

高い培養安定性と細胞増殖促進作用を持つ  
脂肪由来間葉系幹細胞用無血清培養系の開発と  
培養細胞の性質及び組織修復能の評価

2 0 1 5

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

佐藤 和聡

筑波大学

博士（医学）学位論文

# 目次

略語

第1章 序論	4
1.1. 組織（細胞）培養と細胞培養液	
1.2. 間葉系幹細胞	
1.3. 再生医療の現状	
1.4. 脂肪由来間葉系幹細胞を使った再生医療	
1.5. 脂肪由来間葉系幹細胞と無血清培養	
第2章 目的	16
第3章 実験方法	17
3.1. ヒト脂肪組織から細胞の分離と培養	
3.2. ヒト脂肪組織から細胞の分離工程の評価	
3.3. 細胞増殖能の評価	
3.4. 骨髄及び歯髄、歯根膜由来幹細胞の採取と増殖評価	
3.5. 表面抗原解析	
3.6. 多分化能の評価	
3.7. 核型解析	
3.8. SA- $\beta$ -Galactosidase 活性の評価	
3.9. CFU-F assay	
3.10. 遺伝子発現解析	
3.11. ELISA assay	
3.12. 免疫抑制活性の評価	
3.13. 大腿骨骨折モデルマウスの作成	
3.14. 大腿骨組織の定性及び定量評価	
3.15. Quantum dots による細胞追跡評価	
3.16. 統計解析	
第4章 結果	29
4.1. 無血清培養液の開発	
4.1.1. 既存無血清培養の問題点抽出	

4.1.2.	基礎培養液の選定	
4.1.3.	増殖因子の選定	
4.1.4.	無血清培養液による増殖性能評価	
4.1.5.	コーティングマトリクス of 選定	
4.2.	無血清培養系の開発	
4.2.1.	無血清分離工程の評価	
4.2.2.	無血清増幅工程の評価	
4.2.3.	無血清培養細胞の評価	
4.2.4.	市販無血清培養液との比較	
4.2.5.	他組織由来幹細胞への応用	
4.3.	in vitro での無血清培養細胞の性質及び機能評価	
4.3.1.	無血清培養細胞の老化と未分化能	
4.3.2.	免疫抑制活性の評価	
4.3.3.	サイトカイン産生能の評価	
4.4.	in vivo での無血清培養細胞による組織修復能の評価	
4.4.1.	大腿骨骨折モデルマウスを用いた骨修復能の定性評価	
4.4.2.	大腿骨骨折モデルマウスを用いた骨修復能の定量評価	
4.5.	蛍光量子ドット (Qdots) を用いた移植細胞の体内動態解析	
4.5.1.	Qdots の取り込み効率及び増殖能、分化能への影響	
4.5.2.	移植細胞の体内動態解析	
第 5 章	考察	67
5.1.	無血清培養液の開発	
5.2.	無血清培養系の開発	
5.3.	無血清培養細胞の質と安全性	
5.4.	大腿骨修復に対する無血清培養細胞の有効性	
第 6 章	総括	78
第 7 章	引用文献	80
第 8 章	謝辞	92
第 9 章	参考論文	

## 略語

AT-MSCs: Adipose Tissue derived Mesenchymal Stem Cells (脂肪組織由来間葉系幹細胞)

$\alpha$  MEM: Minimum Essential Medium alpha

DMEM: Dulbecco's Modified Essential Medium

FBS: Fetal bovine serum (ウシ胎児血清)

FDA: Food and Drug Administration (米国食品医薬品局)

GvHD: Graft versus Host disease (移植片対宿主疾患)

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium

iPS cells: induced pluripotent stem cells (人工多能性幹細胞)

i-QD: internalize quantum dots

MSCs: Mesenchymal Stem Cells (間葉系幹細胞)

QD655: Quantum dots 655

SCM: Serum-Containing Medium (血清含有培養液)

SFM: Serum-Free Medium (無血清培養液)

# 第 1 章 序論

## 1.1. 組織（細胞）培養と細胞培養液

19 世紀終わり頃から組織や臓器の形態形成を調べるため無菌条件下、組織（細胞）を体外で培養する試みが始まった。カエルの神経細胞を体外で培養することで生命を維持することが可能となり、その後ニワトリ胚組織の初代培養により線維芽細胞を体外で増殖することに成功した。さらにトリプシンによる組織から細胞を単離・分散させる技術の確立により、細胞の定量的評価が可能となった。現在も多くの研究で使用される無限増殖が可能な株化細胞であるマウス線維芽状 L 細胞株や子宮癌上皮細胞株である He La 細胞株はこの頃樹立された。近年では、組織培養に必要な培養液や血清、安価で様々な種類のプラスチック容器、さらにはクリーンベンチやガス制御が可能な恒温槽（インキュベーター）が市販されたことで、無菌的な培養操作や体外培養のための環境形成が容易になり、細胞生物学のみならず癌研究やウイルス研究の発展、さらには培養細胞の医療応用へとつながったと言える。

体外での細胞培養において重要なことは、細胞種にあった適切な生育環境の制御である。制御因子としては、気相（酸素、二酸化炭素）、温度、PH、浸透圧等が挙げられる。さらに、細胞への適切な栄養成分の供給も生存、増殖を維持するために重要である。現在行われている細胞培養の多くは、気相及び温度、(PH) は CO<sub>2</sub> インキュベーターにより、PH 及び浸透圧、栄養成分供給は細胞培養液により制御されることで、適切な培養環境が形成されている。さらに細胞は、生存及び増殖に必要な酸素及び栄養成分を消費することで細胞内代謝を促し、生存及び増殖に必要なエネルギーを作る。一方でこの代謝反応に伴い、酸化ストレスや老廃物が発生し生存環境の変化(PH の変化、毒性物質の

蓄積等)を引き起こすことからこれらを抑えることが可能な成分や添加物を含む細胞培養液を開発、選択することもまた体外での細胞培養において重要であるといえる。このように生体環境を模し、細胞の生存・増殖に必要な成分を供給することは、結果的に生体組織中の細胞の機能や働きを体外で評価することを可能とする。

細胞培養液は1911年にLewisらが塩類溶液にアミノ酸、ポリペプチドを加え作ったのが最初の合成培養液であるとされている。当時は組織抽出液に血漿や塩類溶液を加えた液体培地が使われていた。1950年代にEagle等は、HeLa細胞等の培養のためにEagle's Basam Medium(BME)を開発し、その後現在使用されている培養液のベースとなるminimum essential medium(MEM)を開発した。Dulbecco's modified Eagle's media(DMEM)や $\alpha$  MEMは、培養する細胞種に合わせMEMに含まれる種々因子の濃度を調整することで作られたものである。1940年代後半~1960年代には培養液に動物血清を加える血清培養が主流になった。その後、細胞増殖因子の発見等から、血清を使わない無血清培養研究が盛んに行われ、近年、再生医療の実用化が現実味を帯び始めるなか安全性や性能を高める目的で無血清培養液が再び注目されている。

組織(細胞)培養液の基本的な成分は”無機塩類”、“アミノ酸””炭水化物””ビタミン””微量金属””核酸前駆物質”である。主に無機塩類は水溶液中の浸透圧及びPH、イオン組成等物理化学的条件を調整するために用いられる。一方その他因子はそれぞれが細胞の生存・増殖に欠かす事が出来ない因子である。現在汎用されている動物血清は、培養液に含まれていない増殖因子や脂質、アルブミン、微量金属等を豊富に含むことから培養液に血清を加えることで様々な種類の細胞の培養を安定化することができ、現在標準的な方法として確立されている。一方で血清は含有されている成分の詳細が明らかでないこと、Lot毎に成分が異なる事から、ある種の成分機能解析等の研究には使用が難

しい。さらに培養細胞を医療へ応用する再生医療では、特に動物由来血清においてその抗原性や病原性ウイルス混入の可能性が問題視されており、この対策の一つとして、無血清培養液の開発が進んでいる。無血清培養液は、血清を必要としない培養液であり、主に血清中に含まれる因子のうち細胞の生存及び増殖、機能発現に必要な因子のみを選択的に培養液に加えて作られる。無血清培養液はその構成成分が同定されていること、Lot.間差が少ないこと、抗原性や病原ウイルスの混入を回避できること等から、基礎研究のみならず医療応用においても有用なツールであるといえる。

## 1.2. 間葉系幹細胞

間葉系幹細胞(MSCs)はヒト成体組織中に存在する組織幹細胞の一つで、幹細胞の特徴である自己複製能や間葉系の胚葉に由来する体細胞(脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、筋肉等)への分化能を有する。MSCsは1970年にFriedenstein et al.(1970)によって骨髄中に内皮細胞やマクロファージとは異なる線維芽細胞様の形態を示す細胞の存在が確認され、その細胞が幹細胞の特徴である単一細胞からコロニー形成を行うことができる(CFU-F)細胞として同定された。MSCsの生体内での働きについては未だ明らかになっていないが、組織中では間葉系組織の血管周皮組織に存在し、その多分化能や様々なサイトカイン産生能から周辺環境の維持に寄与していると考えられている。現在まで、同様の細胞形態や性質をもつ細胞が、血液、臍帯血、臍帯、胎盤、脂肪、歯根、滑膜、歯周靭帯、子宮内膜等の骨髄以外の組織にも存在することが報告されている(Fukuchi et al., 2004, Huang et al., 2009, Hermida et al., 2011, Tondreau et al., 2005, Park et al., 2011, Schwabet al., 2008, Baksh et al., 2007, Sarugaser et al., 2005)。このことからMSCsとしての定義を明確にするためInternational Society of Cellular Therapy (ISCT)が基



準を定めている (Dominichi et al., 2006)。その基準は、①基材への接着能を有すること、②CD73, CD90, CD105 が 95%以上の細胞で発現し、一方で CD45, CD34, CD14, または CD11b, CD19, または CD79 $\alpha$  の発現が 2%以下の細胞集団であること。③骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有すること、の 3 つである。しかしこれらの定義に準じた細胞集団のうち、容器への接着と CFU-F 形成が見られた細胞のみが多分化能を保持しておりことが報告されている (Russell et al., 2010)。これは MSCs の中の一部の細胞集団が何らかの細胞系列へコミットメントし、幹細胞としての性質を失っている細胞が含まれている可能性を示すものであり、MSCs は不均一な細胞集団であるとも考えられている。また MSCs は由来組織毎にその性質 (増殖速度、表面抗原発現や分化能力) が異なることも報告されており、MSCs をマウスに移植した場合、骨髄由来 MSCs は骨を形成し、歯髄由来は象牙質を異所性に形成する (Batouli et al., 2003)。このように MSCs の由来毎の性質の違いは明らかであり、それぞれの性質の解明にはさらなる知見が必要である。

MSCs は様々な機能を有するが、大きな特徴としては多分化能と多種類のサイトカイン産生能の二つが挙げられる。MSCs は先にも述べたように脂肪、骨、軟骨、平滑筋、心筋、腱等の中胚葉系の細胞に分化するが、近年では肝臓細胞 (内胚葉)、膵臓細胞 (内胚葉)、神経細胞 (外胚葉) 等、胚葉を超えて分化することも報告されており (review of Zhang et al., 2012)、今後さらに他の体細胞へ分化する報告が成される可能性も高く、組織幹細胞の一種でありながらその幅広い体細胞への分化能は注目すべき機能といえる。

一方で、MSCs から産生されるサイトカインは間接的に生体組織に様々な影響を与える。その一つとして MSCs の免疫抑制能がある。具体的に、MSCs は TGF- $\beta$ , IL-10, PG

E2, IL-6, IDO 等サイトカインを産生し間接的に T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞 (DC) の増殖や IFN $\gamma$  等の活性化サイトカイン産生を抑制する一方、抑制性 T 細胞の活性化、抑制性 T 細胞からの IL4 や IL10 産生誘導を引き起こし、強い免疫抑制作用を惹起する(review of Sharma et al., 2014)。さらにサイトカイン産生による間接的な作用のみならず細胞表面に発現する Notch ligand や Jagged-1 を介し、T 細胞と直接接着することで T 細胞の活性を抑制することも知られている(Liotta et al., 2008)。このような MSCs の強力な免疫抑制作用は、GvHD、やリウマチ等免疫系疾患に対する新たな治療法としての利用が注目されており、動物実験のみならずヒトを対象とした臨床研究においてもその有効性が報告されている(Mcintosh et al., 2006, Niemeyer et al., 2008, Ra et al., 2011)。

また MSCs は、細胞のマイグレーション(SDF-1、CCL, CXCL)や分化、組織修復の誘導 (VEGF, bFGF, EGF, PDGF, TGF  $\beta$ , HGF, IGF-1) 等に関与するサイトカインを産生することも知られる。これは MSCs が生体組織中で間葉系組織を中心とした周辺組織の維持に働くために有する多様な機能の一つと考えられる。この MSCs によるサイトカイン産生能に着目し、MSCs の培養上清を欠損組織の治療に用いる研究も進められており、その有効性が確認されている (Osugi et al., 2012)。

以上の点からより詳細な MSCs の同定や組織中での働き等不明な点は多々あるものの、様々な成体組織中に存在し細胞ソースが豊富である事や、その多機能性 (多分化能やサイトカイン産生能) は再生医療のための有用なツールとして非常に注目される。

