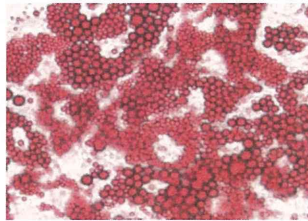


3) 脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導時の脂肪細胞特異的蛋白質発現解析

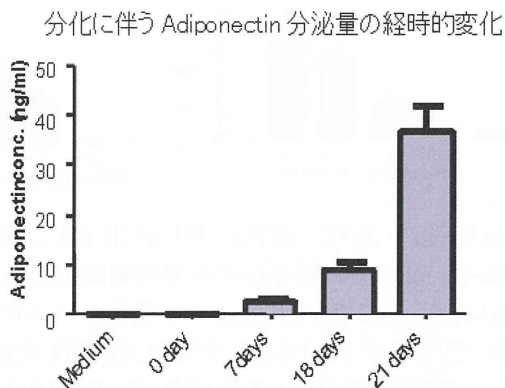
新鮮内臓脂肪組織より調製した脂肪前駆細胞は、分化誘導により、oil-red O により赤く染色される脂肪滴をもつ脂肪細胞へと分化する細胞を含むことを確認した(図 5)。

【図 5】脂肪前駆細胞の脂肪細胞分化



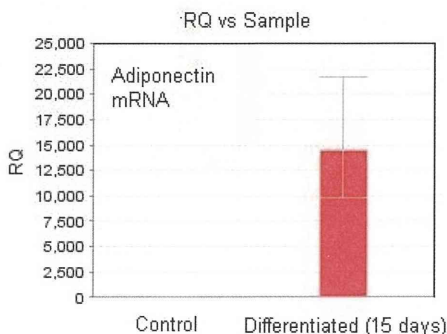
分化誘導時の培養上清中の Adiponectin 量を ELISA により調べた結果、分化に伴い Adiponectin の分泌増加傾向が認められた(図 6)。現在譲渡可能な 9 ロット及び新規に調製した糖尿病患者由来の 1 ロットについても同様の結果を確認した。

【図 6】脂肪細胞分化と Adiponectin 産生



この変化に関して、リアルタイム PCR を用いた mRNA 発現解析の結果、Adiponectin mRNA の発現は、分化誘導しない細胞 (Control) では認められないが、分化した脂肪細胞 (Differentiated) において、発現誘導が認められ、分化に伴う Adiponectin の産生量の増加は転写促進によるものであることが示された(図 7)。

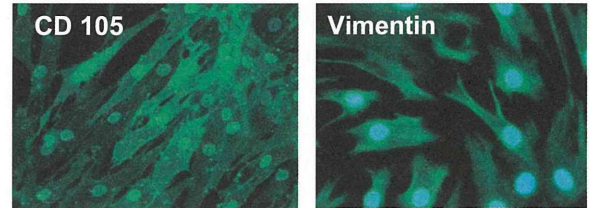
【図 7】転写レベルでの Adiponectin 発現制御



4) 滑膜細胞および脂肪前駆細胞の間葉系幹細胞としての分化能の検討

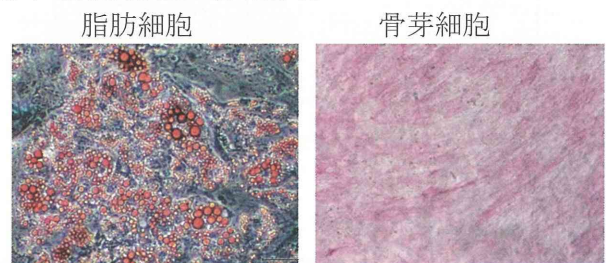
関節リウマチ患者由来滑膜細胞は、細胞免疫染色解析により間葉系幹細胞のマーカーとしても利用される CD105 及び Vimentin 陽性を示した(図 8)。

【図 8】滑膜細胞の免疫染色



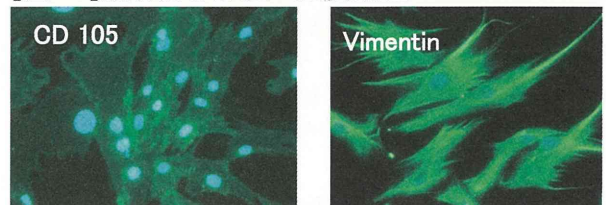
滑膜細胞を分化誘導することにより Oil-red O により赤染される脂肪細胞及びアルカリフォスファターゼ活性陽性の骨芽細胞へと良好に分化する細胞が認められた。代表的な結果を以下に示す(図 9)。また分化した脂肪細胞において Adiponectin の産生を認めた。変形性関節症患者由来滑膜細胞についても検討し、同様の結果を得た。

【図 9】滑膜細胞の分化確認



また脂肪前駆細胞も、細胞免疫染色解析により、CD105 及び Vimentin 陽性を示した(図 10)。

【図 10】脂肪前駆細胞の免疫染色



脂肪前駆細胞の分化誘導によりアルカリフォスファターゼ活性陽性の骨芽細胞へと分化する細胞を確認した(図 11)。糖尿病患者由来の 1 ロットについても、同様の結果を確認した。

【図 11】脂肪前駆細胞の骨芽細胞分化



D. 考察

1) ウイルス(HBV, HCV, HIV)及び梅毒否定試験

当初は酵素活性測定法を検討し、HCV 及び HIV については市販のプロテアーゼ活性測定キットを用いて陽性対照実験を行い、実施可能であることを確認したが、リアルタイム PCR システムの導入により、より高感度かつ効率的で、新規なウイルス否定試験系の検討が可能となったため、本システムによる検討を進めた。

今回設定したリアルタイム PCR 法による HBV ウイルス検出用試験は、ウイルスゲノム DNA を PCR により短時間で増幅し、増幅産物の蛍光強度をリアルタイムで測定することにより、ターゲット DNA の存在/非存在を自動判定するシステムである。細胞へ感染し、ゲノムに組み込まれた HBV ウイルス DNA の高精度で迅速な検出が可能と考えられる。VG023 を用いた陽性対照実験により、0.01 pg から 100 pg までの DNA 量に対して Presence と判定され、検出幅及び検出感度は良好であった。今回試験に用いたヒト不死化 B 細胞株の DNA 量(100 ng)は、判定のために十分な量と考えられる。ヒト新鮮組織より調製した滑膜細胞(計 17 ロット)及び脂肪前駆細胞(計 9 ロット)についても試験を本実施し、HBV 感染を否定することにより高品質化を図る予定である。また当バンク保有のヒト由来細胞株の中で検査が必要な株についても順次適用していく。今後は現在検討中の梅毒菌、HCV 及び HIV 感染否定試験系としてリアルタイム PCR による同様の検出系を構築する予定である。

2) 滑膜細胞の炎症反応性の検証

関節リウマチ或いは変形性関節症患者由来の滑膜組織より調製した滑膜細胞の品質管理として炎症反応性に関する機能的性状について調べた。関節リウマチ患者由来の滑膜細胞において、炎症性サイトカイン TNF- α を培養系に添加して、MMP-3 及び IL-6 の産生量を調べた結果、濃度依存的な MMP-3 及び IL-6 の産生促進効果が認められ、炎症反応性を保持していることが明らかとなった。この反応性に関して高精度な mRNA 発現解析を行い、蛋白質レベルの反応性が、転写レベルで制御されていることを明らかにした。

調製した滑膜細胞は、関節リウマチ患者の滑膜で生じる炎症反応をある程度反映していることが示唆され、炎症性反応を指標とした抗リウマチ薬の研究開発等に活用可能と考えられた。また変形性関節症患者由来の滑膜細胞は、関節リウマチ研究における対照としての利用だけでなく、原因が明確でない本疾患解明のための基礎研究等への利用が期待される。

3) 脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導時の脂肪

細胞特異的蛋白質発現解析

脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化に伴う Adiponectin の分泌増加は転写レベルにおける発現誘導により生じることが明らかとなった。Adiponectin は脂肪細胞の分泌ホルモン的一种で、血糖降下作用等様々な生理活性をもつことが知られている。よって脂肪滴を有するという形態的特徴だけでなく機能的にも分化していることが示唆され、糖尿病、肥満等の生活習慣病研究への幅広い利用が考えられる。

4) 滑膜細胞および脂肪前駆細胞の間葉系幹細胞としての分化能の検討

今回の分化実験により、バンクで調製した滑膜細胞は、脂肪細胞及び骨芽細胞への分化能をもつ細胞を含むことが明らかとなり、再生医療研究のための基礎実験等における細胞のソースとして活用可能と考えられる。滑膜細胞はまた軟骨細胞へ分化することが良く知られており、組織幹細胞のソースとして関節損傷に対する再生医療研究における臨床試験が進められている。バンクの滑膜細胞についても軟骨細胞等の他の有用な細胞への分化能を検討し、付加価値を高めてゆくことが再生医療研究における利用促進のために必要である。

E. 結論

本研究では、新鮮組織より調製した細胞或いはヒト由来細胞株についてのウイルス等の否定試験系としてリアルタイム PCR 法を検討し、迅速かつ高精度の HBV 否定試験系を設定した。今後はバンクのヒト細胞について適用していく。またバンクで調製した新鮮組織由来細胞の機能的性状を精査するためにリアルタイム PCR 法を用いた mRNA の発現解析を可能とした。滑膜細胞の機能的性状に関しては、炎症性サイトカイン TNF- α による反応性が転写レベルで制御されていることをリアルタイム PCR 解析により明確にした。また間葉系幹細胞としての性状解析により、譲渡用の滑膜細胞及び脂肪前駆細胞が、脂肪細胞及び骨芽細胞への分化能を有することが判明した。これらの細胞の再生医療研究への利用が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表

