 μ l を追加添加し、さらに 7 h 後、浮遊培養用 24 ウェルプレートのウェル内に増殖用培地を 1 ml 加え 21 日間培養した。培地交換は 7 日ごとに行った。

4-2-3-3. MSC の剥離

3-2-3-3 と同様の方法で行った。

4-2-4. ECM タンパク質量の定量法

4-2-3-1. カルシウムなしの PBS (K⁺)

10×PBS(K⁺)を以下のように調整した。50ml 遠沈管に Elix 水 16ml を入れ、1.7 g NaCl、0.87 g Na₂HPO₄ · 12H₂O、0.24 g NaH₂PO₄ · 2H₂O 粉末を加えて、よく攪拌した。5N NaOH を加えて pH が 6.1～6.3 になるように調整した後、20ml にメスアップし、室温で保存した。使用する時、水で 10 倍希釈した。10×PBS (K⁺)の組成を Table 4-1 に示した。

Table 4-1. Composition of 10×PBS (K⁺–)

Component	Content
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O (84125-0301, JUNSEI)	43.7 g/L
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (192-02815, Wako)	12.2 g/L
NaCl (191-01665, Wako)	85 g/L
5N NaOH (192-15985, Wako)	適量

4-2-4-2. 細胞の除去

6 ウェルプレートと不織布を用いて MSC を所定時間培養した後、培地を吸引して細胞が接着している 6 ウェルプレートと不織布を PBS (K⁺–) で 2 回洗浄した。次に、PBS (K⁺–) を用いて 20 mM NH₄OH を含む 0.5% Triton X-100 溶液を調製した。6 ウェルプレートと不織布を上記の 0.5% Triton X-100 で 30 s 処理し、6 ウェルプレートと不織布から細胞成分を除去した (83, 93)。さらに、細胞除去した (脱細胞) 6 ウェルプレートと不織布を PBS (K⁺–) で 2 回洗浄し、–30 °C で保存した。

4-2-4-3. ECM タンパク質の抽出

PBS (K⁺–) を使用して粉末トリプシン (T4799-5G, Sigma) を溶解し、0.001% トリプシン溶液を調整した。凍結保存していた脱細胞 6 ウェルプレートと不織布を解凍し、それぞれに 0.3 ml 0.001% トリプシン (6 ウェルプレート : 0.3 ml/well と不織布 : 0.3 ml/枚) を加え、37°C、5% CO₂ 環境で 40 min 間 ECM を消化した。その後、の 4% SDS 0.1 ml を加え、攪拌しながら分解した ECM とトリプシンを含む溶液をエッペンチューブに回収した。次に、Micro BCA Protein アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて回収した溶液のタ

ンパク質濃度を測定した。最後に、測定したタンパク質総量からトリプシン量を差し引いて ECM タンパク質量を算出した。

4-2-5. ECM が MSC の骨分化能へ与える影響

4-2-5-1. 天然 ECM が MSC の骨分化能へ与える影響

4-2-5-1-1. 脱細胞 6 ウェルプレート の作成

MSC を 0、0.25、0.5、 1×10^4 cells/ cm^2 の細胞密度で 2 グループの 6 ウェルプレートに播種した。ECM を大量分泌させるために、50 mM アスコルビン酸を含む増殖培地を用いて 3 日間培養した (94)。その後、0.5% Triton X-100 を使用して細胞を除去し、PBS (K⁺) で 2 回洗浄した。2 グループの 6 ウェルプレートそれぞれの ECM 量を 4-2-3-3. の方法で測定した。残りの 1 グループの脱細胞 6 ウェルプレートを -30°C で保存した。

4-2-5-1-2. 脱細胞 6 ウェルプレートに MSC の播種

上記の脱細胞 6 ウェルプレートを解凍し、異なる ECM 量設定の各ウェルに 0.01×10^4 cells/ cm^2 の細胞密度で MSC を播種し、増殖培地を用いて 21 日間培養した。培地交換は 7 日ごとに行った。21 日後、トリプシンを利用して細胞を回収し、 0.8×10^4 cells/ cm^2 の密度で新しい 6 ウェルプレートに播種し、1 日培養して細胞を接着させた。

4-2-5-1-3. 脱細胞 6 ウェルプレートに播種した MSC の骨分化評価

4-2-5-1-2 で 1 日培養して細胞を接着させた後、骨分化培地に交換し、14 日間培養した。この間、3 日毎に骨分化培地を交換した。

1%アリザリンレッド S (011-01192, Wako) 溶液を調製し、0.025%水酸化ア

ンモニウムを用いて pH を 5.1 に調製した。14 日間培養したサンプルの培地を除去し、PBS(－)で 3 回洗浄した。95%エタノール (17065-0382, JUNSEI) を加え、室温で 30 min 固定した。エタノールを除去し、PBS(－)で 2 回洗浄した。1%アリザリンレッド S 溶液で 5 min 染色させた。次に、1%アリザリンレッド S を吸引除去し、蒸留水で水が完全に透明になるまで洗浄し、染色面積を観察した。

4-2-5-2. I 型コラーゲンが MSC の骨分化能へ与える影響

4-2-5-1-1. I 型コラーゲンコーティング 6 ウェルプレートの作成

0.3 ml の I 型コラーゲン (IPC-05, 高研、東京、日本)溶液 (0、17、34、170 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を 6 ウェルプレートに加え、プレートをクリーンベンチで一晩乾燥させた。そして、6 ウェルプレートにそれぞれ 0、0.53、1.06、5.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ コラーゲンをコーティングした。

4-2-5-2-2. I 型コラーゲンコーティング 6 ウェルプレートに MSC の播種

MSC を上記の I 型コラーゲンコーティング 6 ウェルプレートの各ウェルに $0.01 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$ の細胞密度で播種し、増殖培地を用いて 21 日間培養した。培地交換は 7 日ごとに行った。21 日後、トリプシンを利用して細胞を回収し、 $0.8 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$ の密度で新しい 6 ウェルプレートに播種した。1 日培養して細胞を接着させた。

4-2-5-2-3. I 型コラーゲンコーティング 6 ウェルプレートに播種した MSC の骨分化評価

4-2-5-1-3. と同様の方法で行った。

4-2-6. 細胞数計数

ディッシュ培養における細胞数は、細胞懸濁液中の細胞をトリパンブルー染色し、血球計算盤を用いて計数した。不織布に接着している細胞数は、24 ウェル内の不織布をエッペンチューブ内の 500 μ l の脱核染色液（クリスタルバイオレット 1.0 g/l, クエン酸 21 g/l）に浸漬し、室温で 24 h 放置した後、血球計算盤を用いて染色された細胞核を計数して求めた。