### 1.3. 再生医療の現状

近年、組織培養技術や各生物学研究の発展、さらには人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の開発等により、従来の治療法（手術や薬物治療）では十分な回復が見込めない組織の欠損や機能不全に対し、細胞を移植し機能回復を計る再生医療（細胞治療）が注目されている。再生医療は、従来の化合物や生物由来因子による生体組織（細胞）の賦活化や機能制御等に基づいた薬物治療とは異なり、移植する細胞及び組織自体が欠損組織を補い修復する治療法である。通常、治療には数多くの細胞が必要となるが、組織培養技術の進歩に伴いほとんどの細胞種は容易に体外で培養・増幅が可能になった。このことから多くの場合、組織から採取された細胞は体外で培養し増幅又は加工（分化や活性化）された後、治療に使用される。

既に世界各地では再生医療の実用化が始まっている。世界で実用化（上市）された再生医療製品としては、自家培養表皮及び自家培養軟骨、自家骨等がある。国別では米国 9 品目、欧州 20 品目、韓国 14 品目が実用化（上市）され各国ともさらに多くの製品で治験が行われている（参考：経済産業省、“再生医療の実用化・産業化に向けて”）。一方、日本では 2014 年現在までに（株）J-TEC の自家培養表皮”ジェイス”と自家培養軟骨”ジャック”の 2 品目が上市されている。また現在治験段階で比較的実用化が近いと考えられる製品としては、テルモ（株）による虚血性心疾患に対する自家骨格筋芽細胞シートや先端医療進行財団の軟骨欠損に対する自家培養軟骨、（株）J-TEC による表皮水泡症に対する自家培養表皮、そして札幌医科大学病院が行う骨髄由来 MSCs を用いたアテローム血栓性脳梗塞及び脊髄損傷治療、さらに JCR ファーマ（株）による GvHD 予防を目的とした骨髄由来 MSCs の製品等がある。このように他国に比べ日本では上市された数は少なく出遅れている印象があるものの今後のさらなる進展が期待される。さらにこれら再生医療製品の実用化は、経済への影響も大きく、2030 年には日本で 1 兆円、

世界では 10 兆円を超える経済効果が期待されている（図 1）。この状況を受けて再生医療製品の実用化を促進するため、日本では新たに再生医療に関する法規制を定め「再生医療等の安全性確保等に関する法律」（再生医療新法）を 2014 年 11 月 25 日に施行する。また現行の薬事法も新たに「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」と改正され、再生医療製品の製造販売に関する規定が新たに盛り込まれる。これら新たな法律の制定により上市までのプロセスが簡略化され実用化を促進する流れができたことや、細胞加工業務を企業が受託できるような仕組みを盛り込むことで再生医療を一つの医療分野としての位置づけではなく新たな産業として企業を巻き込んだプロセス作りが進められており、国内外で再生医療の実用化がより一層進むことが期待される。

一方で、再生医療実用化には安全性面で多くの課題が残されている。現在行われている培養の多くは細胞の加工にウシ血清を始めとした動物由来因子を使用しており、これら因子から培養細胞を介した被験者へのウィルス感染や有害な免疫反応が発生する可能性等多くの危険性を抱えている（Bjare. 1992, Price and Gregory, 1982, Even et al. 2006）。米国の Food and Drug Administration(FDA)は治療に用いる細胞の培養に使用する FBS について、プリオン感染等がない特定の地域のものに限定して使用を許可するとともに、その安全性の確認を強く求めている(Halme et al., 2006)。しかし、これは十分な安全性の担保にはつながらないため、FBS に代わる代替物や新たな培養技術の開発が必要となる。経済産業省は再生医療実用化及び産業化のための技術的課題を示した再生医療分野の技術マップ（経済産業省技術戦略マップ 2010）を公開している。この技術マップでは高性能な培養液の開発が再生医療産業化のための技術的課題の一つとして挙げられている。具体的には“安全且つ高効率な培養が可能な低価格な培養液”とし

て安全性の担保された血清培養液及び安全性の確保された高い増殖性能を有する無血清培養液の開発を求めている。このように培養技術のみならず培養液の改良は再生医療の早期実用化のための重要な要素といえる。

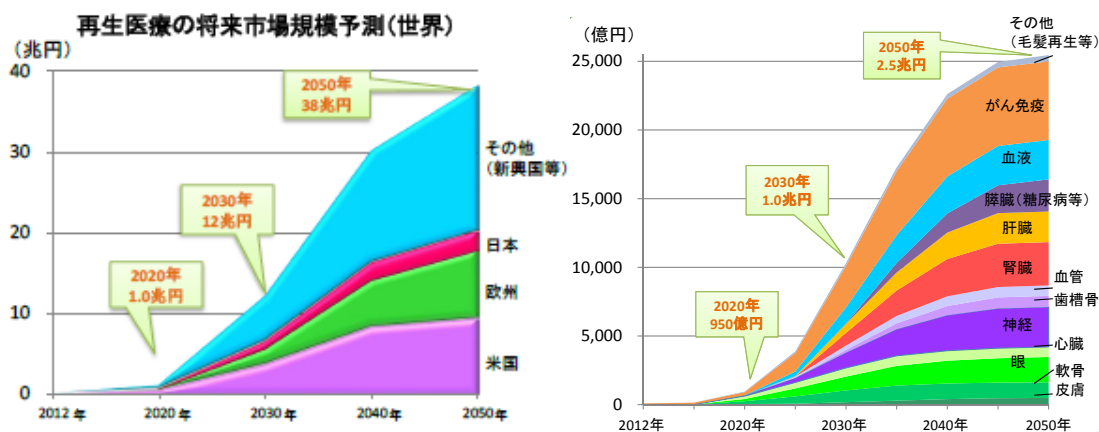


図1 再生医療の将来市場予測

出典：株式会社シードプランニング「平成24年度中小企業支援調査（再生医療の周辺産業に関する調査）報告書」より抜粋

#### 1.4. 脂肪由来間葉系幹細胞を使った再生医療

多能性幹細胞や組織幹細胞は、体外で培養・加工することで様々な細胞に分化することができることからその汎用性は高いが、幹細胞の臨床応用には問題も多い。例えば Embryonic stem cell (ES 細胞)はヒト受精胚から採取されるが、採取時にヒト発生の元となる受精胚を破壊することが倫理的に問題視されており、細胞を容易に得ることが難しい。遺伝子導入により作られる iPS 細胞は形質が不安定であり分化の過程で癌化の危険が高い。現在では、導入遺伝子や導入方法が改良されるとともに、癌化する可能性が低

い iPS 細胞を選択する技術が開発されつつあるものの、安全性を実証し実用化に進むためには時間がかかる。一方で MSCs は、様々な生体組織に存在することから採取に伴う倫理的ハードルは低い。また、組織幹細胞であることから癌化の危険性が少なく高い安全性を有する。MSCs は由来組織毎に機能が異なることを前述したが、特に脂肪由来 MSCs は高い有用性を持つ。具体的にはソースとなる脂肪組織が生体内に豊富に存在し、脂肪組織の採取は患者の QOL への影響が少ない。さらに骨髄由来 MSCs やその他の組織由来 MSCs に比べ組織中に含まれる MSCs の量が多く (Strem et al., 2005)、増殖能が高いこと (Cowan et al., 2004)、血清枯渇環境下誘導されるアポトーシスに対して強い抵抗性を持つこと (Peng et al., 2008)、遺伝的安定性が高い事 (Dahl et al., 2008)、bFGF や TGF $\beta$  等のサイトカイン発現率が高い事 (Peng et al., 2008) 等である。特に豊富なソースと、組織中に MSCs が多く含まれることは、再生医療に利用する上で AT-MSCs の大きな利点であると言える。

これまでに実験動物を用い、AT-MSCs による免疫抑制能や組織修復能について検討した多数の報告がある (Cowan et al., 2004、Yañez et al., 2007)。さらにはヒトに対する臨床研究も行われており、変形性関節症、関節リウマチ、大腿骨頭壊死症、乳房再建等を始めとした様々な疾患に対して脂肪由来幹細胞の有効性が示されている (Gimble et al., 2010、Gonzalez et al., 2009、Lindroos et al., 2011、Liu et al., 2008、Miyahara et al., 2006)。このことから、脂肪由来幹細胞は幹細胞の中でも特に有用な細胞として再生医療への早期実用化が期待される。

#### 1.5. 脂肪由来間葉系幹細胞と無血清培養

脂肪由来幹細胞を用いた臨床研究の多くは、1回の治療に $1 \times 10^7 - 10^9$ の細胞数を必要とする。この必要な細胞数を得るため事前にFBSを含む培養液で細胞の培養及び増幅が行われる。しかしFBSはLot毎に大きな性能差があることやウィルス感染及び重篤な免疫反応を引き起こす因子であること等多数の問題を抱える。Lot毎の性能の違いは、治療に供する細胞の数や性質に影響することから高度な品質管理を求められる医療分野においてその使用は望ましくなく、治療上の安全性の担保は本医療行為において必須なものである。

これまでMSCs培養でFBSによる危険性を回避する手段として、自己血清や他家血清（ヒト血清）、Platelet rich lysate（PRP）、無血清培養液等を使用した研究報告あり、その有用性が報告されている(表1、Shahdadfar et al., 2005、Goedecke et al., 2011、Kocaoemer et al., 2007)。しかしヒト血清やPRPはFBSを使用した場合と同様にLot間で性能に大きな差があることが報告されており(Parker et al., 2007)、また治療に必要な細胞を回収するためにはラージスケールでの培養が必要となることから、場合によっては必要なヒト血清を十分確保出来ない可能性が考えられる。一方で、無血清培養液は血清を必要としない培養液でありこれら血清及び血清代替物が抱える問題を回避できる。すでに国内外いくつかの企業はMSCs専用の無血清培養液を開発、販売している(Chase et al., 2010)。しかし、これら無血清培養液は製品毎に性能が大きく異なることや、従来のFBSを使用した培養液に比べ安定して培養することが出来ない等不安定性が懸念される(Gottipamula et al., 2013)。さらに現在行われている脂肪由来MSCsを使った無血清培養に関する研究報告の多くは、1-2継代目まで血清培養液を使用し、その後無血清培養液に切り替える事でその評価を行っており(Lindroos et al., 2009、Rajala et al., 2010)、分離-初代培養-継代培養の全ての工程を無血清条件化で行う”無血清培養系”は未だ確立

されていない。脂肪由来幹細胞の無血清培養系構築について研究した Patrikoski et al.(2013)は、実験に使用した 6 検体中 2 検体は、初代培養において無血清条件下では培養容器へ接着しなかったと報告しており、無血清条件下での初代培養の難しさを示している。このことから、AT-MSCs の再生医療応用を進めるためには、安定的に分離-培養が可能な無血清培養系の構築が必要である。さらには無血清培養液で増幅した MSCs による *in vivo* での組織修復効果を詳細に検証した報告はこれまでになく、その有効性は不明なままである。

以上の点から、AT-MSCs を安定的に無血清環境下で分離-培養できる無血清培養系の開発と、無血清培養細胞の組織修復に対する有効性を示すことができれば、多くの問題を抱える従来の血清培養に代わる技術を確立でき、AT-MSCs の再生医療応用に大きく寄与するものになると考える。



表1 血清代替物の比較

	Fetal bovine serum (FBS)	Human serum	Platelet lysate(hPL)/platelet rich plasma(PRP)	Serum free medium
Adherence to plastic	+	+ <sup>1</sup>	+	+ <sup>2</sup>
Morphology	Spindle shape	Smaller and more spindle shape	Elongated and more spindle shaped(hLPL)・Smaller cells in PRP	More spindle shape
CD105	+	+	+	+
CD90	+	+	+	+
CD73	+	+	+	+
CD45	-	-	-	-
CD34	-	-	-	-
CD14/CD11b	-	+/- <sup>3</sup>	-	-
HLA-DR	-	-	-	+/- <sup>3</sup>
Tri-lineage differentiation	+	+	+	+ <sup>4</sup>
CFU-F efficiency	Large and well spread	Densely packed.Mesh-like growth pattern in later passage	Densely packed.Mesh-like growth pattern in later passage	Varies with media components
Doubling time	76-89 hr.	↓/=	↓/=	↓ (23~72hr.) <sup>5</sup>
Cost and availability	約¥50,000-70,000/500mL <sup>6</sup>	Available and cheaper	Available and cheaper	¥36,000~130,000/500mL <sup>6</sup>
Others	Different lot to lot. Contaminate with virus.	Different lot to lot. Limited source. Contaminate with virus.	Different lot to lot. Limited source. Contaminate with virus.	Safety

引用: Tekkotte et al.,2011 "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. Stem Cells Int. Table1を一部改変。

- 1: Decrease in later passages
- 2: When adhesion factors are added
- 3: Affected by factors added in the medium
- 4: Defined media for each specific differentiation are available
- 5: Gottipamula et al. (2013)のデータから引用
- 6: websiteに表示されている定価を示した。

## 第 2 章 目的

脂肪組織由来 MSCs の臨床応用を促進するため、細胞加工工程の安全性や効率性の向上を計ることができる新たな培養工程を開発するとともに、培養細胞の組織修復に対する有効性を立証するため以下の 2 点について行った。

1. FBS を使用した従来 of 血清培養系と同等以上の増幅効率性を有する無血清培養系（無血清条件下、脂肪組織から MSCs を単離-増幅が可能な培養系）を構築し、培養系の安定性及び安全性を実証すること。
2. 上記無血清培養系で得られた AT-MSCs の *in vivo* での組織修復に対する有効性を検証し、従来 of 血清培養系で得られた MSCs に対する優位性の有無を明確にすること。