大西-笠松 礼、小阪 拓男、佐藤 元信、吉田 東歩、手術摘出組織の研究利用－関節リウマチ患者由来滑膜細胞について－日本組織培養学

会・第84回大会、東京、2011年5月27日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

無血清培養法等の新規培養技術の開発

所 属 株式会社プライマリーセル
研究分担者 佐藤 貴繁

研究要旨 創薬や再生医療などの研究に用いる細胞培養には、ほとんどの場合、血清含有培地が使用されている。血清の使用には生理活性物質の干渉や感染リスクなど多くの問題がある。本研究では無血清培養法など新規培養技術の開発により、ヒト細胞の品質の恒常性の向上、保存性の向上、効率よく幹細胞を分離する方法などについて検討した。

A. 研究目的

厚生労働省が重点課題の一つとしている創薬や再生医療分野の研究においては、多種多様な細胞が培養され、研究開発のツールとして用いられている。しかしながら、それらの培養で用いられている一般的な培地には血清が含有されている。このような血清含有培地を用いた場合、血清中に含まれる生理活性物質の干渉により、バイオマーカー探索に障害となる。さらに血清を用いた細胞培養には、ロット間差や感染リスク等様々な問題が存在し、基礎研究のみならず、将来的な医療応用への大きな障壁となる。従って、血清を使用しない、無血清培地による培養法を確立することで、幅広い分野に貢献することが出来る。本研究では、無血清培養法など新規培養技術の開発により、ヒト細胞の品質の恒常性の向上、ヒト細胞の保存方法の向上、効率よく幹細胞を分離する方法、提供された手術摘出組織から調製可能な幹細胞の検討、機能細胞への分化条件の検討を行った。

1) ラットの脂肪組織由来の幹細胞の確立と分化条件の検討

本研究では、ラット腸間膜脂肪組織およびラット皮下脂肪細胞組織より調製した細胞群より幹細胞を採取し、各細胞へ分化条件を見いだすことを目的とした。脂肪組織より得られた細胞群には、前駆脂肪細胞が含まれている。そこで、まず得られた細胞群を継代することにより、幹細胞特異的マーカーを発現している細胞が得られる条件を検討した。次に確立したラット幹細胞を無血清培地にて培養する系を確立し、次の段階で、本検討で得られた培養方法をヒト細

胞に応用することを目指す。

2) 間葉系幹細胞の分化能の検証と培養条件の検討

ヒト間葉系幹細胞は、線維芽細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞等の間葉系に属する細胞の幹細胞として仮定されている細胞である。近年、骨髄や、脂肪組織、胎盤など、様々な組織から、間葉系幹細胞と同等される多分化能をもつ細胞が発見され、骨や血管、心筋の再構築などの再生医療への応用が期待されている。

ヒューマンサイエンス(HS)研究資源バンクには、国立成育医療研究センター・梅澤明弘らの研究グループによって寄託されたヒト正常間葉系幹細胞が27種類登録されている。これらの間葉系幹細胞は骨髄、胎盤などから、大串らの方法に従って分取されたとしている。これらの多種類のヒト間葉系幹細胞を用いて、培地の評価を行い、間葉系幹細胞の増殖と分化に適した無血清培地の開発を試みる。さらに、これらの細胞の分化能の検討結果と、分化誘導法についての情報は、ヒト正常間葉系幹細胞の品質と付加情報の向上につながることを期待される。

今年度は、従来の培地を用いて分化能の検証を行い、次年度の無血清培地による培養法との比較のための、個々の細胞の分化能の基礎的な情報を得た。本報告はその中間報告である。

3) 筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系の開発

横紋筋は、糖を代謝して熱やエネルギーに変換する主要な組織であり、横紋筋における糖代謝は糖尿病治療薬などの創薬における重要なターゲットで

ある。分化した横紋筋は増殖しないため、実験動物を用いる、あるいは未分化な筋芽細胞や筋衛星細胞から培養下で誘導した横紋筋が研究に利用されている。後者の例としては、マウスの C₂C₁₂ 筋芽細胞株や、初代の筋芽細胞で横紋筋への分化系がある。一方、ES 細胞や iPS 細胞、間葉系幹細胞等の未分化な幹細胞から効率よく横紋筋を分化させる実験系は、MyoD や myogenin 遺伝子の導入によるダイレクトプログラミング以外にはほとんど確立されていない。

本研究では効率よく横紋筋を分化させる系の開発を行うことを目的し、横紋筋を研究材料とする創薬研究への貢献をめざしている。今年度は、ラット骨格筋由来の筋芽細胞株 L6、ヒト横紋筋肉腫由来 RD を横紋筋誘導モデルの材料とした。

Wnt は細胞間相互作用に様々な働きを持つ細胞外因子である。筋の発生においては、胚発生期に沿軸中胚葉に筋節を誘導することが知られており、筋の初期分化を制御しているとされている。この因子に注目し、Wnt の作用をミミックする塩化リチウムの効果を検討した。本報告はその中間報告である。

B. 研究方法

1) ラットの脂肪組織由来の幹細胞の確立と分化条件の検討

1-1) ラットの脂肪組織由来の幹細胞の調製法

Sprague-Dawley rats を頸椎脱臼により安楽死させ、速やかに腸間膜内臓脂肪組織を摘出し、Hanks' balanced salt solution (HBSS, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, U.S.A) で洗浄してから、血管およびリンパ節を除いてハサミで小断片にした。次に 0.2 % collagenase (Type II, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) および 1.0 % bovine serum albumin (BSA, Fraction V, Sigma, St. Louis, MO, USA.) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen Corporation) を加え、37 °C で 40 分間、震盪させながらインキュベートした。次に 600 μm ナイロンメッシュ (共進理工、東京) で濾過して、未消化の組織塊片を除き、HBSS を加えてから 800 ×g、10 分間、4 °C で遠心した。沈殿物に DMEM を加え、100 μm ナイロンメッシュ (共進理工、東京) で濾過して、再び未消化の組織塊片を除き、HBSS を加えてから 800 ×g、10 分間、4 °C で遠心した。沈殿した mesenteric-stromal vascular cells の数をカウントし、 0.5×10^5 cells/cm² の割合で、ゼラチンコートしたディッシュへ播種した。

1-2) RNA 抽出法

細胞を Saline で洗浄し、1 mL の TRIZOL Reagent (Sigma-Aldrich Japan) を加えて細胞を溶解

させ、スクレープして 1.5 mL チューブに回収した。さらにピペッティングにより細胞を完全に溶解した後、室温で 10 分以上インキュベートした。200 μL のクロホルムを加えて vortex mixer で強く 30 秒間攪拌した後、20,000 ×g、10 分間、4 °C の遠心により相分離を行った。上清を別の 1.5 mL チューブに採取し、上清と同量の冷イソプロパノールを加えて攪拌した後 10 分間インキュベートし、20,000 ×g、10 分間、4 °C の遠心により RNA を析出させた。上清を除去し、1 mL の 70 % エタノールにて洗浄後、20,000 ×g、5 分間、4 °C で遠心分離して上清を除き、風乾させた。これに DEPC 処理した精製水を加えて総 RNA 溶液とした。得られた RNA 溶液の濃度は吸光光度計 (ナドロップ ND-1000, Thermo Fisher Scientific) を用いて 260 nm の吸光度を測定することにより算出した。

1-3) cDNA 合成法

RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) を使用した。抽出・精製した total RNA 1 μg 分を RNase Free Water で希釈し 12 μL にし、70 °C で 5 分間インキュベートした。これに 5x reaction buffer 4 μL、2RiboLockTM Ribonuclease Inhibitor (20u/μl) 1 μL、10mM dNTP mix 2 μL を加え、よく攪拌し、スピンドウンした後 37 °C で 5 分間インキュベートした。RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μL を加え、25 °C で 10 分間、次に 42 °C で 60 分間、つづいて 70 °C で 10 分間インキュベートし、cDNA を合成した。

1-4) リアルタイム PCR による遺伝子解析

LightCycler 480 PCR Real-Time PCR Instrument (Roche Applied Science) を使用し、標準的なプロトコールによりリアルタイム PCR を行った。4 μL RT product、5 μL 2x LightCycler 480 SYBR Green I Master、0.5 μL forward primer および 0.5 μL reverse primer を含有した 10 μL PCR 反応溶液を使用した。96 穴プレート上で反応を行い、反応条件として、95 °C、5 分の後、95 °C、10 秒に続く 72 °C、25 秒のプログラムを 45 サイクル行った。

2) 間葉系幹細胞の分化能の検証

細胞の増殖に際しては、寄託者により指定された増殖培地 (指の骨髄、骨膜、軟骨、皮膚由来正常間葉系幹細胞の場合、POWERDBY10、胎盤由来正常間葉系幹細胞の場合、主に Plusoid-M または M061101 (いずれも製造・肥田商店、販売 GP バイオサイエンス社) を用いた。なお、これらの培地の成分は公表されていないが、血清は含まれているとされている。

骨芽細胞の分化誘導に際しては、10 mM β -グリセロリン酸、50 μ g/ml L-アスコルビン酸、0.1 μ M デキサメサゾンを含む培地に添加し、継代培養はせず、培地交換で3週間維持した。骨芽細胞分化の確認は、アルカリフォスファターゼ染色によった。細胞を4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で室温、5分間固定、純水で洗い、0.25 mg/ml naphthol AS-BI phosphate, 0.25 mg/ml fast red violet LB salt in 0.1 M Tris buffer (pH 8.5)で室温、10分間染色、水洗した。アルカリフォスファターゼ活性の細胞は赤く染色される。

脂肪細胞の分化誘導に際しては、0.25 μ M デキサメサゾン、0.5 mM イソブチルメチルキサンチン (IBMX), 0.1 mM インドメタシン、5 μ g/ml インスリン (ヒト・リコンビナント)で4日処理、5 μ g/ml インスリンのみで3日処理からなる一連の処理スケジュールを3ラウンド繰り返した(計3週)。脂肪細胞は、oil-red Oにより中性脂肪顆粒を染色することにより検出した。