4-2-7. 蛍光顕微鏡観察

不織布ディスク中の細胞を可視化するために、2-2-4-2 に従い、GFP-MSC を所定条件で不織布に播種し、培養した後、蛍光顕微鏡 (IX 70, OLYMPUS) のステージに載せ、40 倍で蛍光観察した（励起波長 395 nm）。必要に応じて観察画像を記録した。

4-3. 結果と考察

4-3-1. ECM タンパク質定量法の検討

第 3 章で、ディッシュと不織布で培養した MSC の両者について、CD90 陽性率と骨分化能について比較すると、いずれも後者の方が高かった。その理由として、ディッシュと不織布で培養した MSC 周辺の ECM 量の違いである可能性が考えられた。また、MSC の ECM はほとんどタンパク質だから、ECM タンパク質量を比較することにより、ECM 量を比較した。そこで、まずは ECM タンパク質定量法の有効性を検討した。

4-3-1-1. 細胞を除去する方法の検討

20 mM NH_4OH を含む 0.5% Triton X-100 を用いてディッシュや不織布から細胞を除去できるかを検討した。GFP-MSC を 0.15 あるいは 0.123×10^4 cells/cm² の播種密度でディッシュと不織布に播種し、3 日間培養した。ネガティブコントロールとして、播種せず、培地のみを入れたディッシュと不織布を用意した。3 日後、培地を吸引し、0.5% Triton X-100 をディッシュと不織布に加え、30 s 後、PBS で 2 回洗浄した。処理前後のディッシュと不織布を蛍光顕微鏡で観察した。観察した結果を図 4-1 に示した。0.5% Triton X-100 処理前のディッシュ (図 4-1A) と不織布 (図 4-1D) には大量の緑色蛍光細胞が観察された。しかし、培養後、0.5% Triton X-100 処理したディッシュ (図 4-1B) と不織布 (図 4-1E) には未播種のネガティブコントロール (図 4-1C, E) と同じく、緑色の蛍光がほとんど観察されなかった。したがって、0.5% Triton X-100 処理により、ディッシュと不織布から細胞をほぼ除去できることが確認された。これ

は、0.5% Triton X-100 を用いて細胞を溶解させ、PBS(－)で細胞破片も洗い流すことができたとの報告と一致した (93)。

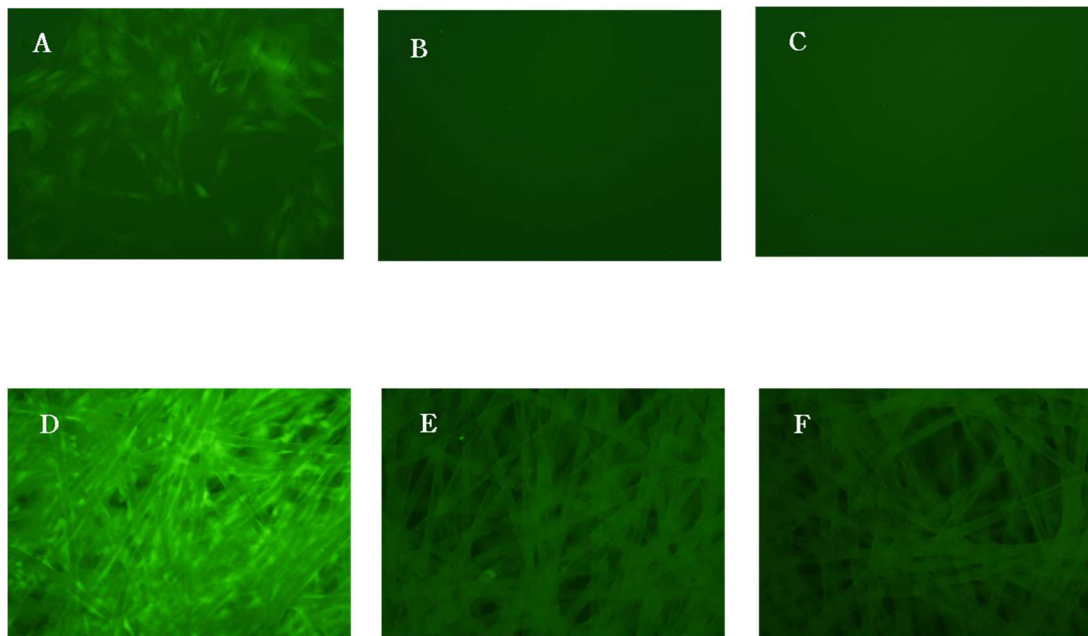


図 4-1 TritonX-100 を利用してディッシュ及び不織布から細胞を除去する方法の検討 ディッシュ (A、B) 及び不織布 (D、E) に GFP-MSC を播種して 3 日間培養した後、TritonX-100 処理前 (A、D) と処理後 (B、E) の様子を蛍光顕微鏡で観察した。細胞を接種していないディッシュ (C) と不織布 (F) がコントロールとして観察された。

4-3-1-2. ECM タンパク質抽出方法の検討

次に、細胞を取り除いた後のディッシュ底面や不織布繊維表面などに残っている ECM タンパク質を定量する方法を検討した。通常タンパク質抽出法では、DDT など強力な還元剤を含むタンパク質抽出バッファーを利用して ECM 抽出する(95)。しかし、強い還元剤を含むため、通常タンパク質アッセイキットを用いた ECM タンパク質定量には通用できないと考えた。そこで、

本実験ではトリプシンと SDS を用いてタンパク質を抽出して、BCA 法により定量する ECM 定量法を検討した。I 型コラーゲン水溶液を 6 ウェルプレート (9.9 μg /ウェル、0.3 ml) と不織布 (8.2 μg /NWF、0.01 ml) に加え、クリーンベンチ内で一晩乾燥させた。6 ウェルプレートと不織布に 0.001% トリプシン 0.3 ml を入れて 40 min インキュベートし、分解された I 型コラーゲンを SDS 溶液を加えて回収した。回収された溶液中のタンパク質量を BCA 法で測定した。その結果を図 4-2 に示した。6 ウェルプレートと不織布から回収した溶液のタンパク質量は各々 11.8 および 9.3 μg であり、回収率 (測定したタンパク質の量 $\div$ 添加したトリプシンの量 $\times 100\%$) は 90.6 および 102.1% だった。