## 第 3 章 実験方法

### 3.1. ヒト脂肪組織から AT-MSCs の分離と培養

本研究は、筑波大学付属病院臨床研究倫理委員会の承認を得て行われた。ヒト脂肪組織は、心臓血管外科にて外科手術を受けた患者のうちインフォームドコンセントに同意を頂いた患者から採取した。

ヒト脂肪組織はハサミで細断し PBS (Cell Science Technology Institute, CSTI, Sendai, Japan) +2%FBS(Hyclone, South Logan, UT) +0.1% コラゲナーゼ L(Nitta gelatin, Tokyo, Japan)又は改変  $\alpha$ MEM basal medium (CSTI) +2%ヒト血清アルブミン (HSA, Sanquin, Amsterdam, Nederland) +0.1%コラゲナーゼ L 中で 37°C、1 時間インキュベートした。コラゲナーゼ処理された組織は 100 $\mu$ m のフィルターを通した後 20mL の PBS+2%FBS 及び PBS+2%HSA をそれぞれ加え 1500rpm、7 分間遠心洗浄し、PBS+2%FBS 又は PBS+2%HSA で pellet を懸濁し遠心した。回収した pellet は血清含有培養液 (SCM, ( $\alpha$  MEM (Invitrogen Life Technologies, Oregon, U.S.A.) +10%FBS +10ng/mL bFGF (PeproTech Rocky Hill, U.S.A.))及び無血清培養液 (SFM, 改変型  $\alpha$  MEM (CSTI) +bFGF, PDGFBB, TGF $\beta$ (PeproTech)) に懸濁後、25cm<sup>2</sup>フラスコあるいは 35mm dish(SUMILON, Tokyo, Japan)に播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿環境下 (CO<sub>2</sub> インキュベーター内) インキュベートした。なお無血清培養で使用する容器はフィブロネクチン(wako)でコーティングしたものを使用した。培養液は 3 日毎に新鮮培養液に交換した。細胞は約 90%コンフルエンスに達した段階で、リコンビナントトリプシン (r-TE、CSTI) でフラスコに接着した細胞を剥離し、さらに合成トリプシンインヒビター (s-TI、CSTI) でトリプ

シン活性を中和した後 PBS を加え細胞を遠心洗浄した。得られた細胞ペレットは一定濃度になるよう PBS に懸濁した後、新たな容器に播種した。

### 3.2. ヒト脂肪組織から細胞の分離工程の評価

ヒト脂肪組織は方法 3.1 で述べた方法のように細断された後、以下 3 つの溶媒中でコラゲナーゼ処理を行った（条件①：PBS、条件②：PBS +2%FBS、条件③：改変  $\alpha$  MEM basal medium +1%HSA）。処理後、pellet は FBS または HSA を含む PBS で洗浄された。細胞は 1mL の RBC Lysis buffer (154 mM ammonium chloride (Wako, Osaka, Japan), 10 mM potassium hydroxide (Wako), 82  $\mu$ M EDTA-4 Na (DOJINDO Molecular Technologies, Kumamoto, Japan) in water) で懸濁された後 37°C で 5 分間インキュベートした。その後 PBS で細胞を洗浄することで赤血球を除去した。細胞は、抗体 CD31-FITC, CD73-PE, CD90-PEcy5, CD45-APC (BD Pharmingen, CA, U.S.A.) で 4°C、30 分間染色され、その後 PBS+2%FBS で遠心洗浄 (1500rpm, 5 分間) 後 PBS に懸濁した。各細胞懸濁液には懸濁液と等量の flow-count beads (Beckman coulter) を加えフローサイトメーター-Galios (Beckman coulter) で測定を行った。また測定データの解析はソフトウェア K aluza (Beckman coulter) で行った。CD90+, CD73+, CD31-, CD45- 絶対細胞数の計測は、以下の式にて計算した。

$$\text{CD90+, CD73+, CD31-, CD45-絶対細胞数} = \text{flow-count beads 濃度 (beads/}\mu\text{l)} \times (\text{CD90+, CD73+, CD31-, CD45- 細胞 event 数}) / (\text{flow-count beads event 数})$$

### 3.3 細胞増殖能の評価

細胞増殖能の評価を行うため、培養液が入った T25-Flask(SUMILON)に細胞を播種し、

約 90%コンフルエンスまで細胞が増えた段階で、r-TE/s-TI(CSTI)を加え細胞を回収した。T25-Flask を PBS で共洗いした後、細胞数を血球計算盤で計測した。細胞は 1000rpm, 5 分間遠心され、培養上清を廃棄した後、一定量の細胞を新たな T25-Flask に播種した。これを 1 継代とし、5~10 継代培養を続けた。

様々な増殖因子による AT-MSCs への増殖促進効果の検証には Cell counting kit (Nacalaitesque, KYOTO, Japan)を使用した。具体的には、 $3.5 \times 10^3$  cells/50 $\mu$ l の AT-MSCs を 96well micro plate (SUMILON)に播種した。さらに各増殖因子及び 1%FBS を含有する  $\alpha$  MEM を各 well に 50 $\mu$ l ずつ加え total 100 $\mu$ l とし、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5 日間培養した。増殖能測定前に、cell counting kit assay reagent を 10 $\mu$ l ずつ well に加え CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 時間培養した。培養後各 well の 450nm の吸光度 (リファレンス; 570nm) をモデル 680 マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で測定した。得られた吸光度から、増殖因子を含まない条件の吸光度を 1 とし、各条件の増殖性能を比較した。

#### 3.4. 他組織由来幹細胞の採取と増殖評価

骨髄液及び知歯はインフォームドコンセントにより同意を得た患者から採取した。骨髄液は PBS で 2 倍に希釈した後、比重液とともに比重遠心 (2400 回転, 20 分間) した。遠心後単核球層を回収し、血清含有培養液または無血清培養液を含むフラスコに播種し 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。3 日後浮遊細胞を除去し新鮮培養液を加えた。さらに培養を続け 80-90%コンフルエンスに達した段階で新たなフラスコに継代した。

歯髄及び歯根幹細胞は、採取した知歯から歯髄及び歯根膜を採取し、ハサミで細断後 0.1%コラゲナーゼ及び 2%FBS を含む PBS 中で 37°C、1 時間インキュベートした。そ

の後 2%FBS を含む PBS で細胞を洗浄した。骨髄及び歯髄幹細胞は各培養液で 1 継代培養後の細胞を、歯根膜由来幹細胞は血清含有培養液で 2 継代培養後の細胞を増殖試験に使用した。一定数の細胞を SCM または SFM を含む T-25 フラスコに播種し 3 日毎に培養液を新鮮培養液に交換した。細胞は 90%コンフルエンスになった段階で r-TE/s-TI で細胞を回収し 4 継代以上培養を続けた。細胞数は各継代時に血球計算盤を使い計測した。無血清培養に使用したフラスコはフィブロネクチンでコーティングしたフラスコを使用した。

### 3.5. 表面抗原解析

培養細胞を r-TE/s-TI(CSTI)により培養容器から剥離し、PBS(CSTI)で洗浄した。その後 各抗体(抗体-CD13 (1:200), -CD14 (1:200), -CD31 (1:40), -CD34 (1:200), -CD45 (1:200), -CD73 (1:200), -CD90 (1:40), -CD105 (1:200), -CD166 (1:40), -HLA-DR (1:200) 抗体 (BD Pharmingen)を含む PBS+2%FBS 中で 4℃環境下 30 分間インキュベートし、その後 PBS+2%FBS で洗浄した。細胞は 400 $\mu$ l の PBS+2%FBS で懸濁され表面抗原の発現は、フローサイトメーターGalios (Beckman coulter, Fullerton, CA)により分析された。測定データの解析は解析ソフト Kaluza (Beckman coulter)で行った。

### 3.6. 多分化能の評価

培養細胞は 4-well IVF plate (BD Falcon)に播種し、増殖用培養液で培養された。細胞がコンフルエンスに達した後、増殖用培養液を取り除き PBS で洗浄後、脂肪分化用培養液 ((IMDM (Invitrogen) +10% FBS (Hyclone), 0.5 mM 3-isobutyl 1-methylxantine (Sigma-Aldrich), 10  $\mu$ g/mL insulin (Wako), 0.1 mM Dexamethasone (Sigma-Aldrich), 2

00  $\mu$ M Indomethasine (Sigma-Aldrich))又は骨芽細胞分化用培養液 (IMDM +1%BFS, 10 mM  $\beta$ -glycerol (Sigma-Aldrich), 200  $\mu$ M ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 0.1 mM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 20 ng/ml EGF (PeproTech, USA)を加えた。分化培養液は3, 4日毎に新鮮な各分化用培養液に交換し30日間培養した。30日後、脂肪細胞への分化及び骨芽細胞への分化はオイルレッドO(Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)及びアリザリンレッドS(Kodak, Tokyo, Japan)でそれぞれ染色することにより評価した。さらに分化強度の定量を行うため、これら染色液で染色した細胞に対して脂肪細胞分化条件へはイソプロパノール+2%IGEPAL(Sigma-Aldrich)溶液を、骨芽細胞分化条件へはプランクリュクロ液 (Kantokagaku, Tokyo, Japan) を加え、分光光度計でそれぞれ492nm 及び 480nm の吸光度を測定した。

軟骨細胞への分化は、軟骨分化用培養液(IMDM +1% FBS, 1% ITS-premix (BD Bioscience), 4 mM proline (Sigma-Aldrich), 50  $\mu$ g/mL Ascorbic acid, 0.1 mM dexamethasone, 1 mM sodium pyruvate ((Sigma-Aldrich)), 10 ng/mL TGF- $\beta$ 3 (PeproTech, USA), 20 ng/mL BMP-6 (PeproTech, USA)), 20 ng/mL BMP-6 (PeproTech, USA)に懸濁した培養細胞を low-cell adhesion 96 well plate (SUMILON)へ  $2.5 \times 10^5$  cells/200 $\mu$ l/well の条件で播種した。軟骨分化用培養液は3-4日毎に新鮮な軟骨分化用培養液に交換した。30日後、スフェロイドを回収しPBS(CSTI)で洗浄後4% パラホルムアルデヒド溶液 (Nacalaitesque, KYOTO, Japan)で固定した。その後スフェロイドを10%, 20%, 30% スクロース溶液 (Nacalaitesque) に各1時間浸漬した後、O.C.T compounds(Sakura Finetek USA, Inc., CA)に凍結封埋した。凍結ブロックを7mm厚で薄切し、トルイジンブルーで染色した (Muto Pure Chemicals)。

### 3.7. 核型解析

新たに開発した無血清培養液で10継代培養した AT-MSCs を 10cm<sup>2</sup>dish に播種し、80%コンフルエンスに達した段階で Karyo-Max(Invitrogen)を加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で、6 時間インキュベートした。その後、r-TE/s-TI(CSTI)で細胞を剥離し遠沈管に回収した。細胞が入った遠沈管は LSI Medience Corporation (Tokyo, Japan, <http://www.medience.co.jp>)に送られ核型解析が行われた。

### 3.8. SA-β-galactosidase 活性の評価

SA-β-galactosidase 活性の測定を行うため 2.5×10<sup>4</sup> 個の AT-MSCs を 96well microplate (SUMILON) に播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晩インキュベートした。その後培養上清を取り除き PBS で細胞を洗浄後、50μl の PBS と 50μl の Beta-Glo assay system (Promega, Madison, WI) を各 well に加え室温、暗所でインキュベートした。30 分後、上清の発光強度をルミノメーター (TD-20/20, TURNER DESIGN) で測定した。

### 3.9. CFU-F assay

間葉系幹細胞は自己複製能を有し単一細胞が分裂を繰り返すことでコロニーを形成する。このコロニー形成能を評価するため Digirolamo et al.(1997)の方法を一部改変し CFU-F assay を行った。具体的には、SCM または SFM で 4 継代培養した AT-MSCs 100 個を 10cm dish(SUMILON)に播種し 8mL の SCM を加え 14 日間、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養液は 3 日毎に新鮮培養液に交換した。14 日後、培養上清を廃棄し、細胞が付着した dish を PBS で 3 回洗浄した。その後 メタノールに溶解した 5mL の 0.5%クリスタルバイオレット(Sigma-aldrich)溶液を dish に加え、10 分間室温に放置し



細胞を染色した。染色後、クリスタルバイオレット溶液を除去し、大量の水で dish を洗浄した。顕微鏡下クリスタルバイオレットに染まった細胞数を計測し、細胞数が 50 個以上集まっているものをコロニーとして、形成されたコロニーの数を計測した。さらにこの dish をデジタルカメラにて撮影した。

### 3.10. 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析を行うため培養細胞から RNA の抽出は RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA)を、RNA から cDNA の合成は ReverTra Ace (TOYOBO, Osaka, Japan)を、cDNA から目的遺伝子の増幅は RT-polymerase chainreaction kit (TOYOBO)を使用し、取扱説明書に従い行った。cDNA から目的遺伝子の増幅を行うため、反応溶液中に cDNA, primer (forward&reverse), TAQ を加え Gene Amp PCR system 9100 (Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用し変性(95°C, 30 秒) and 伸張 (55-65°C, 30 秒) で 24-40 サイクル反応を行った。また定量的 RT-PCR は THUNDERBIRD SYBER qPCR Mix (TOYOBO) を使い、取り扱い説明書に従い 7500 Fast Real time PCR system(ABI)で測定及び解析を行った。実験に使用したプライマー配列は表 2 に示した。