3) 筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系の開発

HS 研究資源バンクの保存株 L6 細胞、RD 細胞を用いた。L6 細胞は、type I コラーゲンをコートした培養器に播種し、コンフルエントまで 10% ウシ胎児血清を含む DMEM で培養した。分化誘導は低濃度の馬血清と様々な濃度の LiCl の継続処理、または前処理によって検討した。RD 細胞は、DMEM + 10% ウシ胎児血清を基礎培地として培養し、LiCl の前処理によって筋細胞の誘導を行った。免疫抗体染色は、細胞を 24 well plate のガラスカバースリップ上に播種、分化誘導処理後、4% パラホルムアルデヒド-PBS にて 5 分間固定、1% BSA、0.1% Triton X-100 を含む PBS で透過処理とブロッキングを行い、一次抗体処理、引き続き一次抗体を認識する FITC 標識もしくは TRITC 標識二次抗体でそれぞれ処理した。一次抗体としては、抗 myosin heavy chain マウスモノクローナル抗体 (R & D systems, Inc., Clone MF20, 1/200 希釈、抗 desmin ウサギポリクローナル抗体 (Dako, Co., Code No. A0611, 1/200 希釈)を用いた。

(倫理面への配慮)

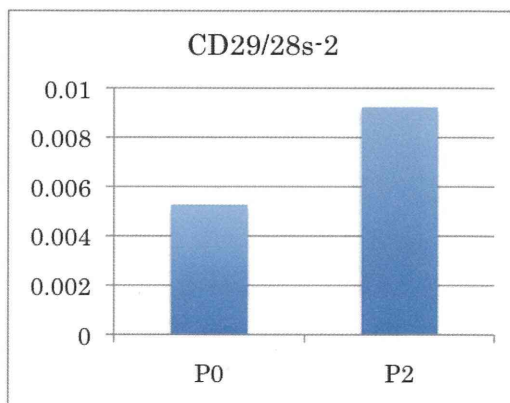
本研究はヒト由来細胞に関しては「臨床研究に関する倫理指針」及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて実施した。研究分担者佐藤貴繁が所属する株式会社プライマリーセルにおいては、ヒト試料の取扱いに関しては親会社であるコスモ・バイオ株式会社において、コスモ・グループ生命倫理委員会に諮り、上記指針を踏まえて承認をうけて実施した。

C. 研究結果

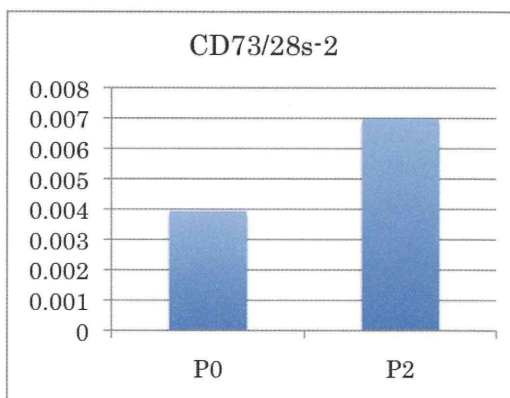
1) ラットの脂肪組織由来の幹細胞の確立と分化条件の検討

ラット皮下組織より、成熟脂肪細胞を除いた細胞群を採取し、そのまま培養した細胞群および2回継代後の細胞群より RNA サンプルを作成した。リアルタイム PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行ったところ、幹細胞のマーカーである CD29 の発現量が継代を行っていない細胞群(P0)と比較して2回継代した細胞群(P2)での発現量が高くなっていた(図1 CD29)。別の幹細胞のマーカーである CD73 の発現量についても同様に、継代を行っていない細胞群(P0)と比較して2回継代した細胞群(P2)での発現量が高くなっていた(図2 CD73)。

【図1 CD29】

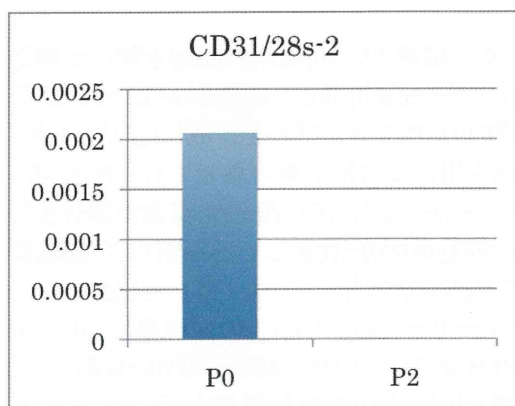


【図2 CD73】

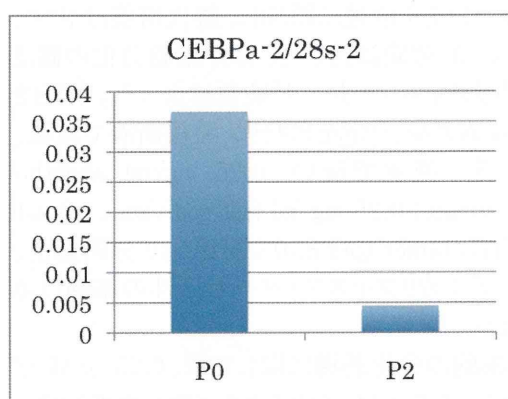


次に幹細胞のネガティブマーカーである CD31 の発現量を検討したところ、継代を行っていない細胞群(P0)と比較して2回継代した細胞群(P2)での発現量が低くなっていた(図3 CD31)。別の幹細胞のネガティブマーカーである CD45 の発現量についても同様に、継代を行っていない細胞群(P0)と比較して2回継代した細胞群(P2)での発現量が低くなっていた(図4 CD45)。

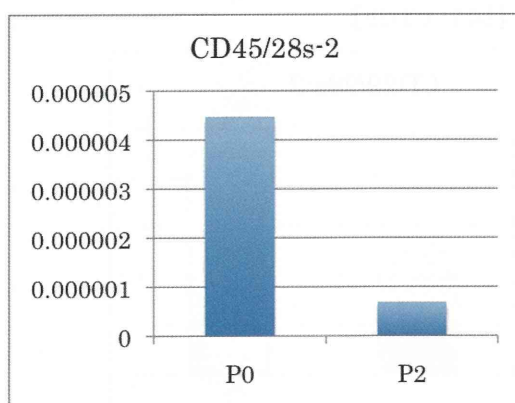
【図3 CD31】



【図6 CEBP α -2】

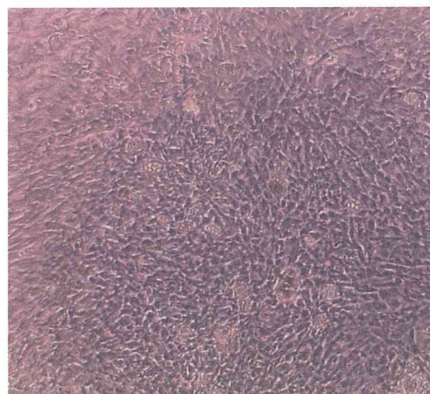


【図4 CD45】



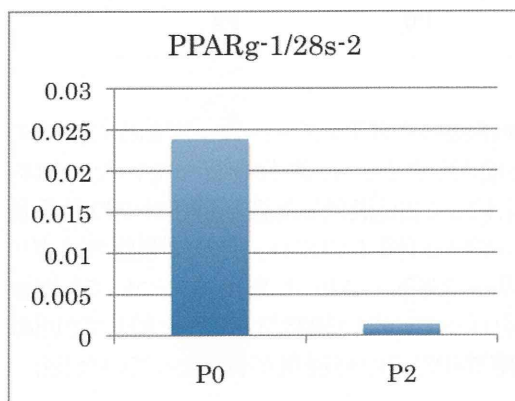
次に、ラット皮下組織より、成熟脂肪細胞を除いた細胞群を2回継代した細胞群(P2)の分化能を確認した。細胞群(P2)を脂肪細胞へ分化を引き起こす強制分化剤を添加せずに培養した場合、脂肪細胞が認められなかった(図7)。

【図7】幹細胞(通常培養)



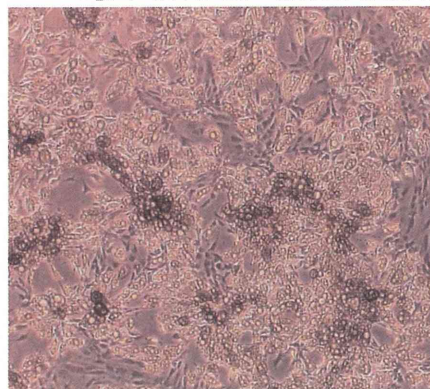
さらに脂肪細胞のマーカーである PPAR γ -1 の発現量を検討したところ、継代を行っていない細胞群(P0)と比較して2回継代した細胞群(P2)での発現量が低くなっていた(図5 PPAR γ -1)。別の脂肪細胞のマーカーである CEBP α -2 の発現量についても同様に、継代を行っていない細胞群(P0)と比較して2回継代した細胞群(P2)での発現量が高くなっていた(図6 CEBP α -2)。

【図5 PPAR γ -1】



一方、細胞群(P2)を脂肪細胞へ分化を引き起こす強制分化剤を添加して培養した場合、脂肪細胞への分化が認められた(図8)。

【図8】幹細胞の脂肪細胞分化



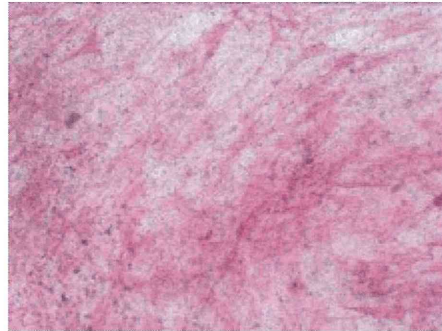
2) 間葉系幹細胞の分化能の検証

検討した間葉系幹細胞は、過剰指から採取された細胞 18 株(内、骨髄由来 3 株、骨由来 3 株、軟骨由来 1 株、骨膜由来 1 株、皮膚由来 1 株)、胎盤から採取された細胞 9 株の、合計 27 株である。β-グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメサゾンによる骨芽細胞への分化誘導検討結果を以下に示す。