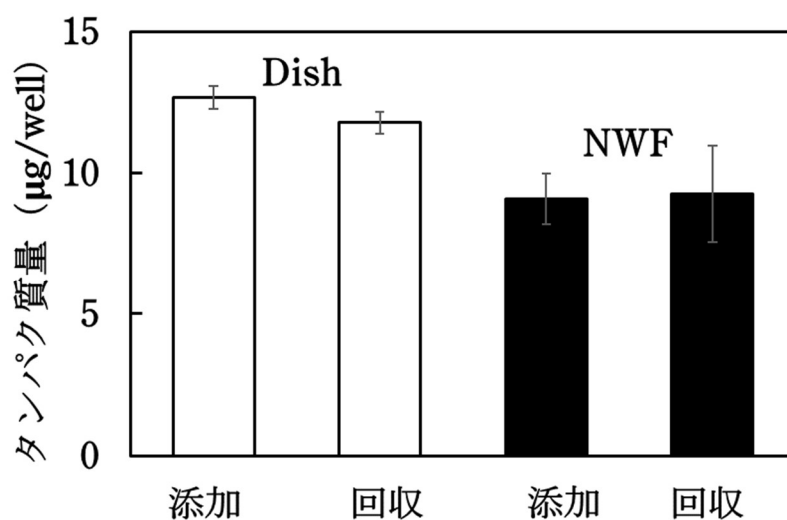


図 4-2 ディッシュと不織布にコーティングした I 型コラーゲンの回収 ディッシュや不織布にコーティングした I 型コラーゲン、及び添加したトリプシンの量をそれぞれ測定し、添加量として左側の白棒と黒棒で示した。回収したタンパク質の総量は右側の白棒と黒棒で示した。

したがって、6 ウェルプレートと不織布にコーティングされた I 型コラーゲンはトリプシンと SDS により、ほぼ完全に回収できたと考えられた。そこで、以降の実験ではこの方法で ECM タンパク質を定量することとした。

4-3-2. ディッシュと不織布で培養した MSC の ECM 量の経時変化

MSC を不織布 (0.0245×10^4 cells/cm²) と 6 ウェルプレート (0.01×10^4 cells/cm²) 各播種密度で播種し、21 日間培養した。細胞密度測定及び培地交換は 7 日ごとに行った。その間、培地交換直前に、6 ウェルプレートと不織布をサンプリングして、0.5% Triton X-100 により細胞を除去し、測定まで -30°C で保存した。同時にこの時点の細胞数を計数した(図 4-3A)。

その結果、図 4-3A に示すように培養初期 (0~7 日) では不織布での細胞増殖速度は 6 ウェルプレートと比べて遅かったが、対数増殖期 (7~14 日) では両方がほぼ同じ速度で増殖していた。一方、衰退期 (14~21 日) において、6 ウェルプレートと不織布で培養した細胞の増殖速度は両方とも対数期と比較して低下した。

21 日後、凍結保存していた全てのプレートと不織布を解凍し、トリプシンと SDS を使用して ECM タンパク質を抽出し、BCA 法で定量した。ECM タンパク質量の定量結果は 2 つの形で表示した。1 つ目は単位面積あたりの ECM タンパク質量 (ECM タンパク質量/ウェルの底面積あるいは、ECM タンパク質量/不織布繊維の表面積) を図 4-3B に示した。2 つ目は細胞数あたりの ECM タンパク質量 (ECM タンパク質量/この時点の各細胞数) を図 4-3C に示した。

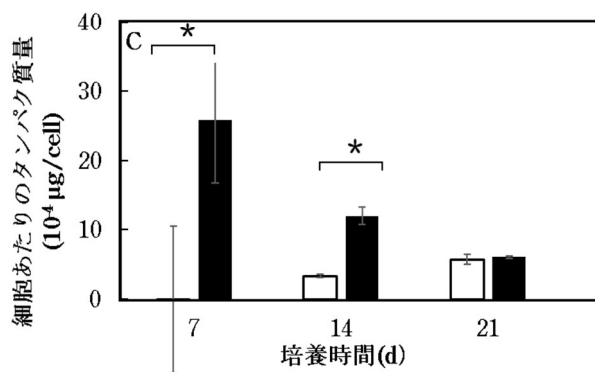
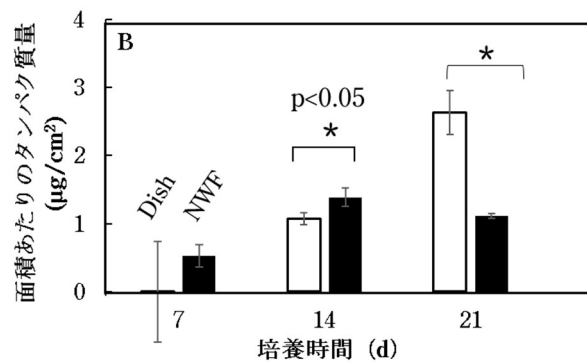
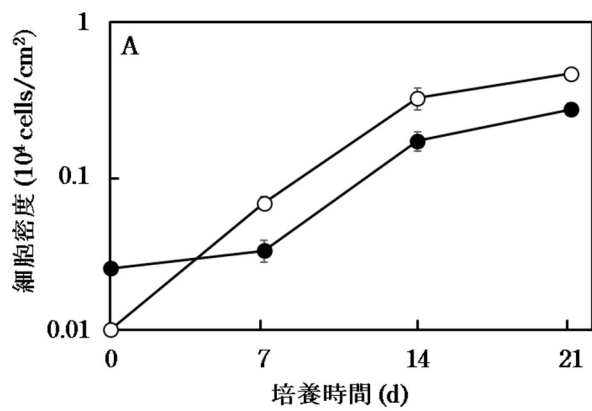


図 4-3 ディッシュと不織布で培養した MSC の ECM タンパク質量の経時変化 MSC を 6 ウェルプレートと不織布で 21 日間培養した。A は 6 ウェルプレート (白) と不織布 (黒) で培養した細胞の細胞密度の経時変化である。7 日毎に 6 ウェルプレートと不織布での ECM タンパク質を測定した。6 ウェルプレートの底面積あたりあるいは不織布繊維面積あたりの ECM タンパク質量を B で示した。各時点細胞あたりの ECM タンパク質量を C で示した。(n = 3、平均値 ± SD、* p < 0.05)