### 3.11. ELISA assay

BMP2 及び CCL2, CCL5 の ELISA assay は市販の ELISA キット(DuoSet ELISA Development Kit, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を使い、取り扱い説明書に従い行った。吸光度は Model 680 マイクロプレートリーダー(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)で測定した。

測定に使用する培養上清を回収するため、AT-MSCs を dish に一定濃度播種した (B

MP2:  $3.3 \times 10^5$  cells/mL、CCL2, CCL5:  $1 \times 10^5$  cells/mL)。CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48 時間培養後、培養上清を回収した。また、予備検討の結果、BMP2 及び CCL5 を培養上清中で検出できなかったため、細胞を 10ng/mL の TNF- $\alpha$  を加えた各培養液中で 48 時間刺激し、その培養上清中の BMP2 及び CCL5 の検出をあわせて行った。

### 3.12. 免疫抑制活性の評価

免疫抑制活性の評価は、Zafranskaya et al. (2013)によって報告された方法を一部改変し行った。具体的には RPMI-1640 で  $1 \times 10^7$  cells/mL に懸濁した健常人ヒト末梢血単核球 (hPBMC) に蛍光色素 CFSE を 10nM 加え、37°C で 5 分間インキュベートすることで、hPBMC を CFSE(DOJINDO)で染色した。その後、CFSE 染色細胞を PBS で 3 回洗浄し細胞外の CFSE を除去した。CFSE で染色した hPBMC :  $5 \times 10^5$  cells/100 $\mu$ l と AT-MSCs :  $1 \times 10^5$  cells/100 $\mu$ l を、RPMI1640 +10%FBS +50IU/mL インターロイキン 2(IL-2), 10mg/mL Phytohaemagglutinin(PHA)を含む培養液中に播種後、37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で共培養した。培養液は 3 日毎に新鮮培養液に交換した。培養 5 日目に細胞を回収し、CD3-ECD(1:80, IO-TEST), CD45-PC5(1:80, IOTEST)を加え 30 分間、4°C、暗所で細胞を染色した。CD3+CD45+ポピュレーションを hPBMC ポピュレーションとし、hPBMC 中の CFSE 蛍光強度の変化をフローサイトメーターGalios で測定した。また解析はソフトウェア Kaluza で行った。なお、ポジティブコントロールとして、CFSE 非染色 hPBMC のみ培養した条件 (非共培養)、ネガティブコントロールとして、PHA を含まない培養液中で CFSE 染色 hPBMC を培養した条件を設定した。

表 2 プライマー配列

Primer	Sense (5' → 3' )	Antisense (5' → 3' )
Runx2	CTCCCAAGTAGCTACCTATCACA	GCTCTTCTTACTGAGAGTGGAAGG
Osteocalcin	GCACAGCCCAGAGGGTATAA	GGAATGAGACTGAGGGACCA
Osteopontin	TGAGAGAGGCCTTGGGACTA	GTGGAGGGAAGTCCGAAAAT
ALP	CTGGTAGGCGATGTCCTTA	ACGTGGCTAAGAATGTCATC
collagen1	GGAGAGTACTGGATTGACCCCAACCA	CGCTGTTCTTGCACTGGTAGGTGATGT
PPAR $\gamma$	GCCAAGGCTTCATGACAAGGGAGTTTC	CACGTGTTCCGTGACAATCTGTCTGAG
LPL	AGAGGACTTGAGATGTGGACCAGCTA	GGTATGGGTTTCACTCTCAGTCCCAGA
ApoC2	GTTCCCTGTGACGTGACCTT	TGTGGTGGTGCACCTGTAGT
Oct 4	AAGCTCCTGAAGCAGAAGAGGATCACC	GGTTACAGAACCACACTCGGACCACAT
Nanog	CCTCCATGGATCTGCTTATTCAGGACA	CCTTCTGCGTCACACCATTGCTATTCT
Sox2	TACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAG	CCGGTATTATAATCCGGGTGCTCCTT
Rex1	CAACCCATCCTGGAAGAGGACTCACTT	GGAGATGCTTTCTCAGGGCAGCTCTAT
VEGF	GAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTG	CTGCATGGTGATGTTGGACTCCTCAGT
bFGF	AGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAAC	ATAGCTTTCTGCCCAGGTCTGTTTTG
PDGFBB	GACCTGTCCAGGTGAGAAAGATCGAGA	AAATAACCCTGCCACACACTCTCCTG
EGF	CTACCAAGGAGATGGGATTAC	GTGGAGTAGAGTCAGGGCAAAT
BMP2	ATCCCCACGGAGGAGTTTAT	ACCAACCTGGTGCCAAAAG
CXCL12	AGAGCCAACGTCAAGCATCT	CTTTAGCTTCGGGTCAATGC
CCL2	GGCTGAGACTAACCAGAAACATCC	TGGGTTGTGGAGTGAGTGTTCAAGT
CCL5	AACCCAGCAGTCGTCTTTGT	TTC AAGACTCTCCATCCTAGC
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
$\beta$ actin	GCGAGAAGATGACCCAGATC	CCAGTGGTACGGCCAGAGG

### 3.13. 大腿骨骨折モデルマウスの作成

全ての動物実験は、筑波大学動物実験取り扱い規定に従い行った。また大腿骨骨折モデルマウスの作成は既に論文報告されている方法を一部改変し行った(Taguchi et al., 2005)。具体的には 8-12 週齢の C57/BL6 マウスに麻酔をかけ右足大腿部を切開した後、大腿骨中央部をハサミで切断した。切断した大腿骨は随腔に 27G の注射針を刺し切断

部に 2mm 程度の間隙ができるように大腿骨を再度つなげた。5×10<sup>5</sup>cells の AT-MSCs は 2mm×2mm の Gelform(Pfizer, USA)とともに 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で 10 分間インキュベートし、大腿骨切断部に移植した。なお、ネガティブコントロールとして AT-MSCs の代わりに PBS を加えたゼルフォームを移植した。移植後、免疫抑制のためサイクロスポリン A(wako)を 20mg/kg(体重)を 4 日毎腹腔内投与した。

### 3.14. 組織の定性及び定量解析

AT-MSCs 移植による、骨折部位の修復効果を解析するため、X 線撮影及び組織染色を行った。具体的には、細胞移植後 20, 30, 40 日後マウスに麻酔を投与した後、X 線撮影を行った。その後マウスの右足を切断し、筋肉組織を除去することで大腿骨を回収した。大腿骨は 4%パラホルムアルデヒド (Nacalaitesque) で冷蔵環境下、7 日間保存し組織を固定した。その後、大腿骨を PBS で洗浄しプランクリュクロ液 (Muto chemical) 中で室温環境下 24 時間置くことで大腿骨を脱灰しさらに 99.5%エタノールに浸漬した。パラフィンブロック作成は筑波大学医学系技術室 (組織標本作成室) に依頼を行った。パラフィンブロックは滑走式マイクロトーム (Leica SM2010R) で 7µm に薄切した。切片はキシレン及びエタノールに浸すことでパラフィンを除去し、水洗した。その後切片を以下の工程で染色した：ヘマトキシリンブルーに浸漬 (5 分) →水洗(5 分)5 エオシンレッドに浸漬(30 秒)→水洗 (5 分)。染色後切片をエタノール及びキシレンに浸漬し、マリノールで切片をガラススライド上に封入した。

一方アルカリホスファターゼ染色を行うため未脱灰大腿骨切片の作成は Hosoya et al. (2005)の方法を一部改変し行った。具体的には、回収した大腿骨を 10%ホルマリン

に 24 時間浸漬後、10%、20%、30%スクロースに各 1 時間浸漬した。大腿骨は 4%カルボキシメチルセルロースで凍結封埋された。作成した凍結ブロックをクリオスタット (Leica) にセットし面出し後、クライオフィルムでカバーし薄切した。凍結フィルム切片は 99.5%エタノールに 3 分間、4%パラホルムアルデヒドに 5 分間浸漬後水洗し、ALP/TRAP 染色キットを使い取り扱い説明書に従い 15 分間アルカリホスファターゼ (ALP) の染色を行った。その後 IX70 (Nikon, Tokyo, Japan) 及び BZ-X700 (Keyence, Tokyo, Japan)で切片の撮影を行った。

細胞移植による大腿骨の修復程度を定量的に解析するため、 $\mu$ CT 及び骨強度試験装置で骨密度及び骨強度の解析を行った。マウスから回収した大腿骨は 4%パラホルムアルデヒド中で一晩冷蔵保存した後、測定まで $-30^{\circ}\text{C}$ フリーザー内で保存した。骨密度の測定は、大腿骨を動物用  $\mu$ CT Aloka Latheta LCT-100 system (Hitachi, Tokyo, Japan)にセットし 0.25mm 間隔で 30 枚の骨断面写真を撮影し、その撮影画像から骨密度を算出した。骨の 3D イメージ作成は解析ソフト OsiriX で行った。

一方、骨強度試験は、大腿骨を骨強度試験機 (Bone Strength Tester model TK-252 C, Muromachi Kikai, Tokyo, Japan) にセットし、3 点折り曲げ試験により、骨切断までに加えられた力と距離から、stiffness や failure load (N)を算出した。

### 3.15. Quantum dots による細胞追跡評価

移植細胞の生体内での動態を追跡するため、以前報告された方法を一部改変し蛍光量子ビーズ Qdots(QD655)を用いたイメージング解析を行った (Ohyabu, Y et al., 2007, Pietilä et al., 2013, Yoshioka et al., 2011)。この方法は抗モーターリン抗体を conjugate した QD655 を AT-MSCs に取り込ませ、その細胞をマウスの大腿骨欠損部に移植し動態を

解析する方法である。今回参考にした上記文献においてモータリンを conjugate 化した QD655 を細胞に取り込ませる事により、QD655 は細胞質内に長期間保持されることが確認されている。

本実験で使用した抗モータリン抗体は（独）産業技術総合研究所細胞増殖制御ユニットグループ長のレヌーワダワ先生から御提供いただいた。また抗モータリン抗体と QD655 との conjugation は、市販の antibody conjugation kit(Q2203MP, Invitrogen Lifetechnologies)を使用し、取り扱い説明書に従って行った。

抗モータリン抗体を conjugation した QD655 (i-QD)を AT-MSCs へ取り込ませるため、AT-MSCs を培養している培養液中に i-QD を加え 37℃、5%CO<sub>2</sub> 環境下、48 時間培養した。その後細胞を回収し PBS で 3 回洗浄後、蛍光顕微鏡 IX70 (Nikon)で i-QD が AT-MSCs の細胞内に取り込まれている事を確認した後実験に使用した。

### 3.16. 統計処理

データは平均値±標準偏差で示した。血清培養細胞と無血清培養細胞との比較は Student's の T 検定で分析した。また多重比較解析は、ANOVA 解析後 Turkey-Kramer テストにより、各条件間の差の有無を解析した。なお統計解析は統計解析ソフト GraphPad Prism 5 (GraphPad software, San Diego, CA)を使用して行った。また統計的有意差は  $P < 0.05$  とし算出した。

## 第 4 章 結果

### 4.1. 無血清培養液の開発

#### 4.1.1. 既存無血清培養の問題点抽出

増幅効率性や培養安定性が高い AT-MSCs 用の無血清培養系を開発するため、始めに市販無血清培養液を用いた既存の無血清培養（系）が抱える問題を調査した。結果、①市販無血清培養液は論文毎に増殖性能に良否があり不安定であること、②増殖効率が血清培養と同程度でありさらなる向上が必要であること、③無血清初代培養では容器への接着不良傾向があり安定培養が可能な系が構築できていないこと等が問題点として考えられた(Gottipamula et al., 2013、Patrikoski et al.(2013))。私はこれらを改善するための方法として以下のように考えた。

①について、市販無血清培養液の組成が開示されていないためその原因は不明であるが、同種細胞でありながら由来ドナー毎に増殖の良、不良が分かれ、培養が不安定であることから何らかの因子が不足しておりその因子自体は市販無血清培養液に含まれておらず副次的反応の中でその作用が補われていると推測した。特に不均一な細胞集団であるとされる MSCs では、ドナー毎にポピュレーションが異なり培養に必要な因子が培養液中に十分量ふくまれていなければ培養の不安定化につながる可能性もある。通常必要な栄養因子の多くは基礎培養液から供給されるが、細胞種や培養法に合わせた様々な組成のものがあることから、AT-MSCs に合わせた最適な基礎培養液選定が必要である。一方で FBS から供給される増殖因子は増殖刺激のみならず一部の代謝促進、接着促進等細胞機能を多岐に制御することから、最適な増殖因子の選定が①のみならず②の解決

につながる可能性は高い。加えて増殖因子の保護や老廃物除去に働くアルブミン、酵素活性を維持するための微量金属、細胞膜合成促進のための脂質等も、FBS から供給され欠かすことのできない因子であり、副次的な有効性も考え必要な因子を広く選定する必要がある。一方、③については、コラーゲンやラミニン、フィブロネクチン等の細胞外マトリクスを含まない無血清培養液を用い細胞を培養する場合、容器への細胞外マトリクスのコーティングが必須である。通常、細胞表面に発現する接着分子が細胞外マトリクス表面の結合領域に結合することで、細胞の接着、移動、増殖を可能とするが、この結合領域の構造はマトリクス毎に異なるため、培養細胞に適したマトリクス選定が重要となる。不均一な集団であると言われる MSCs の初代培養において、単一マトリクスでは全ての細胞の接着や増殖をサポートできず複数の細胞外マトリクスによる異なるタイプの結合領域の提示が必要かもしれない。一方で、増殖因子は、インテグリンの発現と結合領域の認識を変化する報告もあることから、開発した無血清培養液に合わせ、最適な接着因子を選択することが、初代培養での接着不良改善につながると考えた。既存報告からのこれら考察をもとに、無血清培養系の核となる無血清培養液（系）の開発を進めた。

