



## 高分子を用いた三次元培養による 間葉系幹細胞の特徴と機能についての検討

常 徳華\*1 朱 燦基\*4 堀川 雅人\*2 小林 正樹\*2 木田 克彦\*2 王 威\*3 小野 稔\*4

\*1 東京大学附属病院再生医療・細胞治療講座 \*2 日産化学株式会社

\*3 香港維健医薬集团有限公司

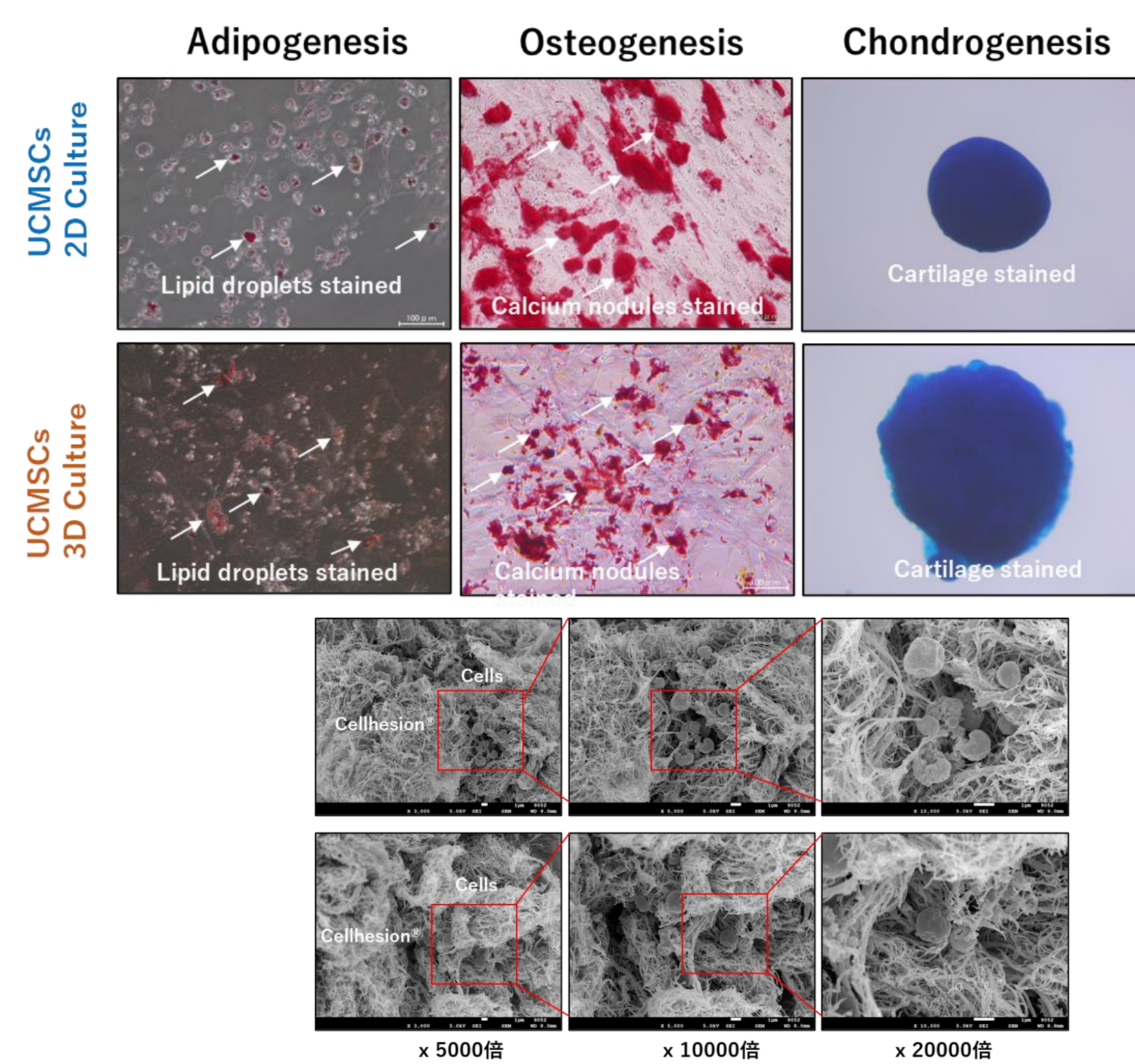
\*4 東京大学医学部附属病院心臓外科

### 研究目的

「再生医療・細胞治療研究講座」は高分子培養基材を用いた三次元ヒト臍帯由来間葉系幹細胞(UCMSCs)の大量培養」とUCMSCに関する画像診断の開発などを推進する目的である。