図 4-2 B, C に示すように、播種初期 (0~7 日) に、不織布での ECM タンパク質量は細胞あたりでも面積あたりでも、6 ウェルプレートより高かった。対数増殖期 (7~14 日) において、6 ウェルプレートと不織布で ECM タンパク質の蓄積量が増えたが、依然として不織布の方が面積あたりでも細胞あたりでも ECM タンパク質量が有意に高かった。一方、衰退期 (14~21 日) になると、不織布での ECM タンパク質の蓄積量が対数期と変わらなかったが、6 ウェルプレートの方ではさらに蓄積量が増えたので、不織布より面積あたりの ECM タンパク質量が高くなった (図 4-3 B)。同時に、細胞あたりの ECM タンパク質量は 6 ウェルプレートと不織布両方がほぼ同じになった (図 4-3C)。すなわち、細胞が盛んに増殖して代謝も活発と考えられる対数増殖期及び培養初期では、細胞及び接着面積あたりの ECM 量がディッシュより不織布の方が大きかった。

4.1. で述べたように ECM が MSC の幹細胞性の維持と関係することが知られているので、このことが MSC の CD90 陽性率 (未分化性の維持) 及び骨分化能の高さの要因となった可能性が考えられた。

4-3-3. 培地由来のタンパク質のディッシュと不織布への吸着

不織布で培養した MSC がディッシュで培養するより未分化性が高く維持される要因の一つは、前節では蓄積した ECM タンパク質量が不織布の方が多いことであると考えられた。ただし、蓄積 ECM の由来は細胞からの分泌量と、培地からの吸着量という 2 つの由来があると考えた。次に、この 2 つのうちタンパク質吸着量の差について検討した。

6 ウェルプレートと不織布に吸着する培地由来のタンパク質を定量するため

に、増殖培地だけを 6 ウェルプレート(2 ml/well; 面積: 9.6cm²)と、不織布を入れた浮遊培養用 24 ウェルプレート(1 ml/well; 繊維の表面積: 12.24 cm²), に加え、5%CO₂で 37℃の雰囲気中で 21 日間インキュベートした。培地交換は 7 日ごとに行った。その結果を図 4-4 に示した。

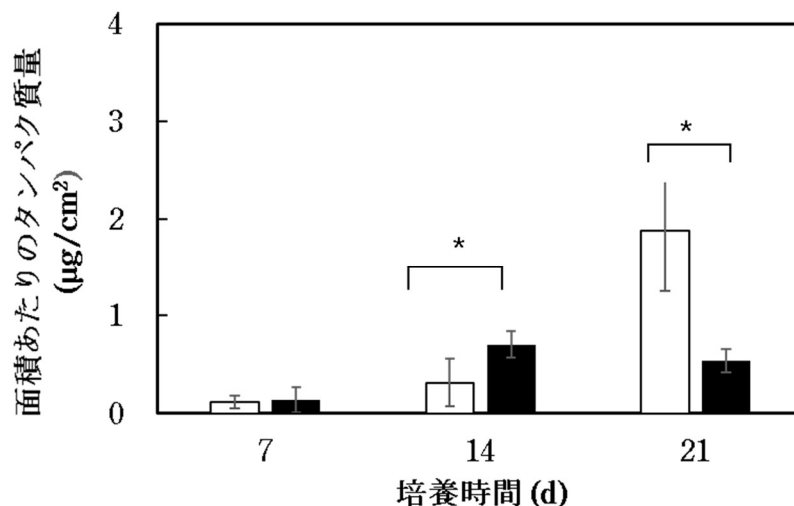


図 4-4 MSC を播種せず、ディッシュと不織布に吸着した培地由来のタンパク質
 6 ウェルプレートと不織布に培地だけを加え、21 日間インキュベートした。
 6 ウェルプレートの底面積あたりあるいは不織布繊維面積あたりタンパク質量を 7 日毎に測定した。(n = 3、平均値±SD、* P < 0.05)。

7 日目に 6 ウェルプレートと不織布の両方には、少量のタンパク質しか吸着しなかった。14 日目に、不織布に吸着したタンパク質の量は、6 ウェルプレートに吸着したタンパク質の量より有意に高いことが分かった。21 日目に、不織布でのタンパク質の蓄積が 14 日目とほとんど変わらなかったが、6 ウェルプレートの方はタンパク質がさらに蓄積し続け、不織布でのタンパク質量より高く

なった。この傾向は MSC を培養した場合の面積あたりの ECM タンパク質量の経時変化 (図 4-3B) と同様だった。

細胞が存在する条件の ECM タンパク質量 (図 4-3B) から細胞がない条件のタンパク質 (図 4-4) を引くと、その差は細胞の活動により産生したタンパク質量を示す可能性が考えられた。計算した結果、その差は不織布の方が 6 ウェルプレートより多かった (データ示さず)。この原因として、不織布の 3D 多孔質構造は本来 MSC が存在している骨髄中の環境に類似していることと関係している可能性が考えられた(96-97)。

以上、21 日間のディッシュと不織布培養において、培地からの吸着に由来するタンパク質量が、培養後期 (21 日) を除くと、不織布の方がディッシュに比べて有意に高い可能性が考えられた。

4-3-4. ECM 量の MSC 骨分化能への影響

ECM 量の MSC 骨分化能への影響を調べるために、異なる細胞密度(0, 0.25, 0.5, 1×10^4 cells/cm²) の MSC を 50 mM アスコルビン酸を含む増殖培地で 3 日間培養し、TritonX-100 で細胞を除去し、異なる濃度(A, 0; B, 1.48; C, 3.41; D, 4.89 μ g/cm² 以上、実測値)で天然 ECM コーティングされた 6 ウェルプレートを得た。平行実験として、異なる濃度の I 型コラーゲンをコートした 6 ウェルプレート(E, 0; F, 0.53; G, 1.06; H, 5.3 μ g/cm² 以上、計算値)も用意した。MSC をこれらの 6 ウェルプレートに播種し、21 日間培養した。21 日後、細胞を剥離して骨分化能を調べた。その結果を図 4-5 に示した。

コーティングされた ECM (図 4-5A-D) とコラーゲン (図 4-5E-H) のタンパク

質量が高いほど、アリザリンレッド S 染色面積が広い傾向が認められた (図 4-5I, J)。つまり、ECM 量と骨分化能との間に正の相関関係があることが示唆された (図 4-5)。