細胞名	由来	骨芽細胞	
		処理区	対照区
PL502	胎盤	±	—
PL505	胎盤	—	—
PL507	胎盤	±	±
PL508	胎盤	+	—
PL532	胎盤	>+	—
PL512	胎盤	>+	—
PL514	胎盤	+	—
PL516	胎盤	+	±
PL518	胎盤	—	—
Yub621c	指(軟骨)	+	±
Yub621b	指(骨)	++	+
Yub621BMC	指(骨髄)	+	±
Yub622	指(骨髄)	++++	+++
Yub623	指	±	±
Yub 10F	指(骨髄)	+++	+++
Yub625	指	+++	+++
Yub631	指	++	+
Yub632	指	++++	+++
Yub633	指	++++	+++
Yub634	指		+++
Yub635	指		+++
Yub637b	指(骨)	+++	+++
Yub636	指	++	+
Yub642p	指(骨膜)	+++	+
Yub642	指	+++	+
Yub637s	指(皮膚)	++	+
Yub642b	指(骨)	+++	+

このように、ほぼ全ての細胞について、骨芽細胞の分化が確認できた(図9)。分化誘導処理を行わない対照との比較では、誘導処理を行った方が分化の頻度が高い傾向がみられた。対照で骨芽細胞が自律的に分化する理由としては、培養期間中に細胞密度が高くなることが挙げられる。細胞の由来で比較すると、骨芽細胞の分化能は、胎盤由来の間葉系幹細胞で低い傾向が認められた。

【図9】Yub622 細胞の骨芽細胞分化



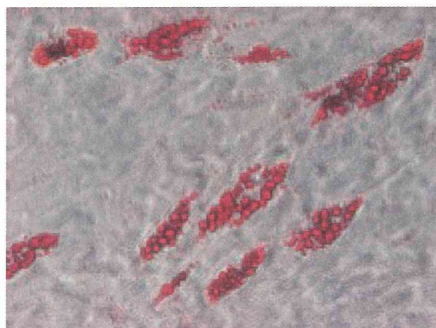
胎盤由来の 2 細胞(PL505、PL518)では、骨芽細胞が誘導できなかった。ただし、この結果は今回の分化誘導処理条件でのものであり、異なる処理条件によって分化することも考えられるため、これらの細胞が間葉系幹細胞であることを排除する結果ではない。

脂肪細胞への分化は、デキサメサゾン、IBMX、インドメタシン、インスリンにより誘導した。結果を次に示す。

細胞名	由来	脂肪細胞	
		処理区	対照区
PL502	胎盤	+	±
PL505	胎盤	+	±
PL507	胎盤	+	>+
PL508	胎盤	>+	>+
PL532	胎盤	++	>+
PL512	胎盤	++	>+
PL514	胎盤	+	—
PL516	胎盤	+	—
PL518	胎盤	+	±
Yub621c	指(軟骨)	+++	+
Yub621b	指(骨)	+	±
Yub621BMC	指(骨髄)	++	±
Yub622	指(骨髄)	+++	+
Yub623	指	+	—
Yub 10F	指(骨髄)	++	—
Yub625	指	+	—
Yub631	指	++	未確認
Yub632	指	++	未確認
Yub633	指	+	—
Yub634	指	+	—
Yub635	指	+	—
Yub637b	指(骨)	+	未確認
Yub636	指	+	—
Yub642p	指(骨膜)	++	+
Yub642	指	++	+
Yub637s	指(皮膚)	+++	—
Yub642b	指(骨)	+	—

脂肪細胞の分化は全ての細胞について確認できた(図10)。対照との比較では、誘導処理を行った方が分化の頻度が高かった。細胞の由来で比較すると、胎盤由来の間葉系幹細胞では、骨芽細胞分化と同様に脂肪細胞への分化能が低い傾向が認められた。

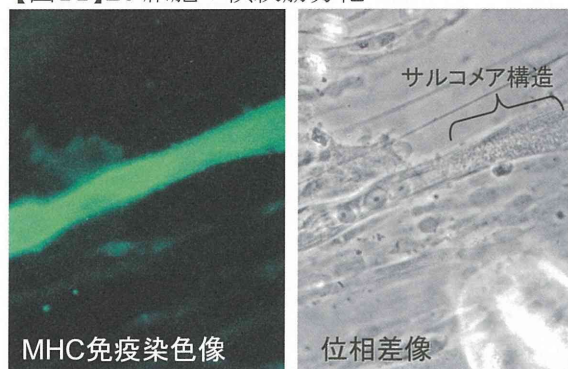
【図10】Yub 622 の脂肪細胞分化



3) 筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系の開発

L6 細胞に対して、0.1 - 1.0%の低血清下、2 - 10 mM LiCl の前処理を1 - 7日間行った。LiCl 処理濃度に依存して細胞増殖は抑制された。また、細胞はそれぞれ高 LiCl 濃度、低血清濃度でダメージを受ける傾向がみられた。前処理後、低血清で培養することにより、自発収縮する多核融合細胞が分化した。免疫蛍光染色により、これらの多核融合細胞にはミオシン重鎖(MHC)蛋白が認められた。また処理によってはサルコメア構造も観察された(図11)。これらの結果から、誘導された細胞は横紋筋細胞と考えられた。自発収縮する横紋筋が効率よく分化した処理の組合せは、10 mM LiCl、4 - 7日の前処理と1.0%血清処理の組合せ、5 - 7 mM LiCl、7日の前処理と1.0%血清処理の組合せであった。LiCl 処理しない培養においては、低血清処理により融合多核細胞の出現は認められたものの、自発収縮は全くみられなかった。

【図11】L6 細胞の横紋筋分化



RD 細胞では10%ウシ胎児血清下、20 mM LiCl による2日間の前処理を行った後、LiCl を除いてさらに5日間培養することにより筋細胞特異的なミオシン重鎖蛋白、中間径フィラメントのデスミンを発現する細胞の割合が対照より高くなることを認めた。

D. 考察

1) ラットの脂肪組織由来の幹細胞の確立と分化条件の検討

これまでに(株)プライマリーセルは、世界で初めてラット腸間膜脂肪組織から調製した前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞にまで分化誘導する新規培養法を確立している。本検討では、このノウハウを元に、ラット腸間膜内臓脂肪組織およびラット皮下組織より、成熟脂肪細胞を除いた細胞群を得た。この細胞群には、幹細胞の他に、脂肪細胞への分化能を高く有する前駆脂肪細胞やマクロファージも多く含まれている。そこで、数回の継代を行ったところ、脂肪細胞特異的マーカーの発現量が顕著に低下し、一方で幹細胞特異的マーカーの発現が増加した。従って、前駆脂肪細胞の割合が十分に低く、幹細胞を主とした細胞群を確立する事が出来たと考えられる。幹細胞の確認を含めて、得られた細胞を強制分化剤により脂肪細胞へ分化させる事が可能であるか検討した結果、得られた細胞が分化能を保有していることが確認された。今後は、さらなる検証として、得られた幹細胞を別の骨髄細胞へ分化させる系を検討し、多分化能を維持していることを確認する予定である。

また従来の幹細胞の培養には、主に血清含有の培地が用いられている。しかしながら、(1)血清にはロット差があるため、実験結果の再現性に問題があること、(2)血清中には多種多様な成分が含まれ、それら個々の成分の細胞の増殖性や分化に対する影響は必ずしも評価できないこと、(3)血清中に含まれる生理活性物質の干渉により、バイオマーカー探索に障害となること、(4)さらに、将来の再生医療における間葉系幹細胞の利用のためには、培地から動物由来の成分を排除すべきであること、等の課題がある。そこで、得られた幹細胞を無血清条件下で脂肪細胞へ分化させることを試みた。その結果、基礎培地と添加試薬の再検討により、ラット脂肪組織由来の幹細胞を無血清培地にて、脂肪細胞へ分化させることに成功した。今後は、本検討で得られたノウハウをヒトの細胞へ応用したい。

2) 間葉系幹細胞の分化能の検証

HS 研究資源バンクに登録されている27種類のヒト正常系幹細胞の分化能を検証し、ほぼ全ての

細胞において骨芽細胞への分化能、脂肪細胞への分化能が確認できた。これらの細胞の分化能は細胞採取機関である国立成育医療研究センターでは確認されていなかったため、本研究で得られた成果は細胞研究利用者への重要な情報となる。

本年度の研究で用いた分化誘導条件は、いずれもほぼ確立された手法であるが、ひとつの問題として、基本培地が血清を含んでいることが挙げられる。ヒト間葉系幹細胞を用いた創薬、再生医療研究には、無血清、成分既知の培地や、改善された分化誘導法が求められている。今年度の従来法を用いた分化誘導検証結果を土台として、次年度は無血清培地等の開発、分化誘導法の改善を計り、ヒト間葉系幹細胞の創薬研究への価値をさらに高めてゆきたい。

3) 筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系の開発

本研究では、塩化リチウム処理により、ラット筋芽細胞 L6、ヒト横紋筋肉腫細胞株 RD において横紋筋分化が促進されることを認めた。さらに L6 細胞においては、自律収縮する横紋筋が容易に誘導可能であり、非常に効率のよい分化誘導法であることを認めた。

Wnt は、レセプターである Frizzled を介して disheveled 蛋白をリン酸化し、リン酸化された disheveled が Axin 複合体を介して GSK-3 β による β -catenin のユビキチン化を阻害することにより細胞内 β -カテニンのプールを増大することにより作用を及ぼす。塩化リチウムは GSK-3 β の阻害剤であり、Wnt の作用をミミックすることが知られている。本研究の結果は、ラット筋芽細胞 L6 やヒト横紋筋肉腫 RD において Wnt によるシグナル伝達経路が横紋筋の分化に関与することを示唆している。