### 間葉系幹細胞(MSCs) 3D培養したUCMSCsの分化能 2Dと3D培養UCMSCsの比較

間葉系幹細胞(MSCs)とは生体内に存在する体性幹細胞の一つで、中胚葉に由来する組織であり、骨、軟骨、脂肪などに多分化能をもつ細胞であり、脂肪や骨髄、臍帯など様々な組織から採取することが可能である。MSCsは細胞増殖促進効果、抗炎症効果、血管新生促進効果などを持つサイトカイン・増殖因子を分泌し、パラクリンを介して組織修復を支持することが明らかにされている。MSCsの培養において、2Dと3Dの2種類に分類され、3D培養することにより、細胞の凝集塊を形成し、より生体内に近い培養環境である三次元的な状態で細胞を増殖し、MSCsの特徴を維持しながら細胞の機能を高めることが可能となる。



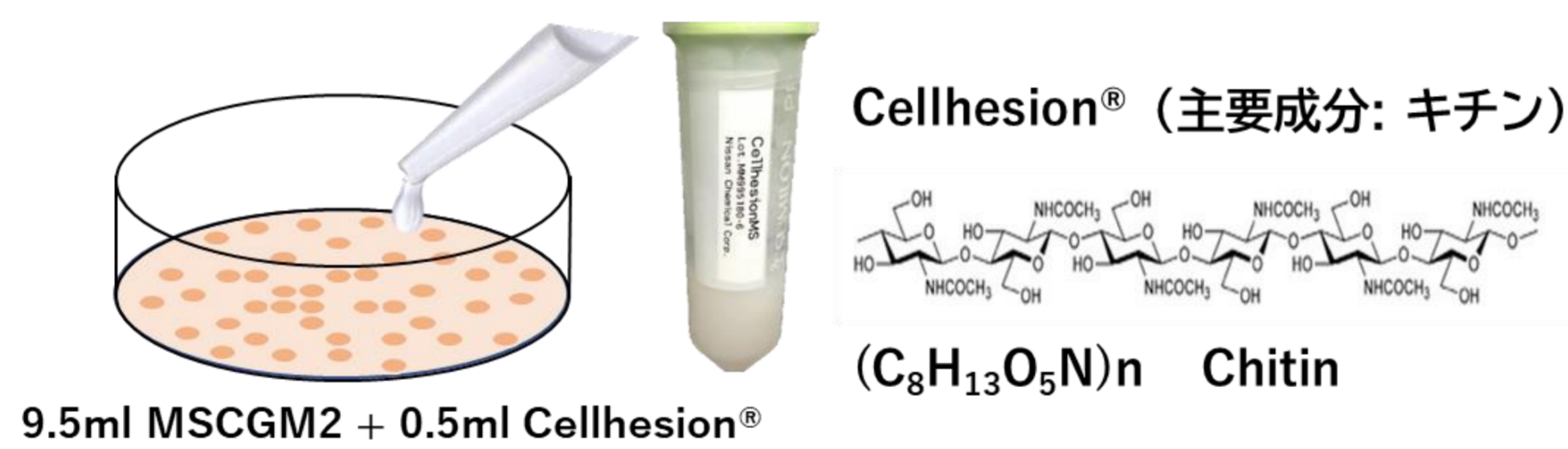
主な特徴	2次元細胞培養	3次元細胞培養
細胞の形状	平坦で引き伸ばされている	細胞の自然な形状が保たれていて、細胞極性がある
細胞と培地の間の接触	細胞が培地成分に均一にさらされている	生理学的環境と同様に、細胞の周囲に存在する培地成分の濃度に勾配がある
細胞間結合	細胞間結合が見られる割合が低く、生理学的環境と異なる	細胞間結合が広く見られ、細胞間のコミュニケーションが可能である
細胞分化	骨、脂質、軟骨への分化が保たれている	骨、脂質、軟骨への分化能が保たれている
間葉系幹細胞マーカー	CD73, CD90, CD105 が陽性、CD11b, CD19, HLA-DR が陰性である	CD73, CD90, CD105 が陽性、CD11b, CD19, HLA-DR が陰性である
mRNA発現	OCT4, NANOG, CXCR4	OCT4, NANOG, CXCR4の量がより多い
細胞増殖	細胞が増殖している	細胞増殖率が高くなる
血管分泌因子	HGF, VEGF, IL-6, IL-8	HGF, VEGF, IL-6, IL-8の量が培養時間と共に増加し、より多くなった
血管新生	管腔面積、総延長および分枝点数が見られた	管腔面積、総延長および分枝点数がより多く見られた