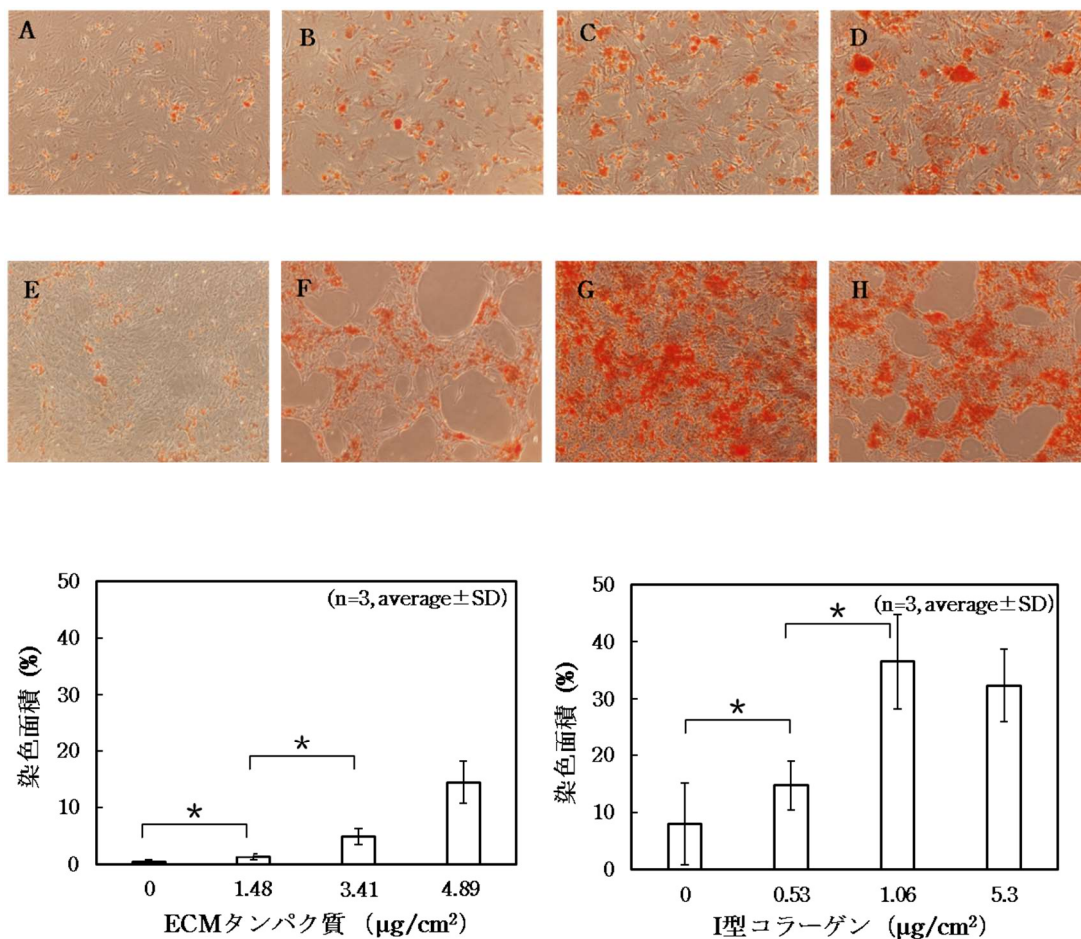


図 4-5 MSC 由来 ECM タンパク質と I 型コラーゲンの量が MSC の骨分化能へ与える影響 MSC 由来 ECM タンパク質 (A~D、0、1.48、3.41、4.89 µg / cm²) 及び I 型コラーゲン (E~H、0、0.53、1.06、5.3 µg / cm²) でコーティングした 6 ウェルプレートで MSC を 21 日間培養した後、骨細胞に誘導し、染色した。ImageJ を利用して染色された面積 (I, J) を測定した。

したがって、図 4-3B に示した培養において、培養初期と対数増殖期 (0～14 日)の ECM 量がディッシュより不織布で多いことが、ディッシュの MSC より不織布の MSC の方が MSC の骨分化能が高い要因であると考えられた。

4.4. 結言

近年、ECM は幹細胞の幹細胞性維持に強く関係することが報告されている(76-81)。そこで、4 章では、不織布で培養した MSC がディッシュで培養した MSC より高い骨分化能と CD90 陽性率を持つ要因について細胞周囲の ECM 量 (ECM タンパク質量) に注目し、検討した。

初めに不織布とディッシュの ECM タンパク質量を比較するために、ECM タンパク質定量方法を検討した。その結果 Triton X-100 による細胞溶解して、PBS(-)で洗浄後 (図 4-1)、ECM のトリプシン分解、SDS 抽出と BCA 法による定量をすることによって可能であることを示した。

以上の ECM タンパク質定量法を利用してディッシュと不織布で培養した MSC 周囲の ECM タンパク質量を定量した。その結果、培養初期と対数増殖期 (0~14 日)では、不織布での面積あたりの ECM タンパク質量 (図 4-3B)も、細胞あたりの ECM タンパク質量 (図 4-3C)も、ディッシュの場合より多かった。それに対して、衰退期 (14~21 日)では、ディッシュで培養した細胞周囲の ECM タンパク質量は更に増加し、不織布より高くなった。この傾向は、細胞を播種しないディッシュと不織布へ培地から吸着したタンパク質の量の経時変化 (図 4-4)と一致した。

ECM 量が骨分化能へ与える影響を調べた結果、接着面に天然 ECM あるいは I 型コラーゲンの量が多いほど、MSC の骨分化能が高くなることが強く示唆された (図 4-5I、J)。

以上の結果より、不織布で増殖した MSC が、ディッシュで増殖した MSC と比べて著しく高い骨分化能を持っている要因の一つとして、不織布での細胞周

囲の ECM 量がディッシュより高いことが考えられた。

第 5 章

総括

近年、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)、胚性幹細胞 (ES 細胞)、間葉系幹細胞 (MSC)などの幹細胞を利用した再生医療、すなわち、幹細胞を増殖、分化、三次元化して得られた組織や臓器を用いた治療方法が期待されている。これら幹細胞の中で、MSCは採取しやすく、高い増殖能と多分化能を持つことから、有望な再生医療用の細胞源として考えられている。また、MSCは免疫拒絶を受けにくいいため、自家細胞とは異なり、同じロットの同種細胞を多数の患者に移植し、大幅に治療期間を短縮する大量生産型の同種移植システムが可能であると考えられている。しかし、MSCを用いた同種移植では同一ロットの 1×10^{10} 個以上の大量の MSC が必要と考えられた。そこで、MSC の同種移植を実現するためには、MSC の品質を維持しながら、MSC を大量培養することが重要になる。そして、MSC を大量培養するには MSC を高密度に培養可能な培養方法が必要となる。