#### 4.1.2. 基礎培養液の選定

無血清培養液開発のため、始めにその基本組成となる基礎培養液の選定を行った。60 件の MSCs 関連の研究論文で MSCs の培養に使用されている基礎培養液の使用頻度を調査した結果、Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM),  $\alpha$ MEM を使用した論文が合わせて 54 件と大半を占め、IMDM 及び DMEM/F12 が各 3 件だった。各培養液の特徴として DMEM は比較的高い濃度のアミノ酸を含み、 $\alpha$ MEM は核酸が豊富に含まれる。



また、IMDM は多量の HEPES が含まれ緩衝能が強化されていることから増殖性の早い細胞や高密度培養に適している。一方 DMEM/F12 は DMEM と Ham's F-12 培養液の 1 : 1 混合物であり細胞の生存・増殖に必要な栄養因子を広範囲に含んでいる事から無血清培養液の基礎培養液としてよく使用されている。特に最近では ES 細胞や iPS 細胞用無血清培養に汎用されている。DMEM に含まれる成分は DMEM/F12 でカバーできることから基礎培養液選定は DMEM/F12,  $\alpha$ MEM, IMDM の 3 種類の基礎培養液に加え、上記 3 種の培養液とは異なり微量金属因子が豊富に含まれる RITC807 の 4 種類の基礎培養液について増殖性能の評価を行った(表 3)。なお本実験では一般的な血清濃度 (10%) に加え、低血清濃度 (1%) 条件での評価も行った。基礎培養液を比較した結果を図 2 に示した。1 %低血清条件下では基礎培養液の種類に関わらず細胞の増殖はほとんど認められなかった。一方、10%血清条件下での増殖は $\alpha$  MEM が DMEM/F12 及び RITC807 に比べ有意に高かった。一方 IMDM, DMEM/F12, RITC807 の 3 者間で有意差は見られなかった。さらにこれら基礎培養液で増幅した AT-MSCs の脂肪細胞及び骨芽細胞への分化能を評価した。結果、骨芽細胞への分化では IMDM が、脂肪細胞への分化では RITC807 が他の条件に比べ低い傾向を示した。(図 2B, C)。なお、1%血清条件では AT-MSCs の増殖がほとんど認められず分化能評価に必要な細胞数を確保出来なかったため、分化能の評価は行わなかった。以上の結果から、最も高い増殖傾向と安定した分化能を示した  $\alpha$  MEM を基礎培養液として選定することとした。

表3 各種培養液組成

Component	IMDM	$\alpha$ MEM	DMEM/F12	RITC80-7
<b>Inorganic compound</b>	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Sodium chloride	4505.0	6800.0	6999.5	6800.0
Sodium phosphate dibasic	109.0	-	71.0	-
Sodium phosphate monobasic H <sub>2</sub> O	-	140.0	62.5	115.0
Potassium chloride	330.0	400.0	311.8	400.0
Calcium chloride	219.0	200.0	116.6	200.0
Magnesium chloride	-	-	28.6	-
Magnesium sulfate	97.7	97.7	48.8	93.5
Sodium bicarbonate	3024.0	2200.0	2438.0	1400.0
<b>Nucleic acid</b>	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Hypoxanthine	-	-	-	0.2
Hypoxanthine 2Na	-	-	2.4	-
Thymidine	-	10.0	0.4	0.1
Putrescine 2HCl	-	-	0.1	0.02
2' Deoxyadenosine	-	10.0	-	-
2' Deoxycytidine HCl	-	11.0	-	-
2' Deoxyguanosine	-	10.0	-	-
Adenosine	-	10.0	-	-
Cytidine	-	10.0	-	-
Guanosine	-	10.0	-	-
Uridine	-	10.0	-	-
<b>Amino acid</b>	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
L-Alanine	25.0	25.0	4.5	-
L-Arginine HCl	84.0	127.0	147.5	126.0
L-Asparagine H <sub>2</sub> O	28.4	50.0	7.5	-
L-Aspartic acid	30.0	30.0	6.7	13.3
L-Cysteine HCl H <sub>2</sub> O	-	100.0	17.6	31.4
L-Cystine 2HCl	91.2	31.0	31.3	-
L-Glutamic acid	75.0	75.0	7.4	0.2
L-Glutamine	584.0	292.0	365.0	292.0
Glycine	30.0	50.0	18.8	7.5
L-Histidine	-	31.0	-	-
L-Histidine HCl H <sub>2</sub> O	42.0	-	31.5	42.1
L-Isoleucine	105.0	52.4	54.5	52.0
L-Leucine	105.0	52.0	59.1	52.0
L-Lysine HCl	146.0	73.0	91.3	73.0
L-Methionine	30.0	15.0	17.2	15.0
L-Phenylalanine	66.0	32.0	35.5	32.0
L-Proline	40.0	40.0	17.3	3.5
L-Serine	42.0	25.0	26.3	10.5
L-Threonine	95.0	48.0	53.5	48.0
L-Tryptophan	16.0	10.0	9.0	10.0
L-Tyrosine	-	-	-	36.0
L-Tyrosine 2Na	103.8	52.0	-	-
L-Tyrosine 2Na 2H <sub>2</sub> O	-	-	55.8	-
L-Valine	94.0	46.0	52.9	46.0

Component	IMDM	$\alpha$ MEM	DMEM/F12	RITC80-7
<b>Vitamin</b>	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Ascorbic Acid	-	50.0	-	-
Biotin	0.01	0.1	0.004	0.02
D-Ca pantothenate	4.0	1.0	2.2	1.0
Choline chloride	4.0	1.0	9.0	16.0
Cyanocobalamin(B12)	0.013	1.4	0.7	0.2
Folic acid	4.0	1.0	2.7	1.0
Folinic acid Ca	-	-	-	0.0
i-Inositol	-	2.0	12.6	2.0
Niacinamide(Nicotinamide)	4.0	1.0	2.0	1.0
Pyridoxal-HCl	4.0	1.0	-	1.0
Pyridoxine-HCl	-	-	2.0	-
Riboflavin	0.4	0.1	0.2	0.1
Thiamine HCl	4.0	1.0	2.2	1.0
Lipoic acid	-	0.2	0.1	-
<b>Trace element</b>	$\mu$ g/L	$\mu$ g/L	$\mu$ g/L	$\mu$ g/L
Copper sulfate 5H <sub>2</sub> O	-	-	1.3	0.0
Ferrous sulfate 7H <sub>2</sub> O	-	-	417.0	800.0
Ferric nitrate 9H <sub>2</sub> O	-	-	50.0	-
Manganous sulfate 5H <sub>2</sub> O	-	-	-	0.002
Ammonium molybdate 4H <sub>2</sub> O	-	-	-	1.3
Nickel chloride 6H <sub>2</sub> O	-	-	-	0.01
Sodium selenite	-	-	-	0.4
Ammonium vanadate	-	-	-	0.1
Zinc sulfate 7H <sub>2</sub> O	-	-	432.0	-
<b>Lipid</b>	$\mu$ g/L	$\mu$ g/L	$\mu$ g/L	$\mu$ g/L
Linoleic acid	-	-	0.04	-
<b>Other component</b>	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
D-Glucose	4500.0	1000.0	3151.0	1000.0
Sodium Pyruvate	110.0	110.0	55.0	110.0
Succinic acid	-	-	-	75.0
Disodium succinate	-	-	-	60.0
HEPES	5958.0	-	-	3300.0
Phenol Red sodium salt	11.0	10.0	8.1	6.0
Gentamycin sulfate	-	-	-	10.0

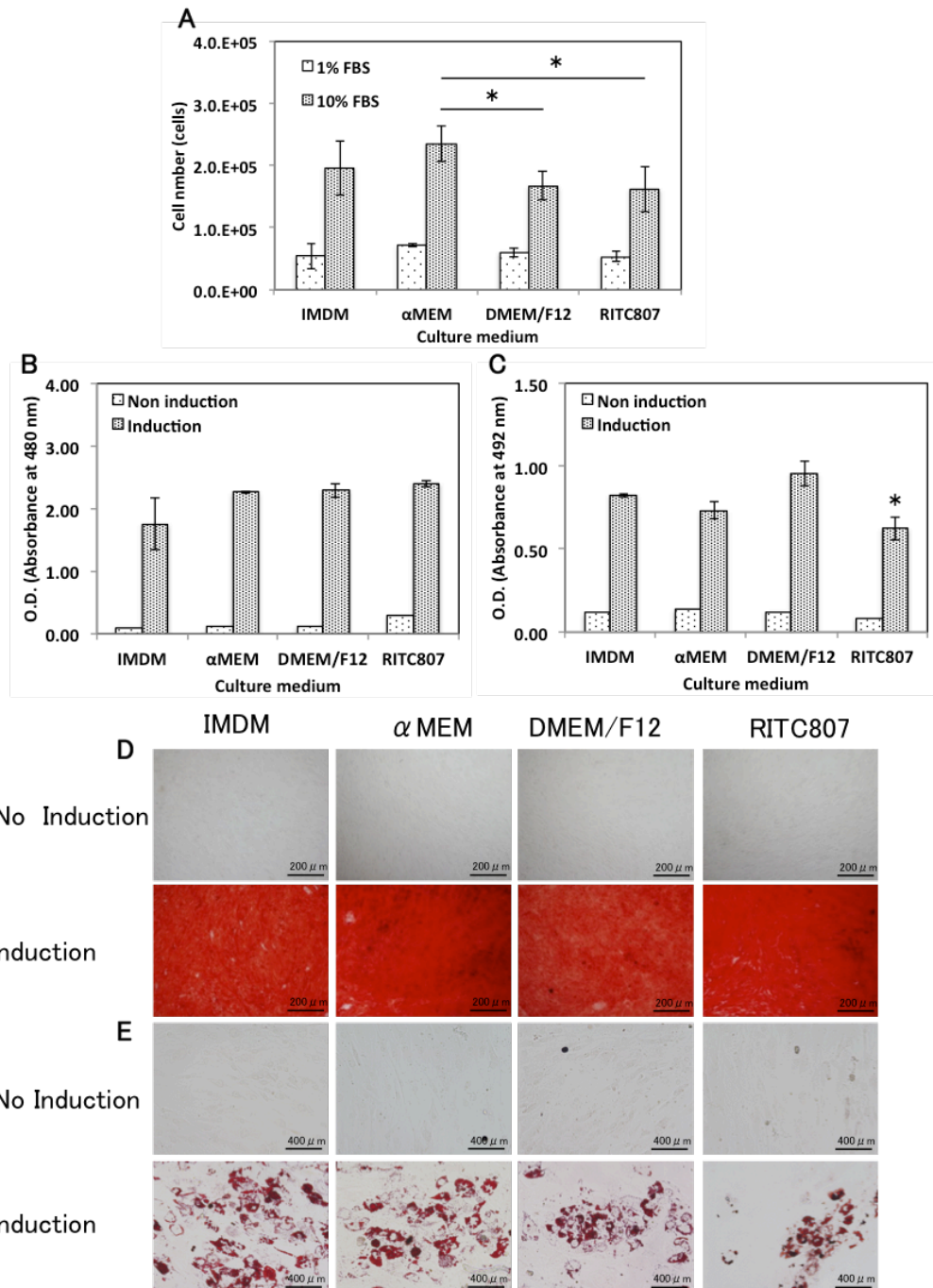


図2 各基礎培養液による増殖及び骨芽、脂肪細胞分化能への影響

AT-MSCsを10%FBS及び10ng/mLbFGFを含む各基礎培養液で5日間培養した。1継代培養後、コンフルエンスに達した段階で、骨芽細胞用及び脂肪細胞用分化培養液に移し替え分化誘導を行った。(A): 培養5日後の細胞数。分化誘導30日後の骨芽分化強度(B)とその画像(D)、脂肪細胞分化強度(C)とその画像(E)

### 4.1.3. 増殖因子の選定

効率的な細胞の増幅のためには細胞周期を動かし、細胞分裂を促す必要がある。G タンパクの下流にある MAP キナーゼ経路を介したシグナル伝達は細胞内情報伝達経路の一つで、細胞分裂に大きく作用することが知られている。このシグナル伝達はある種の細胞増殖因子が細胞表面の受容体結合することから始まる。本実験では MSCs の増殖を促進する因子の選定を行った。始めに、MSCs に対して増殖促進効果が報告されている増殖因子について、その受容体発現の有無を RT-PCR 法で確認した。結果、AT-MSCs は NGFR を除き、本実験で確認