### 研究内容・課題

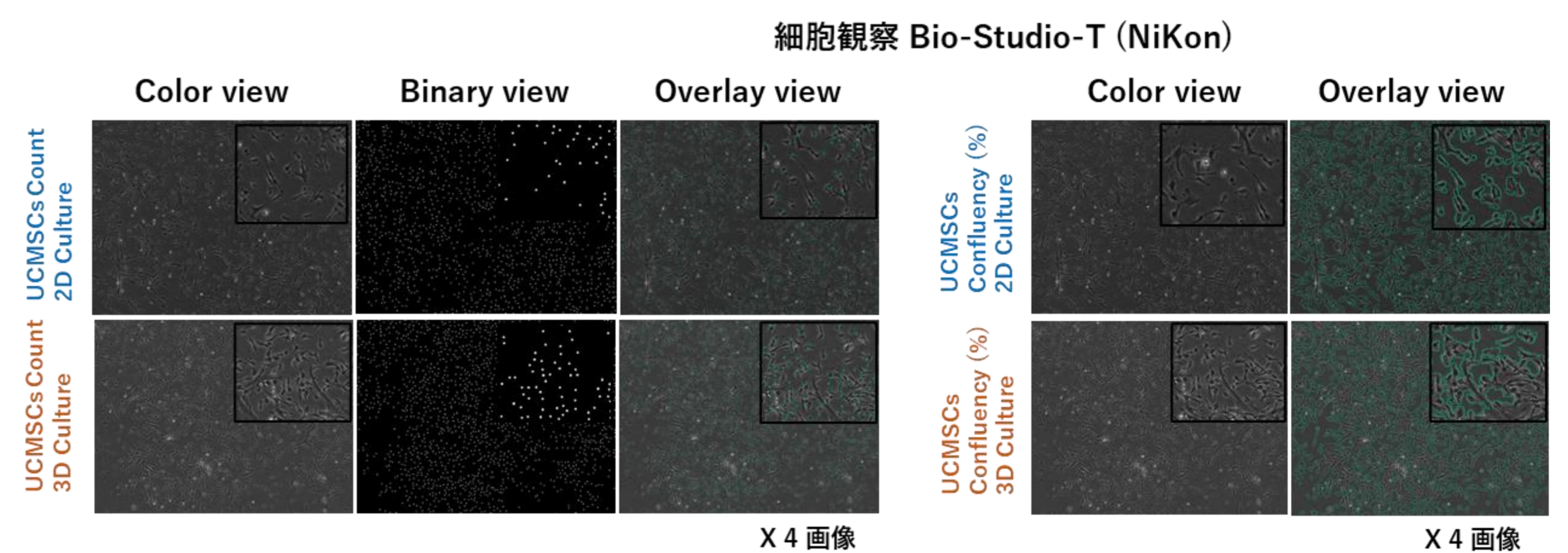
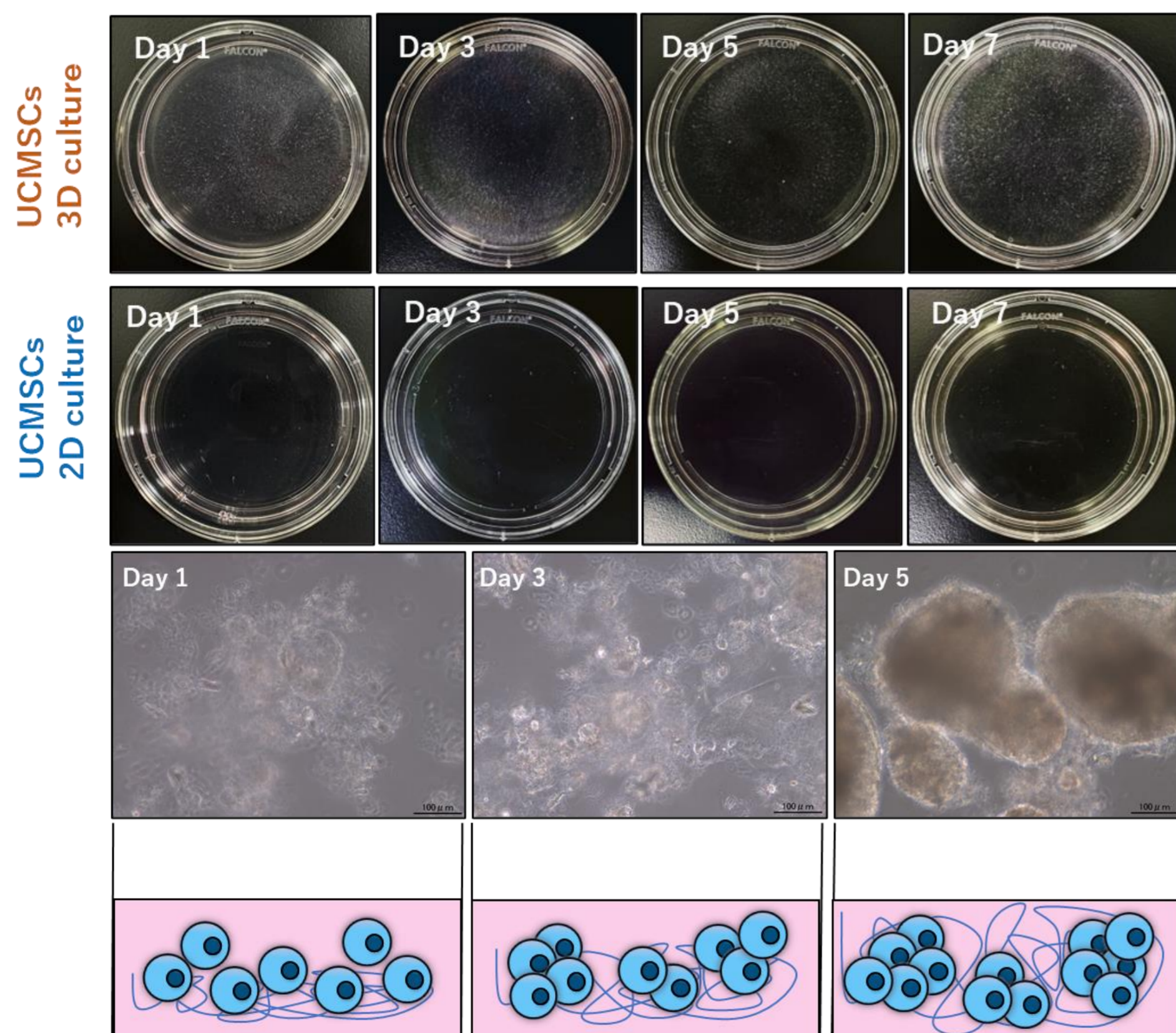
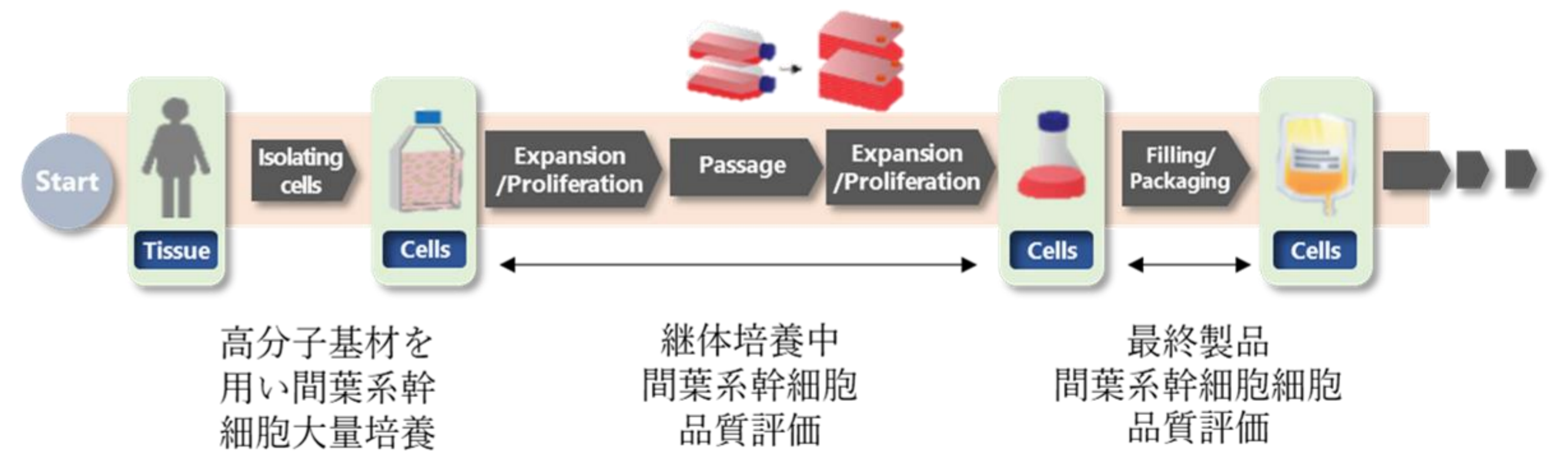
培養基材Cellhesionで培養したMSCsは、従来の2D培養された細胞に比べ約7倍の抗炎症作用を示しており、様々な疾患の治療への応用が期待されている。令和4年度の本研究では、培養基材Cellhesionを用いた2Dと3D培養UCMSCs特徴について比較し、検討した。