本成果は、一般的な細胞株と塩化リチウム処理という簡便かつ効率的な分化誘導法を提供することにより、分化した横紋筋を用いた創薬研究に貢献すると思われる。課題として、ヒト正常細胞を用いた効率的な横紋筋の誘導が挙げられる。今後は間葉系幹細胞、ヒト正常筋芽細胞などの細胞からの誘導についても検討したい。

E. 結論

本研究では、無血清培養法等の新規培養技術の開発に関して、ラットの脂肪組織由来の幹細胞を用いた検討を行った。脂肪組織由来より採取した細胞を数回継代することで、脂肪細胞特異的マーカーの遺伝子発現が減少すること、および間葉系幹細胞の特異的マーカーの遺伝子発現が増加する事をリアルタイム PCR 法と FACS により確認した。この細胞を用いて、無血清培地の検討を行ったところ、細胞の

接着および増殖が確認され、さらに脂肪細胞へ分化させることに成功した。なお、無血清培地では、培養プレートへのコートが必要であった。今後は、軟骨細胞、骨芽細胞への分化を試み、最終的にはヒト細胞へ応用する予定である。

培養技術の開発に関しては、ヒト正常間葉系幹細胞 27 株につき骨芽細胞、脂肪細胞への分化能の検討を行い、幹細胞としての性質が保証されることを確認した。また、Wnt 経路を活性化することによる効率の良い横紋筋への分化誘導法を開発中であり、横紋筋を用いたアッセイ系などへの応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

温度調整機能・圧力調整機能を持たせた保存容器・輸送容器等の開発

所 属 株式会社プライマリーセル
研究分担者 清水 恭子

研究要旨 「国民の健康の推進と確保」に資する「ヒト」研究の生物研究資源の基盤整備は厚生労働省の重要課題である。そこで本研究では生体機能を維持した初代細胞を多くの研究者に提供することを目的として、非凍結状態での細胞輸送技術の確立を試みた。本年度の研究では、温度維持稼働する定温輸送容器の開発を行い、これを用いた場合の細胞品質検証を行った。

A. 研究目的

不死化された株化細胞等の輸送には、液体窒素容器内で凍結保存されている細胞バイアルをドライアイス輸送、あるいは液体窒素を充填したドライシッパーによる輸送が一般的である。株化細胞は不死化操作などですでに生体本来の機能は限定されていることが多く、また生体機能の維持よりも、低い調製コストやロット間の均一性などが重要視されるため、凍結保存、凍結輸送は合理的であるといえる。

一方で、生体機能により近いといわれている初代細胞は、凍結により死滅するものも珍しくなく、仮に死滅から逃れた場合も、最大の長所である生体機能の喪失などが高頻度でおこる。これは特に貴重なヒト由来初代細胞においては深刻な問題である。現在新鮮なヒト非凍結初代細胞を使うことができるのは、一部の研究施設に限定されているが、安定的に輸送する方法が確立できれば、さらに幅広い研究者がこれらを利用することが可能となり、非凍結状態での保管や輸送技術の確立が望まれている。

非凍結環境下での保管、輸送を達成するには、保管容器、輸送容器の開発が不可欠である。特に輸送容器は温度管理できるものが必須である。今回我々は、乾電池で駆動可能な細胞定温輸送容器の開発を試みた。

今日、一般の配送業者が行っているクール便(冷蔵、冷凍)は、大変安価かつ敏速に配送が可能であり、研究用試薬全般の輸送に広く利用されている。しかし、その温度管理精度はあくまで食品の鮮度維持を目的としたものであり、冷蔵便で0℃以下から室温、冷凍便で-30℃から10℃程度の範囲で変動す

ることも珍しくない。このような温度管理精度では、生きた細胞の機能を維持したまま輸送することは不可能である。本研究では、生細胞の機能を維持したまま輸送を行うため、電池で稼働する定温輸送容器を開発することを目的としている。

さらに圧力を用いた細胞保存についても検討する。これまでに創価大学の清水らは、細胞に圧力をかけることで、細胞を凍結することなく保存する技術を確立している(特開2010-148401)。そこで、本技術を活用し、HPLCポンプを用いた細胞加圧容器中に生細胞を入れ、加圧状態で温度管理を行うことで、細胞の機能維持性能がさらに向上する条件を合わせて検討する。

1) 初代細胞を用いて至適温度の検討

ヒト初代細胞は入手がたいへん困難であり、また、様々な保温、輸送条件で試行錯誤するために用いることは倫理的にも許されるものではない。そこで我々は、ラット新生児由来初代心筋細胞、ラット成体由来肝細胞および臍島を用いて、輸送至適温度条件を検討した。品質の比較は、細胞の生存率、形状観察、および各種マーカー遺伝子の発現解析により行った。さらに心筋については拍動観察、臍島に関してはグルコース濃度依存性インスリン分泌量を測定し、これらを総合して品質判断基準とした。

2) 5℃ および 32℃ 輸送容器の試作と性能評価

至適温度の検討結果を踏まえて、定温輸送容器の設定温度は、万一の外気温の急激な変化においても、内部の細胞温度が凍結、あるいは38℃以上の

過温状態にならないこと、実際の細胞輸送の際の最大梱包サイズは、翌日ないし翌々日配送時で、外寸3辺計が120ないし140cm以下、3日以上の場合で外寸3辺計が160cm以下であること、また、安価で入手が簡単なアルカリ乾電池で設定温度 $\pm 2.5^{\circ}\text{C}$ の温度制御を可能とすることを目標として設計を開始した。これらを踏まえて、定温輸送容器には真空パネルと電池で稼働が可能な面状ヒーターを組み込んだ断熱容器を試作し、この断熱容器を保冷剤、あるいは様々な融解温度の水溶性蓄熱剤とともに、入手が容易なレジャー用真空型クーラーボックスにセットし、 5°C 、あるいは 32°C での定温保持性能の調整を行った。最終的な細胞保管試験は、ラット由来の非凍結心筋細胞、非凍結膵島、非凍結肝細胞を用いて行った。

3) 細胞加圧容器の保存効果の検討

一般に細胞は培養により継代保存、あるいは凍結保存される。しかし、継代保存は正常細胞では長期保存が出来ないことに加えて細胞の性質そのものが変化する可能性がある。一方、凍結保存させる場合は凍結時の水の結晶化による細胞骨格へのダメージが大きい等の欠点がある。それを解決するためにDMSO等の凍結防凍剤を添加するが、細胞への直接的な毒性が考えられる他、DMSOは細胞の種類にもよるが分化促進作用がある、プラスチック容器からの可塑剤の溶出することによる細胞毒性などの問題が存在する。また、冷却速度を制御する必要があり時間と手間がかかり、例えば多能性幹細胞で15秒以内に液体窒素で急速冷凍させる必要があるとともに解凍にも注意が必要である。さらに、根本的な問題として凍結することで死滅してしまう細胞も少なくない。また、輸送に関しては大量のドライアイスが必要とし、また多能性幹細胞では輸送用ハードケース(小さなトランク)と、その中にドライシッパー(金属容器)からなる二重構造のドライシッパーに液体窒素が封入されているものが用いられるのが現状である。以上の点から細胞を凍結しないで保存する方法を開発すれば、細胞に与えるダメージや環境負荷に関する問題を解決することが可能となる。

B. 研究方法

1) 初代細胞を用いて至適温度の検討

1-1) ラット初代心筋細胞の調製

新生児ラットの心筋細胞はYukiらの方法に従い採取した。すなわち、生後1-4日齢のSprague-Dawleyラットから心臓を摘出し、心房を除去して心室を得た。これをハサミで細切して0.2%コラゲナーゼ液とともに

35°C で15分間消化させた。上清を回収して新たなコラゲナーゼ溶液と交換して同様の操作をさらに数回行い、回収した上清の細胞塊を除去し、遠心法にて洗浄して沈渣を得た。これを心筋細胞用培地(CMCM、プライマリーセル)に浮遊させてディッシュに播種し、 37°C 、5% CO_2 のインキュベータで培養し非接着細胞を回収した。位相差顕微鏡でやや不整な球形を呈し、明るく光り表面が滑らかに見える細胞を心筋細胞とみなして、細胞密度 2.0×10^5 cells / mlとなるように心筋細胞用培地に浮遊させ、15ml コニカルチューブに 2.0×10^5 cells / mLに懸濁した。

1-2) ラット初代肝細胞の調製

Seglenらの方法の改良法にて細胞を採取した。すなわち、5週齢ないし6週齢Sprague-Dawleyラットをエーテル麻酔下で腹部正中切開して、門脈から肝臓方向へカニューレを挿入し、排出路として腹大動脈、腹部下大静脈および胸部下大静脈を切断した。カニューレから前灌流液を約10 ml / minの流速で10分間灌流したのち、コラゲナーゼ溶液を10分間灌流した。灌流後、肝臓を摘出して適量のHBSSを加えたシャーレに細胞を浮遊させ、 $100 \mu\text{m}$ ステンレスメッシュを通して細胞塊を除いた。この細胞浮遊液を遠心分離して得られた細胞ペレットにHBSSを加えて細胞を浮遊させ、同様に合計4回遠心洗浄した。5回目の洗浄でHBSSを肝細胞用培地(HPCM、プライマリーセル)に替えて同様に遠心洗浄した細胞ペレットに肝細胞用培地を適量加えて細胞浮遊液とした。得られた肝細胞は予めコラーゲンIをコーティングした培養用プレートに 1.0×10^5 cells/cm²の細胞密度で播種して、 37°C 、5% CO_2 のインキュベータで4時間培養した後、接着しなかった細胞を肝細胞用培地で洗浄除去し、24穴ないし12穴プレートにて 37°C 、5% CO_2 で一晩培養したのち試験に供した。