そこで我々は通常のディッシュ様の平面担体ではなく、3 次元担体である不織布に注目した。不織布とは、1 本ごとに分散した繊維が熱による接着によって形成された 3 次元の繊維集合体である。不織布は体積当たりにより高い表面積を有するため、不織布内で MSC は高密度に増殖できると考えた。

本研究では、高い培養成績に必須な高い接着効率と高い増殖倍率を得るための不織布担体への MSC の播種方法を検討すると共に、本培養方法で得られた細胞の MSC としての品質及びそれが得られた要因を明らかにすることを目的とした。

本論文は序論および総括を含む 5 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、本研究の背景および目的を明らかにした。

第 2 章では、不織布ディスクへの MSC の播種方法を検討した。不織布への播種細胞懸濁液量を不織布ディスク (直径 : 15.1 mm、厚さ : 0.1 mm) の空隙体積に近い 10 μ L とし、播種 1 h 後に培地 10 μ L を追加添加して不織布内の細胞分布を均一化することにより、播種密度を 0.15×10^3 cells/cm²-NWF まで下げても、接着効率約 64% 及び増殖倍率約 48 倍が得られることを明らかにした。

第 3 章では、不織布を用いて培養した細胞の品質を CD90 陽性率と分化能の点から評価した。その結果、不織布で培養した MSC の CD90 陽性率と骨分化能が、いずれもディッシュ培養した MSC より有意に高いことを明らかにした。

第 4 章では、不織布で培養した MSC が高い CD90 陽性率と骨分化能を持つ要因について細胞周囲の ECM 量 (ECM タンパク質量) に注目し、検討した。ディッシュと不織布各々で培養した MSC を用いて、Triton X-100 による細胞融解、PBS 洗浄後、ECM タンパク質のトリプシン分解、SDS 抽出と BCA 法によるタンパク質定量という一連の操作により、MSC 周辺の ECM タンパク質量を定量できることを明らかにした。この方法を用いて、21 日間のディッシュと不織布の培養におけるタンパク質量を測定し、培養後期 (21 日) を除くと、不織布のタンパク質密度の方がディッシュ上の密度に比べて有意に高いことを明らかにした。さらに、接着面にコーティングした ECM あるいは I 型コラーゲンの量が多いほど、MSC の骨分化能が高くなることも明らかにした。以上から、不織布で増殖した MSC が、ディッシュで増殖した MSC と比べて著しく高い骨分化能を持っている要因の一つとして、不織布で培養した細胞周囲の ECM 量

がディッシュより高いことが考えられた。

第 5 章では、総括として本研究で得られた成果についてのまとめおよび今後の展望を述べた。

本論文では、細胞接着担体として不織布を利用して MSC を大量培養する際に、高接着効率、高増殖倍率を得るに適した、不織布への細胞播種法を提案した。さらに、本方法では CD90 陽性率と骨分化能が比較的高い高品質な細胞が得られ、その要因の 1 つが細胞周辺に高密度となった ECM であることも示された。今後、不織布を用いて、高品質の MSC を大量に生産する技術として期待される。

したがって、本研究は MSC の大量生産による同種移植システムの実現の可能性を高め、再生医療の進歩に貢献できると考える。

参考文献

- 1) Thomas DE (2005), Bone Marrow Transplantation from the Personal Viewpoint, *International Journal of Hematology*, 81, 89-93.
- 2) Mason C, Dunnill P. (2008): A brief definition of regenerative medicine. *Regen. Med*, 3(1), 1-5.
- 3) Fuggle N. R, Cooper C, Branco J et al. (2020). Alternative and complementary therapies in osteoarthritis and cartilage repair. *Aging Clinical and Experimental Research*. 32(4):547-560.
- 4) 佐藤 康史 : 移植用軟骨様細胞シート作製に関するプロセス工学的研究、北海道大学大学院 総合化学院 総合化学専攻 生物化学コース 細胞生物工学講座 細胞培養工学研究室 博士論文 (2015)。
- 5) Schol J, Sakai D (2019). Cell therapy for intervertebral disc herniation and degenerative disc disease: clinical trials. *International Orthopaedics*. 43 (4): 1011-1025.
- 6) Hall VJ (2008). Embryonic stem cells and Parkinson's disease: cell transplantation to cell therapy. *Ann Acad Med Singapore*. 37(3):163-2.
- 7) Claire H, Malin P et al. (2018). Repairing the Brain: Cell Replacement Using Stem Cell-Based Technologies. *Journal of Parkinson's Disease*. 8 (s1): 131-137.
- 8) Jing DH, Parikh A, Canty JM, Tzanakakis ES (2008). Stem Cells for Heart Cell Therapies. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 14 (4): 393-406.

- 9) Mandai M, Kurimoto Y, Takahashi M et al. (2017), Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration, N Engl J Med, 376:1038-1046.
- 10) Roybal KT (2018), Refining cell therapy. Science, Vol. 359, Issue 6380, 1112-1113.
- 11) Guedan S, Ruella M, CH June (2018). Emerging Cellular Therapies for Cancer. Annual Review of Immunology, 37 (1): 145-171.
- 12) Bruce A, Alexander J, Julian L, Martin R, Keith R, Peter W (2010). 『細胞の分子生物学』 (5th 版)。
- 13) Thomson AT, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998). Blastocysts Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human. Science, 282(5391): 1145-1147.
- 14) Baldwin A (2009). Morality and human embryo research. Introduction to the Talking Point on morality and human embryo research. EMBO Reports, 10 (4): 299-300.
- 15) Wu DC, Boyd AS, Wood KJ (May 2007). Embryonic stem cell transplantation: potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine. Frontiers in Bioscience, 12 (8-12): 4525-35.
- 16) Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126 (4): 663-76.
- 17) Karen K (2009). Cancer threat removed from stem cells. scientists

say, Los Angeles Times, March 6.