### Cellhesion® 3D培養の特徴

Cellhesionを用いた3D培養することにより、細胞の凝集塊を形成し、より生体内に近い培養環境である三次元的な状態で細胞を増殖し、間葉系幹細胞の特徴を維持しながら細胞の機能を高めることが可能となる。



### 細胞品質評価プロセス



細胞品質評価については、3D培養後に、基材と細胞を分離させ、位相差画像診断技術を用い、形態学的に2Dと3D培養したUCMSCsの細胞型や、占有面積率、周長、縦幅、横幅などを品質評価を行った。2D培養に比べ3D培養ではUCMSCs細胞数が多く、Confluency%が高く見られた。

### まとめ

- 3D培養したUCMSCsは間葉系幹細胞の特徴である骨、軟骨、脂肪への分化能が保たれている。2D培養に比べ3D培養では細胞の増殖が高まり、UCMSCsより分泌された血管分泌因子HGF、VEGF、IL-6、IL-8についてはその量が増加していることが明らかとなった。In vitro管腔形成試験で、2D培養に比べ3D培養では血管新生の管腔面積、総延長及び分枝点数が多く見られた。
- 間葉系幹細胞の未分化能・遊走能が保たれており、2D培養では得られない大量かつ高い細胞活性が見られることから、3D培養した間葉系幹細胞は再生医療・細胞治療などへ応用することが期待される。

謝辞: 細胞品質評価につきまして、画像解析をしていただいた株式会社ニコンに御礼申し上げます。