した全ての受容体を発現していた (図 3)。次に受容体発現が認められた因子の増殖促進効果を WST-8 assay により評価し

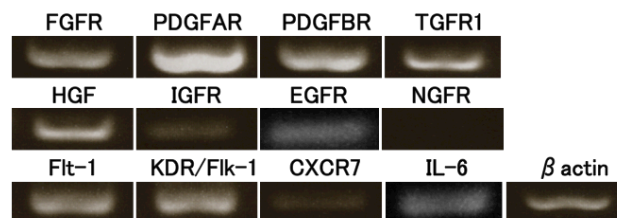


図3 増殖因子受容体発現  
各増殖因子に対する受容体の発現をRT-PCR法により解析した。

た。この結果、bFGF, PDGFAA, PDGFBB, TGF $\beta$ , EGF は AT-MSCs の増殖を促進し、特に TGF $\beta$  は低濃度域(1ng/mL~)から、PDGFAA は高濃度域(40ng/mL~)から高い増殖促進効果を示すことが明らかとなった (図 4A)。一方で TGF  $\beta$  添加条件では細胞の形態が肥大化し、MSCs の特徴である線維芽細胞様形態を維持していないことが確認された (図 4B)。

次に高い増殖を示した bFGF、PDGFAA、PDGFBB、TGF $\beta$ 、EGF の 5 種類についてそれぞれの因子を組み合わせた場合の増殖促進効果について試験した。各因子の濃度を 10ng/mL に固定し 2~4 因子全ての組み合わせ条件を設定した (表 4)。この結果、No.9, No.12, No.14, No.18, No.20, N0.23 の条件が特に高い増殖を示した (図 5A)。またこれらの条件で培養した細胞の形態は全て線維芽細胞様の形態を示した(図 5B)。一方、単独

で高い増殖促進効果を示した PDGFAA は他因子との組み合わせではさらなる増殖促進効果が見られなかった。

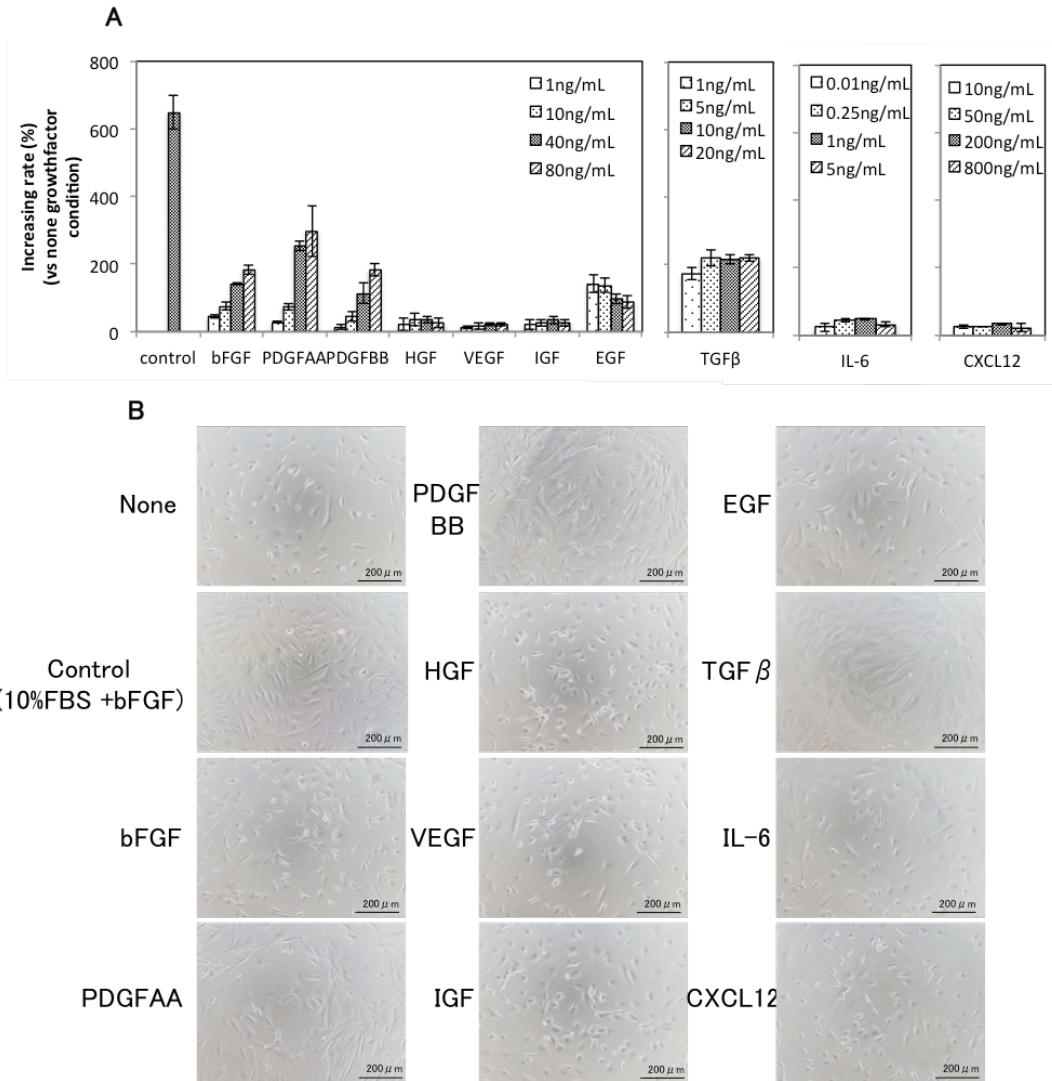


図4 各増殖因子によるAT-MSCsの増殖促進効果

1%FBSを含むαMEMIに各増殖因子を加えWST-8 assayにより増殖誘導効率を比較した。なお、増殖率の算出は1%FBSを含むαMEM(増殖因子を含まない)を基準とし、吸光度の増加率から行った。A:培養4日目の増加率、B:培養3日目の細胞形態(40ng/mL, IL-6:1ng/mL, CXCL12:200ng/mL)

さらに、長期にわたり安定して AT-MSCs の高い増殖を維持することが可能な最も適した組み合わせを選択するため、高い増殖促進効果が見られた No.9, No.12, No.14, No.18, No.20, N0.23 の条件について、培養スケールをあげ(96 well plate → 12 well plate)、

継代培養での増殖比較を行った。結果、No.20 の bFGF-TGFβ-PDGFBB の組み合わせが長期的に高い増殖を維持した(図 6A)。一方その他の条件では、細胞の肥大化や増殖の鈍化がおこり長期的に高い増殖を維持できなかった(図 6A,B)。この結果から無血清培養液に使用する増殖因子は bFGF-TGFβ-PDGFBB とすることとした。

表4 増殖因子の組み合わせ

No.	Factor
No.1	bFGF
No.2	TGFβ
No.3	EGF
No.4	PDGF AA
No.5	PDGF BB

No.	Factor	
No.6	bFGF	+ TGFβ
No.7		+ EGF
No.8		+ PDGF AA
No.9		+ PDGF BB
No.10	TGFβ	+ EGF
No.11		+ PDGF AA
No.12		+ PDGF BB
No.13	EGF	+ PDGF AA
No.14		+ PDGF BB
No.15	PDGF AA	+ PDGF BB

No.	Factor		
No.16	bFGF	TGFβ	+ EGF
No.17			+ PDGF AA
No.18			+ PDGF BB
No.19		EGF	+ PDGF AA
No.20			+ PDGF BB
No.21			PDGF AA
No.22	TGFβ	EGF	+ PDGF AA
No.23			+ PDGF BB
No.24		PDGF AA	+ PDGF BB
No.25	EGF	PDGF AA	+ PDGF BB

No.	Factor			
No.26	bFGF	TGFβ	EGF	+ PDGF AA
No.27				+ PDGF BB
No.28			PDGF AA	+ PDGF AA
No.29	TGFβ	EGF	PDGF AA	+ PDGF BB
No.30	bFGF	EGF	PDGF AA	+PDGF BB

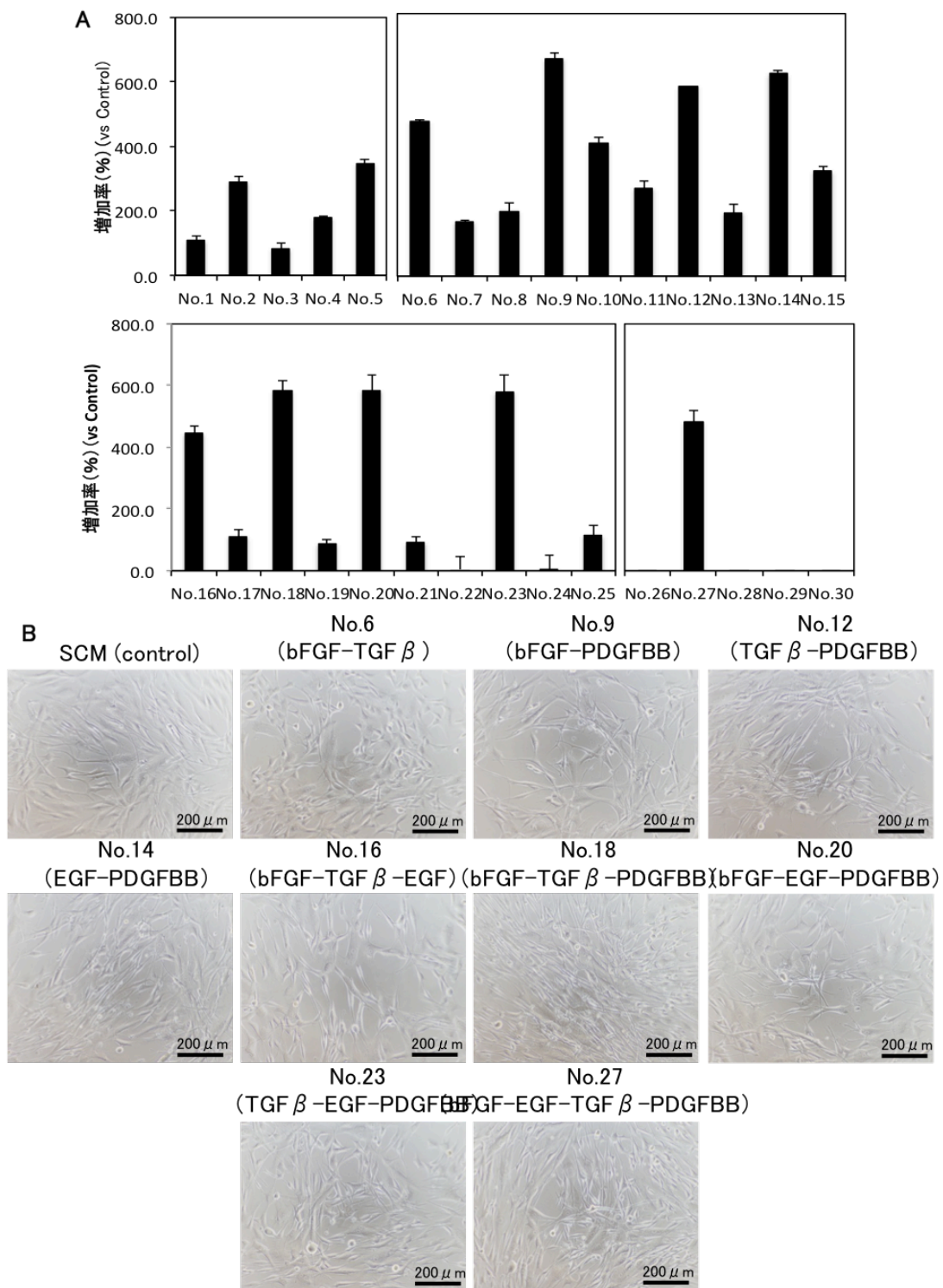
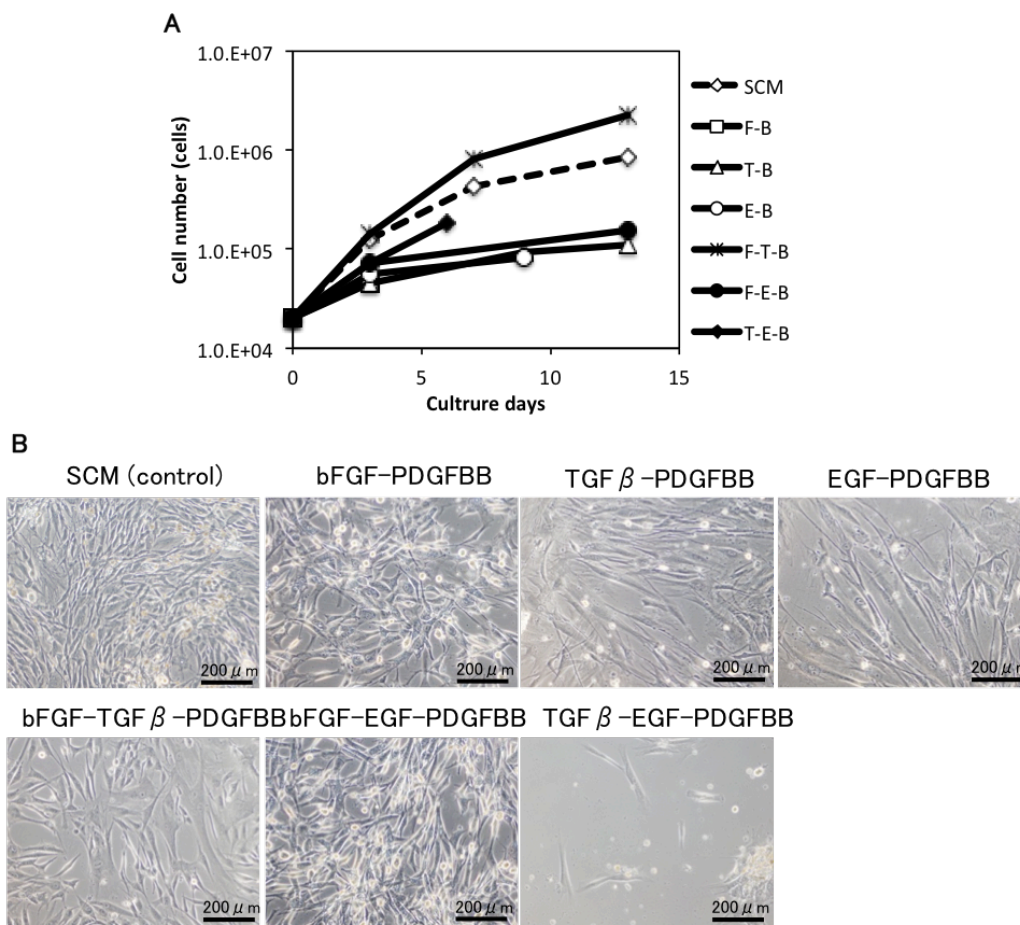