1-3) ラット膵島の調製

Shibataら方法の改良法にて細胞を採取した。すなわち8週齢のSprague-Dawleyラットを安楽死させ、総胆管から0.5%コラゲナーゼ溶液を注入し、膵臓を摘出しハサミで細切して15分間程度消化させた。遠心法により洗浄したのち、培地に浮遊させてディッシュに移し、実体顕微鏡で観察しながら膵島様の細胞塊を回収した。これをフィコール液を用いて密度勾配遠心精製した。遠心により細胞を回収して培地に浮遊させ、実体顕微鏡下にて目視観察しながら、膵島をピペットにて回収し、10%FBSを含むRPMI培地に懸濁した。

1-4) 保管温度の違いによる細胞品質の比較

温度制御機能付きの輸送容器の試作に先立ち、通常の試験研究用冷蔵庫(日本フリーザー社 BMS-350F3型、設定4°C、実測温度 4°C~5°C)、ワインクーラー(エコ・トゥエンティワン社 WA-6型、設定 14°C、実測13~14°C)、37°Cインキュベーター(アズワン社IVC-450、または 東京理科社SLI-400、設定 37°C、実測37°C または 設定32°C 実測32°C)を用いて3温度帯での保存性を比較した。心筋細胞はキットに含まれる専用培地に 2.0×10^5 cells / mL濃度に調整し、それぞれの温度で1日から4日静置した後、細胞を回収。形状、生存率を測定後、コラーゲンコート培養プレートに播種し、心筋細胞用培養メEDIUM (CMCM プライマリーセル社)を用いて5%CO₂存在下、37°Cにて培養し、形態観察および拍動の観察の後、TRIReagent(コスモ・バイオ社)にて細胞を溶解した。

肝細胞はそれぞれの温度で1日静置後、肝細胞用培養メEDIUM (HPCM-500 プライマリーセル社)を用いて5%CO₂存在下、37°Cにて培養し、形態観察後、TRIReagentにて細胞を溶解した。

膵島はそれぞれの温度で1日から4日静置した後、細胞を回収。形状、生存率を測定後、グルコース応答性試験およびTRIReagentにて細胞を溶解した。いずれも細胞のTRIReagent溶液は、リアルタイムPCRによる発現解析実験まで、-80°Cにて保存した。

1-5) 膵島のグルコース応答性試験

膵島は2mLのマイクロ遠心チューブに5ないし10個/チューブで分注した後、1000xgにて数秒間遠心分離し、上清を除去した後3mMグルコース含有膵島培養用メEDIUM (PINM4 プライマリーセル社)に浮遊させた。マイクロ遠心チューブの蓋を開けたまま5%CO₂存在下の37°Cで60分間インキュベートした後、1000xgにて数秒間遠心分離し、上清を除去、再び、3mMグルコース含有膵島培養用メEDIUMを加え同条件で60分間インキュベートした。同様に遠心分離にて上清を回収し、これを低グルコース反応液とした。低グルコース反応後の膵島は20mMグルコース含有膵島培養用メEDIUMで一回洗浄した後、20mMグルコース含有膵島培養用メEDIUMを加えて、同様の操作で60分間インキュベートし、上清を回収、これを高グルコース反応液とした。各反応上清は、ラットインスリンELISAキット(アルプコ社)にて、インスリン濃度を測定し、高グルコース時インスリン濃度 / 低グルコース時インスリン濃度にてSI値(Stimulation Index)値を計算した。

1-6) 遺伝子発現解析

TRI Reagent により溶解したサンプルは 1/5 量の

クロロホルムを加えてよく攪拌した後、20,000 ×g、10分間の遠心後上層を回収した。上清を別の1.5 mLチューブに採取し、上清と同量のイソプロパノールを加えて攪拌した後10分間インキュベートし、20,000 ×g、10分間遠心によりRNAペレットを得た。ペレットを75%エタノールにて洗浄後一旦風乾し、これにヌクレアーゼフリー水を加えて総RNA溶液とした。得られたRNA溶液の濃度は吸光度計(ナドロップ ND-1000、Thermo Fisher Scientific)を用いて260 nmの吸光度を測定することにより算出した。

総RNA 1 μg量を材料として RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (コスモ・バイオ社)にてcDNAを調製した。逆転写反応はキットに含まれるOligodT primerとRandom Primerを等比混合プライマーにて行い、cDNA合成反応液は70°Cで10分間インキュベートすることにより失活後10倍量の10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA溶液 pH8.0にて希釈し、リアルタイムPCR用テンプレートとして4°C保管した。

リアルタイムPCRはLightCycler 480 PCR Real-Time PCR Instrument (ロッシュアプライドサイエンス社)またはEverGreen qPCR KIT(ソリス・バイオダイナ社)を使用し、サイバークリーン法により行った。反応に用いたプライマーは、シグマアルドリッチ社にてデザインおよび合成されたものを使用した。

2) 5°C および 32°C輸送容器の試作と性能評価

試作した定温輸送容器は以下の条件にて、その温度制御能力を検証した。電池は市販の単三アルカリ乾電池8本ないし16本が収納できる電池ボックスを21個から4個並列で使用した。電池ボックスを接続した定温輸送容器を、レジヤ用のクールボックス(フィクセル プレミアム、シマノ社)に設置した。その際、5°C設定時には予め-14°C程度に冷却した保冷剤CV-2 500g、(玉井化成)、32°C設定時には、37°Cにて加熱した水溶性蓄熱材パッサーモ P-32 500g (玉井化成)を、定温容器周辺に設置し、各々の低温輸送箱の温度センサーが設定温度以下になった場合、自動的に内部に仕込んだ面状ヒーターに自動的に通電され、加熱されるよう設定した。設定が完了した輸送容器は、50°C~-10°Cの範囲で温度が変化するように設定したプログラマブル恒温器に保管し、各所の温度変化を記録した。

3) 細胞加圧容器の保存効果の検討

細胞保存容器については、創価大学の清水らが開発した容器を供与頂き、検討に使用した。心筋細胞、膵島を一定圧力に加圧後、定温環境下で保管し、生細胞率および機能解析を行った。

3-1) 細胞加圧容器

細胞保存容器は、液体圧力媒体を充填して容器内部を加圧状態にする加圧容器と、この加圧容器内に収めることが可能であって、外部からの圧力を内部の物質に伝達できる材質を具備することにより内部に封入される細胞を加圧できる内部容器有している。そして、内部容器を加圧容器内に収めたとき、加圧容器の内部空間の長手方向と内部容器の長手方向が同一の方向で保持される。保存温度を保存すべき細胞内の水の結晶化温度より高く、及び細胞の活動至適温度以下、並びに保存圧力を0.11~10MPaとする保存条件に好適であり、かつ小型軽量の細胞保存容器であって、液体圧力媒体を充填することにより圧力を維持できる加圧容器と、加圧容器内に収めることが可能であって、外部からの圧力を内部の物質に伝達できる材質を有することにより内部に封入される細胞を加圧できる内部容器とを有し、これら容器の形状が内部空間も含めて特定の形状である細胞保存容器である。液体圧力媒体は保存する細胞の液体培地を使用した。

3-2) ラット初代心筋細胞の調製

1-1) ラット初代心筋細胞の調製の項を参照。

3-3) ラット初代肝筋細胞の調製

2-1) ラット初代肝筋細胞の調製の項を参照。

3-4) 細胞生存率の測定

細胞の生存率は、0.4 % Typan Blue Stain (GIBCO)を用いて測定した。Typan Blue Stain 溶液と細胞懸濁液を等量混和させた後、青く染色された細胞を死細胞として、血球計算盤を用いて測定した。

C 研究結果

1) 初代心筋細胞を用いて至適温度の検討

初代ラット心筋をそれぞれ保存温度で24時間静置した後の生存率およびこれをコラーゲンコートプレートに培養した場合の顕微鏡観察結果を表1に示す。

	生存率	顕微鏡観察
4℃	79%	正常。保存前と有意な差なし。
14℃	58%	拍動同期が1-2日程度遅い
37℃	凝集により測定不能	凝集した状態で拍動

表1 保存温度による細胞生存率と培養時の外見的比較

保存温度は4℃が最も優れており、また37℃の場合は、保存中に細胞凝集が起り、正常な平面培養が不可能であった。また、培養後の主要な心筋細胞マーカーであるHcn4の遺伝子発現をActBを用いてノーマライズした際の発現解析結果を図1に示す。

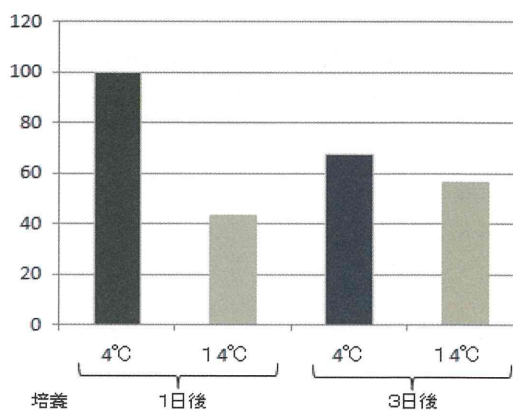


図1 Hcn4の遺伝子発現比較
4℃保管の後1日培養時を100として比較。

Hcn4 遺伝子発現解析は、14℃保存で明らかに低く、この傾向は約3日間同様であった。このことは14℃の場合顕微鏡観察において、拍動同期開始が4℃保存よりも遅いことも一致する。

2) 肝細胞を用いて至適温度の検討

一夜培養した肝細胞を培養プレートに培地を満たし、プレートシール封入の後、37℃、32℃、14℃にて24時間静置した細胞は、それぞれ顕微鏡観察を行った。外見的には通常の培養細胞と37℃保管および32℃保管細胞間に大きな差異はなかったが、14℃の細胞は間隙拡大、顆粒や空胞の出現などの形状変化が観察された(図2)。形状観察の後、培地交換を行い、37℃、5%CO₂インキュベータにて一日培養した。培養翌日にRNAを回収し、肝細胞の主要な発現マーカーであるアルブミン、グルコース-6-脱リン酸酵素 (glucose-6-phosphatase, G6PC)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, PCK2)、トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ (tryptophan 2,3-dioxygenase, TD02)の遺伝子発現解析をβアクチンをコントロールとしてノーマライズを行った。定温保管を行わず、37℃、5%CO₂で通常通り培養を継続した肝細胞についても、同様の処理を行い、このときの遺伝子発現を100として、各温度で保存処理を行った場合の遺伝子発現の相対比率を図3に示す。