- 18) Felfly H, Haddad GG (2014). Hematopoietic stem cells: potential new applications for translational medicine. *Journal of Stem Cells*, 9(3): 163-97.
- 19) Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D (2014). Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*, 54 (5): 1418-37.
- 20) Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. (2009). Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells and Development*, 18(5): 683-92.
- 21) Lee HJ, Kim WY (2020). Mesenchymal stromal cell application as an emerging translational medicine for acute respiratory distress syndrome. *Ann Transl Med*, 8(6):267.
- 22) Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*, 2 (2): 83-92.
- 23) Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4: 267-274.
- 24) Ashton BA, Allen TD, Howlett CR et al. (1980). Formation of bone and

- cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. Clin Orthop Relat Res, 151: 294-307.
- 25) Bab I, Ashton BA, Gazit D et al. (1986) Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. J Cell Sci, 84:139-151.
 - 26) In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C et al. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. Blood, 102:1548-1549.
 - 27) Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP et al. (1991). In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. Exp Cell Res, 195:492-503.
 - 28) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell, 13:4279-4295.
 - 29) Dezawa M., Kanno H., Hoshino M. et al. (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. J. Clin. Invest, 113(12): 1701-1710.
 - 30) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD et al. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science, 284(5417): 1168-1170.
 - 31) Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E et al. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood, 107: 367-372.
 - 32) Aggarwal S, Pittenger MF (2005) . Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood, 105:1815-1822.

- 33) Blanc K, Davies DC (2015). Mesenchymal stromal cells and the innate immune response, *Immunol Lett.* Dec,168(2):140-6.
- 34)Gupta N, Krasnodembskaya A, Kapetanaki M, Mouded M, Tan X, Serikov V et al. (2012). Mesenchymal stem cells enhance survival and bacterial clearance in murine *Escherichia coli* pneumonia. *Thorax*, 67: 533-539.
- 35) Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW , Serikov V, Matthay MA (2007). Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J. Immunol*, 179:1855-1863.
- 36) Morata-Tarifa C, Macías-Sánchez MDM, Gutiérrez-Pizarraya A, Sanchez-Pernaute R (2020). Mesenchymal stromal cells for the prophylaxis and treatment of graft-versus-host disease-a meta-analysis. *Stem Cell Res Ther.* 11(1):64.
- 37) Zhang Y, Chopp M, Liu XS, Katakowski M, Wang X, Tian X, et al. (2017). Exosomes derived from mesenchymal stromal cells promote axonal growth of cortical neurons. *Mol Neurobiol*, 54(4):2659-2673.
- 38)You L, Mao L, Wei J, Jin S, Yang C, Liu H, et al. (2017). The crosstalk between autophagic and endo-/exosomal pathways in antigen processing for MHC presentation in anticancer T cell immune responses. *J Hematol Oncol*,10(1):165.
- 39) 日本医療研究開発機構委託調査 (2018)「再生医療等製品とその競合技術の比較調査」報告書。

- 40) 特許庁 (2017) 「特許出願技術動向調査報告書 (概要) -ヒト幹細胞関連技術」。
- 41) Kurtzberg J, Prockop S, Teira P et al. (2014). Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cell Therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a Rescue Agent for Severe Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease in Pediatric Patients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20(2):229-35.
- 42) Wang DD, Li J, Zhang Y, et al. (2014). Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study. *Arthritis Res Ther*, 16(2): R79.
- 43) Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S (2016) Isolation and characterization of primary bone marrow *Ann N Y Acad Sci*, 1370(1):109-18.
- 44) Pittenger M.F. Mackay A.M. Beck S.C. Jaiswal R.K. et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284(5411), 143-147.
- 45) Schop D, Janssen FW, de Bruijn JD, Van Dijkhuizen-Radersma R (2008) Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: Growth and metabolism. *J Tissue Eng and Regenerative Medicine*, 2:126-135.
- 46) Nienow AW (2006) Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 50:9-33.
- 47) Takagi M, Okumura H, Okada T, Kobayashi N, Kiyota T, Ueda K (1994).

- An oxygen supply strategy for the large-scale production of tissue plasminogen activator by microcarrier cell culture. *J Ferment Bioeng*, 77(3):301-306.
- 48) Takahashi I, Sato K, Mera H, Wakitani S, Takagi M (2017). Effects of agitation rate on aggregation during beads-to-beads subcultivation of microcarrier culture of human mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*, 69(3):503-509.
- 49) Takagi M, Sasaki T, Yoshida Y (1999): Spatial development of the cultivation of a bone marrow stromal cell line carriers. *Cytotechnology*, 31:225-231.
- 50) Tomimori Y, Takagi M, Yoshida T (2000). The construction of an in vitro three-dimensional hematopoietic microenvironment for mouse bone marrow cells employing porous carriers. *Cytotechnology*, 34:121-130.
- 51) Takahashi Y, Tabata Y. (2003). Homogeneous seeding of mesenchymal stem cells into nonwoven fabric for tissue engineering. *Tissue Eng*, 9(5):931-938.
- 52) Hoch AI, and Leach JK (2014). Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. *Stem Cells Transl*, 3, 643.
- 53) Globus RK, Plouet J, Gospodarowicz D (1989). Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. *Endocrinology*, 124:1539-1547.

- 54) Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrazi MD (1986). Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem*, 261:12665-12674.
- 55) McCoy RJ, O'Brien FJ (2010). Influence of shear stress in perfusion bioreactor cultures for the development of three-dimensional bone tissue constructs: A review. *Tissue Eng Part B*, 16:587-601.
- 56) Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, Chen LL, Wang JY, Chiu CH, Hung SC (2011). Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood*, 117(2):459-69.
- 57) Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ (2002) Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*, 20(6):530-541.
- 58) Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*, 7:14.
- 59) Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lønning PE, Bjerkvig R, Schichor C (2009) Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res*, 69:5331-5339.

- 60) Solchaga LA, Penick K, Porter JD (2005). FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 203:398-409.
- 61) Adesida AB, Mulet-Sierra A, Jomha NM (2012). Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*, 3:9.
- 62) Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1992). Cell surface antigens on human marrow - derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13:69-80.
- 63) Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S (2016). Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1370(1):109-118.
- 64) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143-147.
- 65) Sordi V, Malosio ML, Marchesi F et al. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*, 106:419-427.
- 66) Le BK, Tammik C, Rosendahl K et al. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 31:890-896.