図5 AT-MSCsの増殖に対する増殖因子の相互作用

図4で増殖促進効果が見られた増殖因子5種類について、1%FBSを含む $\alpha$ MEMIに表3で示す組み合わせの増殖因子を加え、WST-8 assayでAT-MSCsの増殖促進効果を検証した。なお各増殖因子の濃度は一律10ng/mLとした。A:培養5日目の増加率、B:培養3日目の細胞形態。



**図6 継代培養での各因子の有効性評価**

図5で高い増殖促進効果が見られた6種類について、長期培養への影響を検討するため1%FBSを含む $\alpha$  MEMIに各組み合わせの増殖因子を添加し14日間培養を行った。80-90%コンフルエンスに達した段階で細胞を継代した。その際に血球計算盤を使い細胞数を計測した。A:細胞増殖曲線、B:培養11日目の細胞形態。

#### 4.1.4. 無血清培養液による増殖性能評価

これまでの検討で選定した $\alpha$  MEM、bFGF、PDGFBB、TGF  $\beta$ を組み合わせた無血清培養液(SFM(Prototype))の性能を評価するため血清含有培養液(SCM)との比較を行った。またこの実験において(株)細胞科学研究所が有する無血清培養液開発ノウハウをもとにいくつかの因子を加えた改変 $\alpha$  MEMを使った無血清培養液 SFM(modified)についても合わせてその性能を評価した。なお、本実験では無血清培養に使用する容器を Fibro nectin でコーティングした。結果、 $\alpha$  MEMに増殖因子を加えた SFMは1継代目までS



CM に比べ高い増殖を示したが、その後増殖が鈍化し長期培養が出来なかった。一方  $\alpha$  MEM の組成を改変した SFM(modified) は約 14 日間、3 継代以上 AT-MSCs を培養、増殖させることができ、その増殖速度は SCM に比べ高かった(図 7)。この結果から、改変  $\alpha$  MEM を基礎培養液

とした無血清培養液は、長期的に AT-MSCs を効率よく増幅できる培養液であることが示唆された。特にこの結果は、無血清環境下、長期間高い増殖を維持するためには、増殖因子

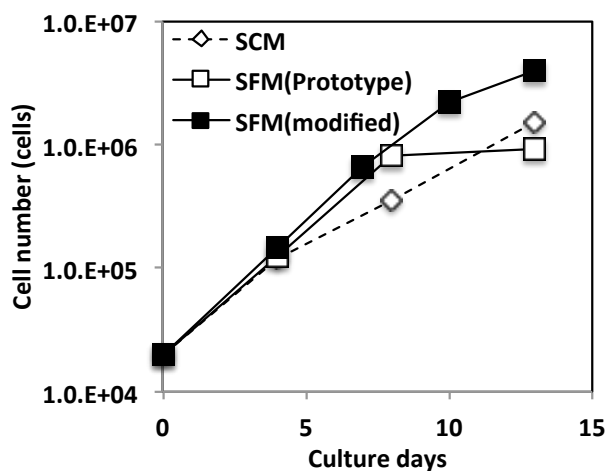


図7 血清培養と無血清培養の増殖比較

血清を含む培養液で5継代培養した細胞を、SCM( $\alpha$ MEM +10%FBS +10ng/mL bFGF)及びSFM( $\alpha$ MEM +bFGF +TGFB +PDGFBB)、SFM(modified)( $\alpha$ MEM改変基礎培養液 +bFGF +TGFB +PDGFBB)の三つの条件に分けさらに14日間培養を行った。データは代表値を示した。

のみならず、基礎的な栄養因子の追加が必要であることを示すものである。一方で、本実験で使用した AT-MSCs は、5 継代以上血清を含む培養液中で培養された細胞を使用した。SCM から SFM への切り替えは SCM からの様々な因子の持ち込みを否定できず、SFM の有効性を検証するためにはさらに初代培養細胞での評価が必要である。以降の実験より、SFM(modified)を使用し、無血清培養系の開発を進める事とした。

#### 4.1.5. コーティングマトリクスの選定

通常血清培養において FBS は様々なマトリクスを含み、それらが容器への細胞の接着、移動、増殖を助ける。本無血清培養液は血清に含まれる接着因子を含んでおらず、培養容器を別途コーティングする必要がある。また 4.1.1.でも述べたように、現在報告

されている AT-MSCs 用無血清培養系の問題点の一つに初代培養での細胞の接着不良があり、これを改善する手段としては最適な細胞外マトリクスの選定がある。開発した無血清培養液に適したコーティングマトリクスの選定を行うため、始めに 4.1.4.項の試験に使用したフィブロネクチン（ウシ由来）と無血清培養用コーティングマトリクス CELLStart（Invitrogen）とを比較した。この結果フィブロネクチンは CELLStart に比べ有意に高い増殖を示した(図 8A)。さらに、条件にヒト由来フィブロネクチン及びラミニンを加え複数回継代することで長期的な増殖評価を行った。ラミニンは、他の条件に比べ細胞の接着が弱く多くの浮遊細胞が認められた(図 8D)。

一方フィブロネクチンはヒト及びウシともに同様の接着及び増殖を示した。また異なるインテグリンサブタイプからの刺激が増殖を促進する可能性を考えフィブロネクチンとラミニンを 1:1 で混ぜたマトリクスも合わせて評価したが、接着は良好であったもののフィブロネクチン単独に比べ増殖が遅かった。以上の結果から、開発した無血清培養液に対するコーティングマトリクスとしてはフィブロネクチンが適していることが示唆された。さらに SFM/フィブロネクチンの組み合わせで初代培養において安定した容器への接着と増殖が行えることを検討する必要がある。

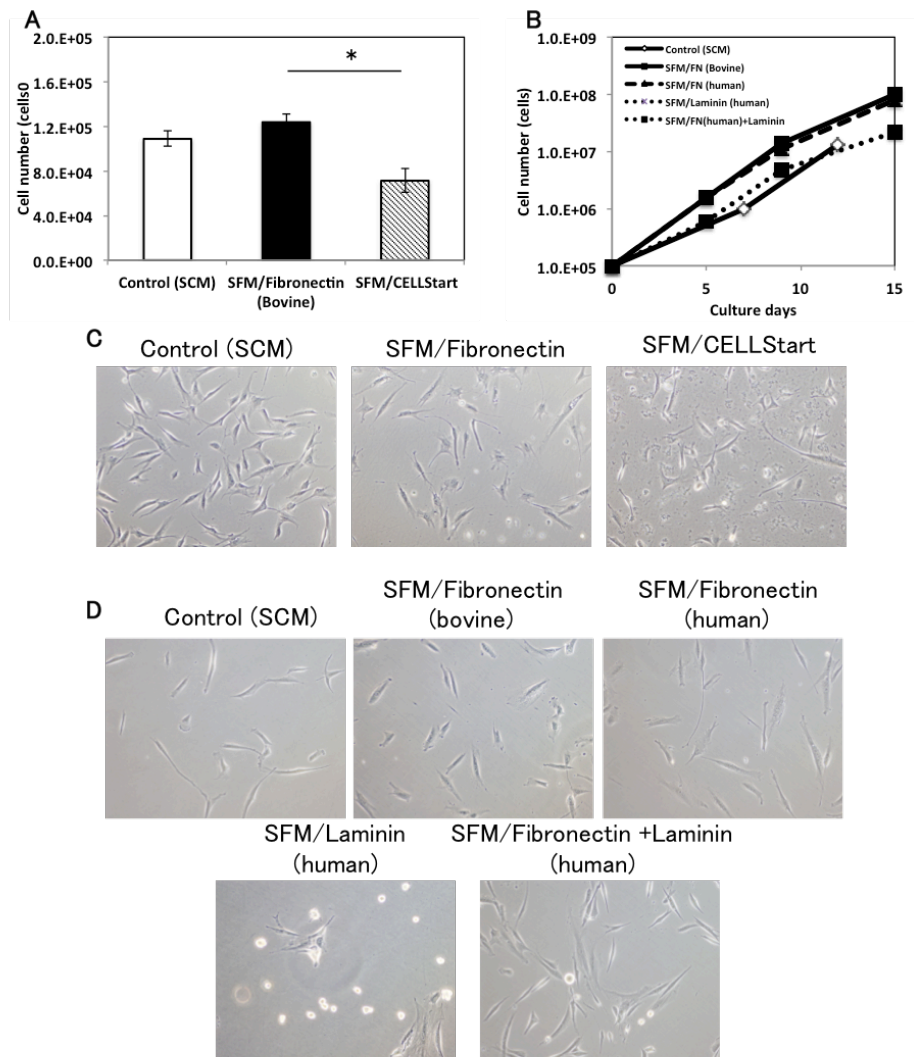


図8 コーティングマトリクスの選定

AT-MSCsを各マトリクスをコートした容器で無血清条件下培養し増殖を比較した。なお、コントロールとしてSCM培養条件(コーティングなし)を設定した。A:フィブロネクチンとCELLStartの比較。B: ウシ由来フィブロネクチン及びヒト由来フィブロネクチン、ヒトラミン、ヒトラミン及びヒト由来フィブロネクチンの1:1混合物の比較。C:A培養時の1日目の培養画像。D:B培養時の培養1日目の培養画像。Aは平均値(n=3)、Bは代表値を示した。

## 4.2. 無血清培養系の開発

### 4.2.1. 無血清分離工程の評価

一般的に、脂肪組織や胎盤組織等の固形組織からのMSCsの採取にはコラゲナーゼ法が使用されている。また脂肪組織や胎盤組織由来MSCsを使用した無血清培養液研究の多くでは、コラゲナーゼ処理時や初代培養時にFBSが使用されている。FBSには様々

な因子が含まれており、それらが *in vitro* から *in vivo* への細胞の馴化を助け、*in vitro* 培養を安定化させると考えられ、FBS を除くことは培養の不安定下等を起こす可能性が考えられた。また脂肪由来 MSCs において完全無血清培養系について研究した Patrikoski et al.(2013)の報告では、市販無血清培養液/コーティングマトリクスを使用した無血清初代培養において脂肪由来 MSCs は容器への接着が悪く培養が安定しないことを報告しており、安定した初代培養には FBS の寄与が大きいものである事が示唆される。しかし、無血清培養系を構築するためには FBS を使用せず安定的に MSCs を分離・増幅できる系を検討する必要がある。これまで、脂肪組織から MSCs 採取条件を検討した報告はなく、FBS の有無を含めたコラゲナーゼ処理条件の違いが細胞の回収効率や生存率にどのような影響を与えるのかは不明である。

本実験では、新たに開発した SFM を用い組織から MSCs の分離効率及び初代培養での増幅効率について FBS を使用した従来法と比較した。図 9 には本実験スキームを示した。患者から採取した脂肪組織を同じ重量になるよう 3 等分し、細断後、条件①: PBS +0.1%collagenase, 条件②: PBS +2%FBS +0.1% collagenase, 条件③: 改変型  $\alpha$  MEM +1%HSA +0.1%collagenase でそれぞれ 1 時間コラゲナーゼ処理を行った。本実験で設定した条件③は、1 時間のコラゲナーゼ処理時における細胞への悪影響を最小限にすることを期待したものである。37°C 環境下インキュベートされることから細胞内代謝が進み続けることを想定し溶媒には改変  $\alpha$  MEM を、老廃物や酸化ストレス等外的環境変化から細胞を保護するため HSA を加えた。遠心し回収したペレットは 2%FBS または 2% HSA を含む PBS で 2 回洗浄し、回収したペレットに含まれる CD31-CD45-CD73+CD90+ の細胞数及び生細胞率を測定した。フローサイトメーターによる分析の結果、CD31-CD45-の細胞集団 (ゲート Q) 中の CD73+CD90+ (ゲート V) を分離検出することがで

き、ゲート V の検出数から Flow-count beads を使用し細胞数を計測した (図 10A-C)。回収した細胞の生細胞率は全ての条件で 90%以上と分離条件の違いによる生細胞率減少等の影響は見られなかった。(図 10D)。また脂肪 1g からは約  $2 \times 10^5$  の細胞が回収でき、各分離条件間で差は認められなかった(図 10E)。細胞を容器へ播種後、細胞の接着及び形態を確認したが、全ての検体で安定した容器への接着が見られた(図 10F)。また細胞形態は培養開始後数日間、丸い形態を示すが、その後徐々に形態が変化し線維芽細胞様の形態を示すとともに細胞が増えていくことが確認された(図 11A)。さらに初代培養での細胞増殖率を比較した結果、条件①で回収した細胞の増殖率は他の条件で分離した細胞の増殖率