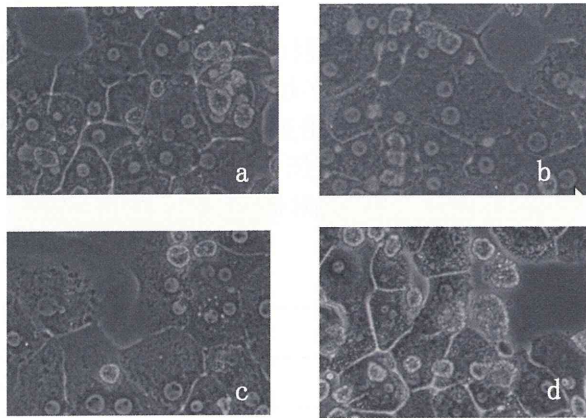


図2 各設定条件で保存後の肝細胞 a:37°C,5%CO₂ で通常培養 ,b: プレートシール後 37°C,24 時間,c: プレートシール後 32°C,24 時間,d: プレートシール後 14°C,24 時間

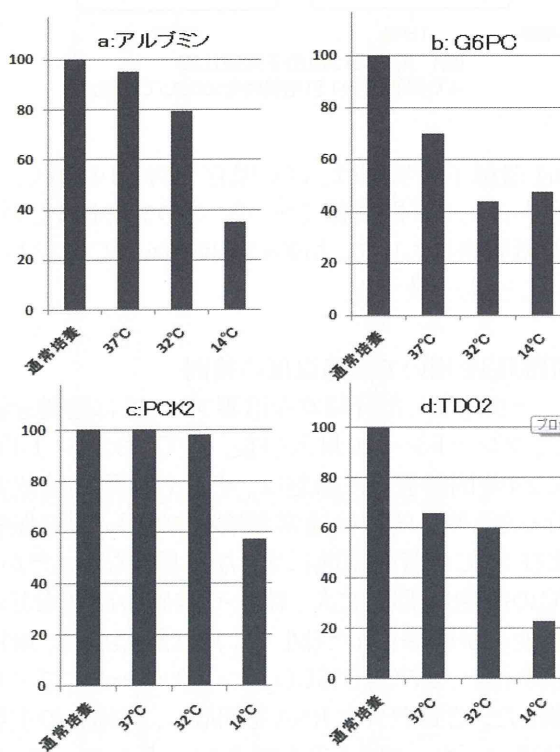


図3 βアクチンをコントロールとし定温保管を行わず、37°C、5%CO₂ で通常通り培養を継続した肝細胞の遺伝子発現値を 100 としての相対比で表示

3) 膵島細胞を用いて至適温度の検討

各保存温度で 24 時間保管したラット膵島を用いた SI 値測定結果を図 4 に示す。14°C に比べ、4°C、32°C とも良好な SI 値を示した。

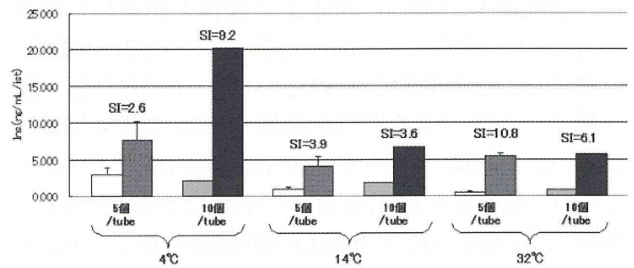


図4 32°C、14°C、4°C保管後の SI 値

4) 試作定温容器の性能評価

定温輸送容器は、5°C用で 24 時間～4 日程度、32°C用は 24 時間～3 日程度の期間、設定温度±2.5°Cを維持することが可能となった。定温輸送容器システムおよび定温容器外見を図5に示す。

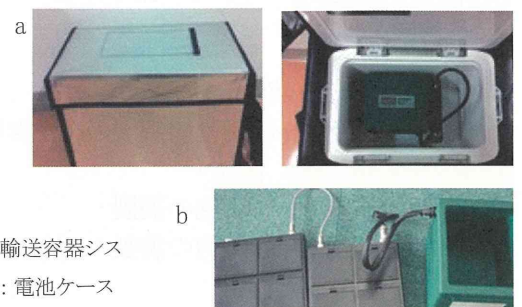


図5 a: 定温輸送容器システムの外見 b: 電池ケースに接続した定温輸送容器

外気温度を 6 時間毎に+40°Cから-10°Cに変化させた際の定温容器内部温度変化を調べた結果を図6に示す。32°C設定の場合約 48 時間後、5°C設定の場合で約 54 時間後に電池が消耗し、定温機能が劣化する様子が観察される。一方、設計上は外箱に設置している蓄熱材・保冷材の容量の加減や電池容量を上げる事が可能であり、これにより長時間の定温維持が可能であることが推測された。これにより国内では調達が困難な組織や細胞を海外から輸入などが可能になることが示唆された。

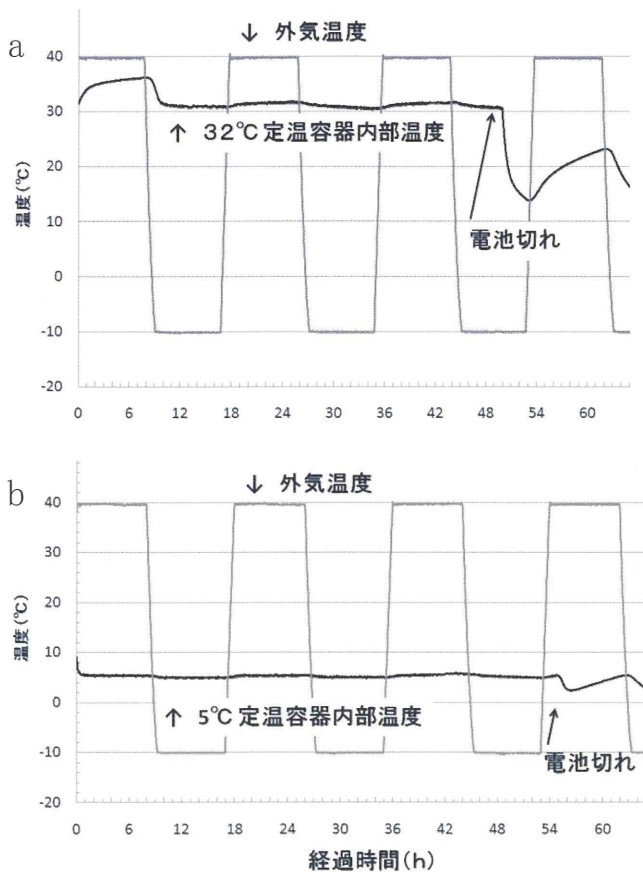


図6 外気温を周期的に変動させた際の定温輸送容器内部温度の変化。a: 37°C仕様の定温容器。ヒーターには市販の単三アルカリ乾電池 x 32 本を接続。37°Cにて予熱したパッサーモ P32 500g x 4 個使用。b: 5°C仕様の定温容器。ヒーターには単三アルカリ乾電池 x 32 本を接続。-15°Cにて予冷した保冷材 CV-2 500g x 4 個使用。

実際の細胞や組織の搬送を想定して、戸外静置、車中静置、倉庫静置、トラック便輸送、航空便輸送を連続して行い、その間の5°C定温輸送容器内部の温度を連続計測した。(図7) このように、不規則に外気温が変化し、かつ風や床からの熱伝導などが様々に変化する環境下でも4日間以上定温性能を維持することができた。

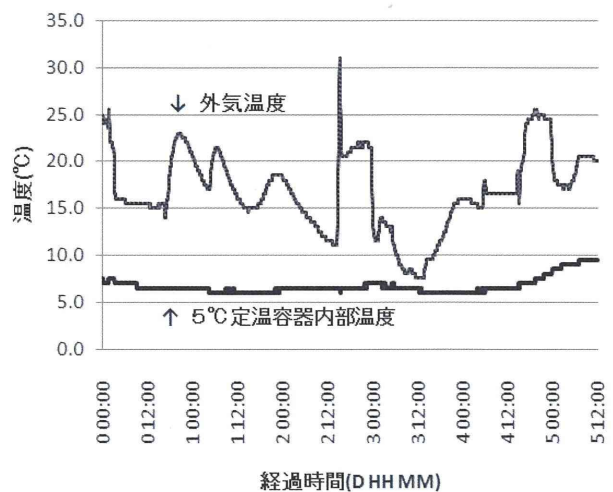


図7 不規則に変動する外気温環境下での5°C仕様定温輸送容器内部温度の変化。ヒーターには市販の単三アルカリ乾電池 x 48 本を接続。-15°Cにて予冷した保冷材 CV-2 500g x 6 個使用。

5) 細胞加压容器の保存効果の検討

高圧保存容器内の細胞に対して、1.5Mpa または 3.0Mpa の圧力をかけ、4°Cに高圧保存容器を4日から8日間静置した。その後、トリパンプルーを使用して細胞の生存率を測定した。ラット初代心筋細胞に関して、1.5Mpa の圧力下で4日間保存した場合、生存率は約 50%であった。さらに培養プレートに播種したところ、心筋細胞の拍動を確認することが出来た。次に保存期間を8日間に設定して検討を行った。その結果、1.5Mpa の圧力下では、生存率が 20%にまで低下してしまい、圧力をかけていない場合と同程度の生存率であった。そこで、3.0Mpa の圧力や細胞保護効果が知られているトレハロースとの組み合わせについても検討したが、いずれも 30%未満であり、圧力をかけていない場合と比較して、有為な差は認められなかった。ラット初代心筋細胞に関しては、1.5Mpa または 3.0Mpa の圧力保存で4日後は生存率が 40%程度であり、8日後では、20%未満に低下し、いずれの場合も圧力をかけていない場合と比較して、有為な差は認められなかった。