- 67) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315-317.
- 68) Yokoyama M, Miwa H, Maeda S, Wakitani S, Takagi M (2008). Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells during expansion. *J. Biosci. Bioeng*, 106(1): 46-50.
- 69) Miwa H, Hashimoto Y, Tensho K, Wakitani S, and Takagi M (2012). Xeno-free proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*, 64(3): 301-308.
- 70) Almalki SG, Agrawal DK (2016). Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*, 92(1-2):41-51.
- 71) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143-147.
- 72) Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A (2007). Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp. Cell Res*, 313: 698-706.
- 73) Pankajakshan D, Kansal V, Agrawal DK (2013). In vitro differentiation of bone marrow derived porcine mesenchymal stem cells to endothelial cells. *J. Tissue Eng. Regen*, 7:911-920.
- 74) Subbiah R, Culdborg RE (2018). Materials science and design principles

- of growth factor delivery systems in tissue engineering and regenerative medicine. *Adv. Healthcare Mater*, 8(1): e1801000.
- 75) Aomatsu E, Takahashi N et al. (2015), Novel SCRG1/BST1 axis regulates self-renewal, migration and osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 4: 3652.
- 76) Plaks V, Kong N, Werb Z (2015). The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells. *Cell Stem Cell*, 16(3): 225-238.
- 77) Lu P, Weaver VM, Werb Z (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 196 (4): 395-406.
- 78) Ponticos M, Smith BD (2014). Extracellular matrix synthesis in vascular disease: hypertension, and atherosclerosis. *J Biomed Res*, 28 (1): 25.
- 79) Kabirian F, Mozafari M (2019). Decellularized ECM-derived bioinks: Prospects for the future. *Methods*, ii: S1046-2023(18)30437-7.
- 80) Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677-689.
- 81) Pandolfi L, Furman NT, Wang X, Lupo C, Martinez JO, Mohamed M, Taraballi F, Tasciotti E (2017). A nanofibrous electrospun patch to maintain human mesenchymal cell stemness. *J Mater Sci Mater Med*, 28(3):44.
- 82) Anasiz Y, Ozgul RK, Uckan-Cetinkaya D (2017). A New Chapter for Mesenchymal Stem Cells: Decellularized Extracellular Matrices. *Stem*

Cell Rev, 13(5):587-597.

- 83) Lai Y, Sun Y, Skinner CM, Son EL, Lu Z, Tuan RS, Jilka RL, Ling J, and Chen XD (2010). Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 19: 1095-1107.
- 84) Sudhakararao P, Jessica M, Thomas K (2014) Decellularized ECM effects on human mesenchymal stem cell stemness and differentiation. *Differentiation*, 88(4-5):131-143.
- 85) Rakian R, Block TJ, Johnson SM, Marinkovic M, Wu J, Dai Q, Dean DD, Chen XD (2015). Native extracellular matrix preserves mesenchymal stem cell “stemness” and differentiation potential under serum-free culture conditions. *Stem Cell Research & Therapy*, 6:235.
- 86) Sanford KK, Earle WR, Evans VJ, Waltz HK, Shannon JE (1950). The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. *Anatomical Record* 106(2):243-243.
- 87) Sekiya I, Benjamin L et al. (2009). Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. *Stem Cell*, 20 (6): 530-541.
- 88) Rege TA, Hagood JS (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*, 20(8):1045-1054.
- 89) Fiore VF, Strane PW, Bryksin AV, White ES, Hagood JS, Barker TH (2015).

- Conformational coupling of integrin and Thy-1 regulates Fyn priming and fibroblast mechanotransduction. *J Cell Biol*, 211(1):173-190.
- 90) Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF (2016). A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*, 7(1):97.
- 91) Sasaki T, Takagi M, Soma T, Yoshida T (2003). Analysis of hematopoietic microenvironment containing spatial development of stromal cells in nonwoven fabrics. *J Biosci Bioeng*, 96(1): 76-78.
- 92) Schellenberg A, Ross R, Abagnale G, Joussen S, Schuster P, Arshi A, Pallua N, Jockenhoevel S, Gries T, Wagner W (2014). 3D Non-Woven Polyvinylidene Fluoride Scaffolds: Fibre Cross Section and Texturizing Patterns Have Impact on Growth of Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS One*, 9(4): e94353.
- 93) Chen XD, Dusevich V, Feng JQ, Manolagas SC, Jilka RL (2007). Extracellular Matrix Made by Bone Marrow Cell Facilitates Expansion of Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cell and Prevents Their Differentiation Into Osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 22(12):1943-1956.
- 94) Rakian R, Block TJ, Johnson SM, Marinkovic M, Wu J, Dai Q, Dean DD, Chen XD (2015). Native extracellular matrix preserves mesenchymal stem cell “stemness” and differentiation potential under serum-free culture conditions. *Stem Cell Research & Therapy*, 6:235.
- 95) Turoverova LV, Khotin MG, Iudintseva NM, Magnusson KE, Blinova MI,

- Pinaev GP, Tentler DG (2009). Analysis of Extracellular Matrix Proteins Produced by Cultured Cells. *Tsitologiya*, 51(8):691-696.
- 96) Hoch AI, and Leach JK (2014). Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. *Stem Cells Transl Med*, 3: 643.
- 97) Xu Y, Shi T, Xu A, Zhang L (2016). 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSCs injected into ischemic kidney. *J Cell Mol Med*. 20(7): 1203-1213.
- 98) Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*, 7:14.

謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院 総合化学院 総合化学専攻 細胞培養工学研究室において行った研究をまとめたものである。

本研究を遂行し本論文の執筆にあたり、終始懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました北海道大学大学院 工学研究院 高木 睦 教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文をご精読いただき、貴重な意見を賜りました、北海道大学大学院 工学研究院 大川 徹 教授、松本 謙一郎 教授、ならびに北海道大学 理学研究院 坂口 和靖 教授に感謝の意を表します。

本研究を進める上で、蛍光細胞の作成にご協力いただいた、岡山理科大学 フロンティア理工学研究所 岩井 良輔 講師に深謝いたします。

研究活動において、常日頃から御心配を賜りました、北海道大学大学院 工学研究院 恵良田 知樹 准教授に心より感謝いたします。また、本研究を行うにあたり、多大なる御助言と御協力を賜りました、北海道大学大学院 工学研究院 藤原 政司 助教に心より感謝いたします。最後に、日頃から研究成果等の討議において有益な御助言、御協力を賜りました、北海道大学大学院 総合化学院 総合化学専攻 細胞培養工学研究室の皆様へ深く感謝いたします。

2021 年 3 月