D. 考察

4°Cのもと、1.5Mpa または 3.0Mpa の圧力をかけた高圧保存容器で細胞を保存した場合、ラット初代心筋細胞に関しては、4日間の保存期間ではわずかな圧力効果が認められるものの、8日間の保存期間では、その効果が認められなかった。またラット初代

心筋細胞に関しては、4日間と8日間の保存期間のいずれにおいても、圧力効果が認められなかった。したがって、さらなる検討が必要であると考えられる。なお、初代細胞とは別に株化細胞を用いた検討を最近行った結果、4℃よりも25℃の条件下で細胞を保存した方が、より生存率が高い事が判明した。そこで、開発中の温度調整機能を持つ保存容器と組み合わせた検討を進める事で、より細胞保存機能が高い保存容器の開発が可能になると考えられる。

E. 結論

細胞は環境温度の影響を極めて受けやすいため、従来輸送時の温度変動によって引き起こされる細胞品質変化は対処不可能なものとされてきた。そのため、一般に流通可能な細胞は凍結細胞に限られる場合が多く、創薬研究の進展を阻害する一因であった。今回我々が開発した、乾電池で駆動が可能な定温輸送システムは、従来流通が不可能であった生細胞の輸送を可能とするものである。これにより、ごく一部の限られた施設でしか使用が叶わなかった細胞類も、今後は広範囲での使用が可能とできる可能性がある。なお、実装試験は出荷地域や季節変動に大きな影響を受けるために、今後四季を通じての継続的な実送試験が必要と思われる。

また、ラット臍島を用いた検討では、圧力負荷によって、グルコース応答性が向上した。これは、細胞の輸送のみならずヒト臍島の移植にも応用可能な結果であると考えられる。いかなる機構により圧力が臍島機能の改善に寄与したのか、今後さらなる検討を行いたい。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉田 東歩	ヒト組織バンク	Medical Technology	39(6)	518-519	2011
小阪 拓男	研究利用のためのヒト 組織及び細胞の供給	臨床薬理	43(2)	89-90	2012

「ヒト組織バンク」を知っていますか？

ヒト組織バンクとは？

一般に「ヒト組織バンク」とよばれるものには、皮膚バンクなど移植を目的とした医療用バンクと、研究用のヒト組織を提供するバンクがある。本稿では、研究用ヒト組織バンクを紹介する。

病気の原因の解明、診断、治療法の開発、薬の有効性や安全性の研究には、ヒト組織が不可欠である。アメリカでは、移植不適合臓器を研究利用するためのヒト組織バンクが各地にあり、組織から細胞などに加工する企業も存在する。ヨーロッパでは動物愛護運動が盛んで、動物の代わりにヒト組織を用いた実験法の開発が進んでいる。日本でも、研究用ヒト組織の需要が高まり、国の倫理指針も整備されたので、2001年、国内初の公共的ヒト組織バンクがヒューマンサイエンス（以下 HS）研究資源バンク内に設立された。現在、HS ヒト組織バンクは国内の12医療機関と提携し、患者から提供していただいた組織を、医学・薬学分野の研究者に譲渡している¹⁾。最近では、神奈川県立がんセンターなど国内の数カ所の医療機関にヒト組織バンクが設立され、難病・再生医療の研究や薬の開発に活用されている。

手術摘出組織の提供

日本では、法令により移植不適合臓器の研究利用が不可能なため、手術で摘出された組織が研究用として提供されている。手術摘出組織は病理部門で診断に用いられるが、その残った部分を患者の同意を得て提供していただいている。

医療機関では、インフォームド・コンセントの取得、組織の摘出、保存処理、提供者の診療情報の提供、匿名化などの業務が行われている（図1）。自分の生命や健康が危機に瀕している手術前の患者やその家族に対するインフォームド・コンセントには、十分な配慮が求められる。善意で提供していただいた組織を有効に研究利用するため

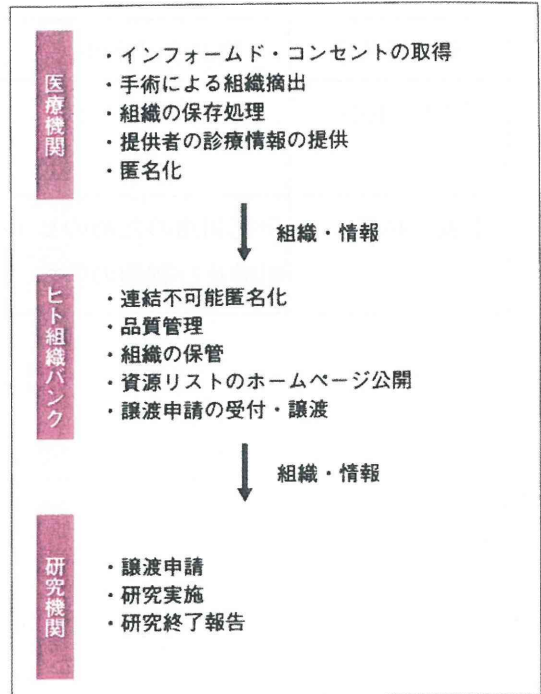


図1 ヒト組織バンク業務の流れ

には、組織の変性を抑えた状態で処理、運搬することが必要である。未来の医療のため、医師、病理医、臨床検査技師、コーディネーターの方々にヒト組織バンク業務に協力していただいている。また、医療機関、ヒト組織バンク、研究機関に設置された倫理委員会では、患者に不利益はないか、研究が適正に行われているかなどの厳重なチェックが行われる。

ヒト組織の研究利用

提供される組織は、癌手術で摘出された組織が多く、胃、食道、大腸、肝、皮膚などの癌部位とその周辺の非癌部位、その他は内臓脂肪、滑膜などで、平均の組織量は約2gである。保存状態から凍結、固定、新鮮（冷蔵）の3種類に分類される。凍結組織は、摘出後に急速凍結された組織で、

譲渡先の研究機関において DNA, RNA, 蛋白質が抽出され, 生化学的・分子生物学的研究に利用されている。凍結肝組織からは, ミクロソームが調製され, 薬物代謝活性の研究に利用されている。固定組織は, ホルマリン固定したパラフィンブロックで, 組織・形態学的な研究だけでなく, 遺伝子発現の解析にも利用されている。新鮮組織は, 「生きた」状態の細胞を研究利用したいという要望に応えるため, 摘出後数時間以内に冷蔵状態で研究機関まで届けている。

現在, HS ヒト組織バンクでは, 皮膚, 滑膜, 内臓脂肪, 大腸, 胃が譲渡可能である。皮膚は培養皮膚の作製や薬物代謝研究, 滑膜は関節リウマチ薬の薬理学研究や滑膜細胞の増殖制御研究, 内臓脂肪は脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化調節機構の研究, 大腸・胃は癌研究の目的で利用されている²⁾。また, 最近, バンクにて新鮮組織から細胞を調製し, 譲渡する業務も始めた³⁾。

患者の善意に基づく無償の提供である手術摘出組織を研究者に譲渡し, 医療の進歩に貢献することがヒト組織バンクの使命である。このヒト組織バンクの活動を医療機関で働く方々に理解していただき, 広く国民の協力が得られるようになることを目指したい。

文献/URL

- 1) 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団: http://www.jhsf.or.jp/index_b.html
- 2) 吉田東歩: ヒト組織バンクから供給される手術摘出組織の研究利用. 日本薬理学雑誌, 134: 315~319, 2009.
- 3) Kasamatsu, A., Satoh, M., Yoshida, T., Kosaka, T.: Response of human fibroblasts-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritis to inflammatory stimulation: quality control findings. *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 29: 167~172, 2010.

●解説 吉田東歩

(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
ヒューマンサイエンス研究資源バンク所長)

イヌ・ネコ咬傷と *Capnocytophaga canimorsus* 感染症

はじめに

ペットフード協会の統計 (2009 年) によると, 少子化やペットブームの影響もあり, イヌ・ネコの飼育総数は, 2,200 万頭 (イヌ: 約 1,200 万頭, ネコ: 約 1,000 万頭) と増加し, 15 歳以下の子どもの人口 (1,700 万人) を大きくこえた。これらイヌ・ネコの多くは室内飼育され, ヒトと密に生活するようになり, 動物からの感染が問題となってきた。

イヌ・ネコ咬傷

玄関先でイヌを飼育していた 1970 年代には, 咬傷事故は年間 17,000 件であった。室内飼育が進み, 1990 年以降は咬傷事故は減少したが, それでも年間 6,000 件を下限に推移している。イヌによる咬傷事故が発生した場合, 飼い主は翌日までに最寄りの保健所に届け, ヒトを咬んだイヌを獣医

師に受診させ狂犬病の鑑定を受けさせなければならない。このような行政指導により, イヌでは咬傷事故件数を把握しているが, 全数把握ではなく, 届け出た飼い主のみの数である。しかし, ネコの咬傷事故統計数は不明である。

イヌ・ネコ咬傷による感染症として, パスツレラ菌, バルトネラ菌, 黄色ブドウ球菌, 連鎖球菌, 破傷風なども問題となる。

Capnocytophaga canimorsus 感染症

Capnocytophaga 属菌は通性嫌気性グラム陰性桿菌で, ヒトやイヌ (92%)・ネコ (86%) の口腔内に常在する。ヒトでは, 歯周病関連菌として, 日和見的に全身感染を起こすことが知られている。獣医学領域では, 動物に症状がなく, 比較的新しい菌なのでなじみが薄い。ヒトへはイヌ・ネコの咬傷や搔傷により感染し, きわめてまれに重篤例