に比べ有意に低かった(図 10G-I)。また条件③で回収した AT-MSCs の増殖率は検体毎に大きく異なるものの条件②

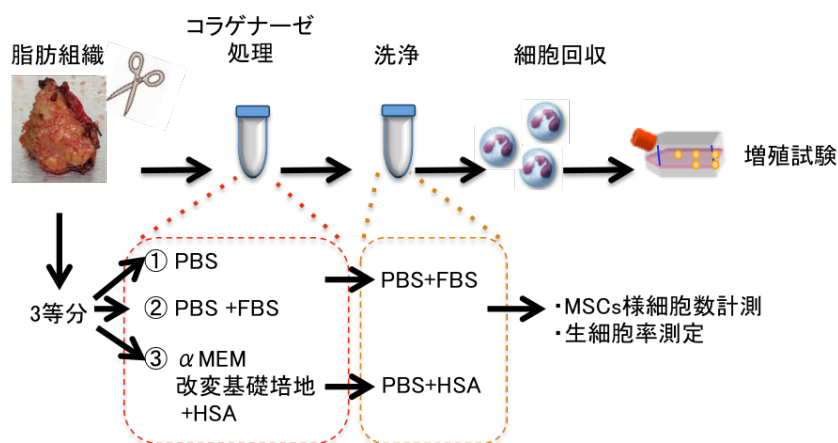


図9 脂肪組織からMSCs回収と各種実験までの流れ  
脂肪組織は同重量で3等分した後細断し、各溶液中でコラゲナーゼ処理された。その後2%FBSまたは2%HSAを含むPBSで洗浄された。回収した細胞は増殖試験またはフローサイトでの細胞数及び生存率計測に使用された。

で回収した細胞のそれと同等以上の増殖率を示した (図 10G-I)。この傾向は初代培養で使用する培養液に関わらず同様の傾向であり、特に SFM で培養することで SCM に比べ高い増殖率が得られた。以上の結果から、脂肪組織から MSCs の分離において本実験で行った無血清分離条件 (③) は従来法と同様の細胞回収効率を示し、初代培養においても同等以上の増殖が得られる可能性が示唆された。FBS を加えた条件②が条件①に比べ高い初代培養増幅効率を示したことから、コラゲナーゼ処理時における溶媒環境の

改善はその後の細胞増殖効率の向上につながる可能性が示唆される。一方開発した無血清培養液とフィブロネクチンとの組み合わせは、初代培養において安定した容器への接着・培養が可能であることが確認された。

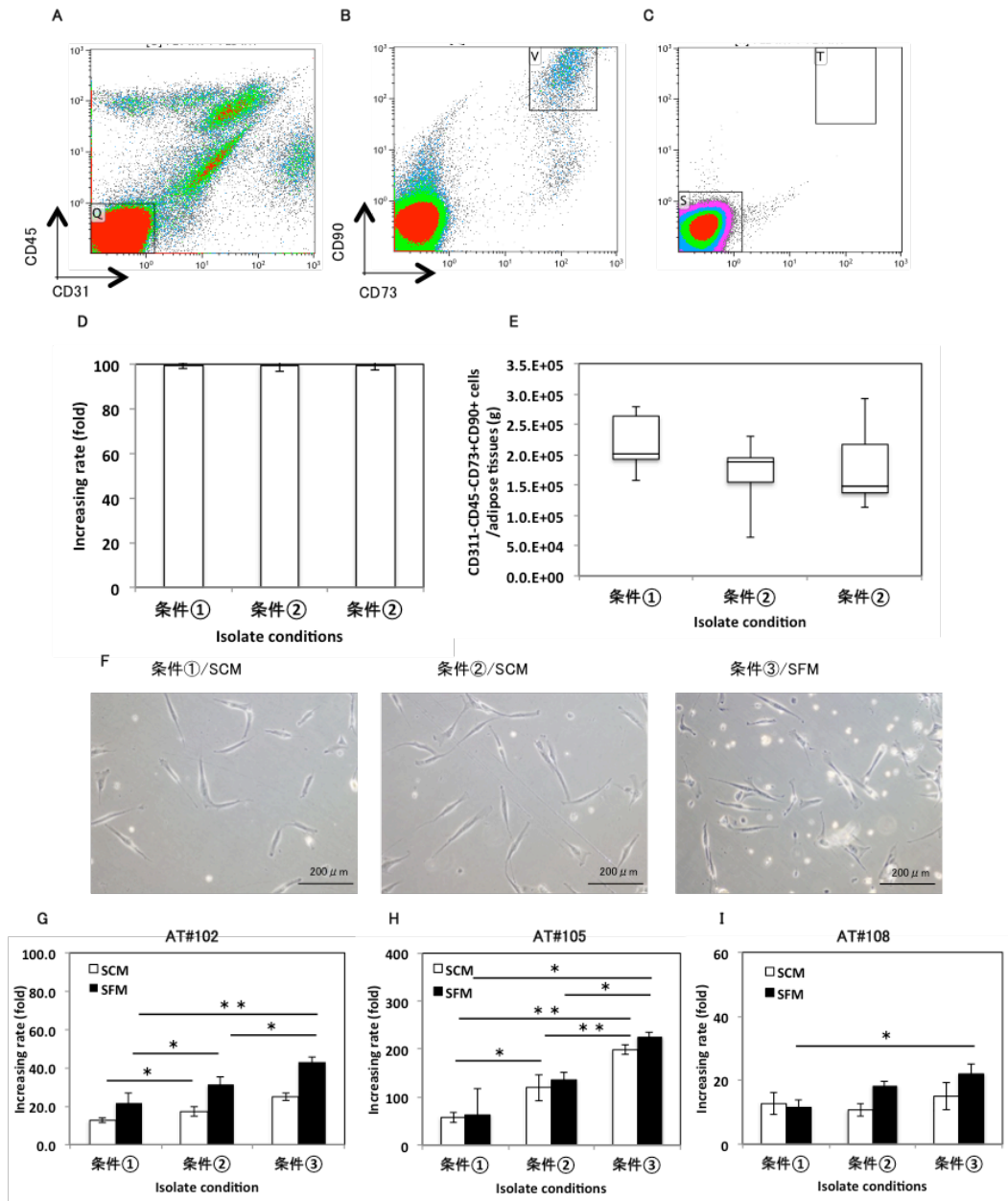


図10 組織分離液による分離効率及び初代培養の評価  
 各分離液(①:PBSのみ、②:PBS+2%FBS、③:αMEM改変基礎培養液+1%HSA)中で脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、回収したMSCs様細胞の回収効率及び増殖能を比較した。A.CD31-CD45-ポピュレーション(Gate Q)、B:[CD31-CD45-]CD73+CD90+ポピュレーション(Gate V)、C: Isotype control、D.MSCs様細胞の生細胞率、E.脂肪1gに含まれるMSCs様細胞数、F:初代培養4日目の細胞画像、G-I:初代培養時の細胞増殖率、G:AT#102、H:AT#105、I:T#108。A,B,C,Fは代表値を示した。D,Eは4名の患者脂肪組織から回収した細胞の平均値。G,H,Iは各患者検体由来細胞での平均値(n=3)。

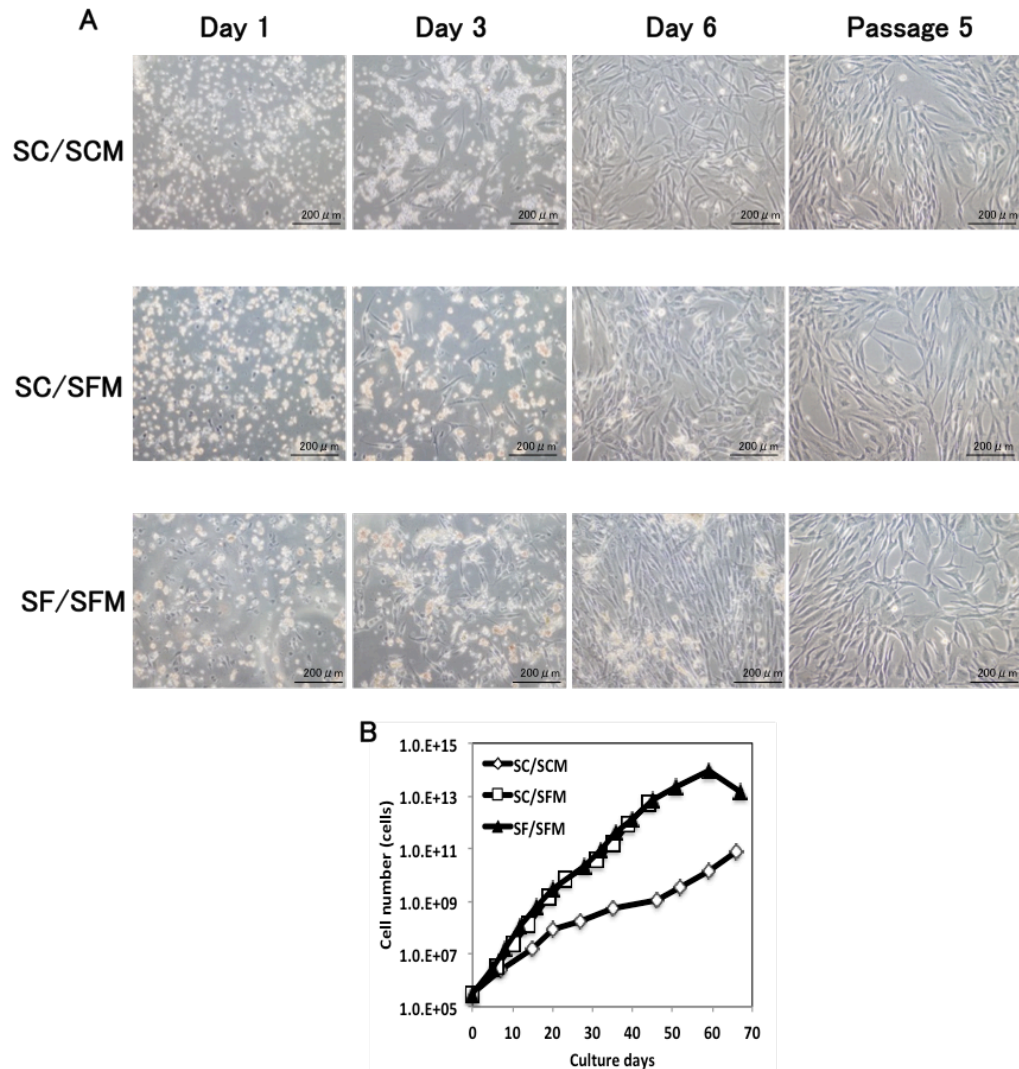


図11 分離方法の違いによる長期培養への影響

各分離溶液(②PBS +2%FBS、③ $\alpha$  MEM改変基礎培養液 +1%HSA)中で脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、細胞を回収した。②の条件で回収した細胞はSCMとSFMの二つの条件に分け培養した。また③で回収した細胞はSFMで培養した。細胞は60日以上培養し増殖能を比較した。A: 培養1,3,6日目及び5継目の細胞形態、B: 細胞の増殖曲線。A及びBは代表値を示した。

#### 4.2.2. 無血清増幅工程の評価

無血清条件下で脂肪組織から分離・回収した細胞が、長期的に *in vivo* で増幅が可能か、また開発した SFM が AT-MSCs を初代培養から長期間培養・増幅可能かを確認す

るため、3つの条件（条件②分離-SCM 培養 (SC/SCM), 条件②分離-SFM 培養 (SC/SFM), 条件③分離-SFM 培養(SF/SFM)）を設定し細胞増殖能を比較した。結果、AT-MSCs は全ての条件で 50 日以上安定的に増殖し続けることが確認された(図 11B)。無血清培養系である SF/SFM の増殖は従来の培養系である SC/SCM に比べ高く、SC/SFM と同程度であった(図 11B)。これらの結果から本無血清培養液を使用した無血清分離法は、分離工程下、細胞の増殖能に影響を与えないことが示唆された。さらに SC/SCM と SC/SFM との増殖傾向の違いから SFM は血清に bFGF を加えた従来の培養液に比べ AT-MSCs の増殖を有意に高く、長期に維持できることが示唆された。

次に本無血清培養系が様々なドナー由来の AT-MSCs を初代培養から安定して培養できる培養系であることを確認するため、26 名の患者から採取した AT-MSCs を SC/SCM と SF/SFM の二つの条件に分け、5 継代目まで培養した際の倍加時間を比較した。この 26 名の患者の平均年齢は  $67.9 \pm 7.7$  歳と比較的高齢の方が多く、大半は男性患者(男性：女性=22:4)であった(図 12A)。培養の結果、SF/SFM は 26 検体全ての検体を初代培養から接着及び増幅することができた。またその平均倍加時間は  $34.9 \pm 7.1$  時間と従来の培養系である SC/SCM ( $50.2 \pm 15.2$  時間)に比べ有意に短かった(図 12B)。さらに興味深いことに無血清培養系は検体毎の増殖能のバラツキが従来法に比べ半分以下であった (SD=SCM; 15.2 時間, SFM; 7.1 時間)。

本実験に使用した細胞（脂肪）の提供者は主病変として循環器疾患をもち、一部の患者は合併症として糖尿病(ヘモグロビン A1c  $\geq 6.1$ )及び腎機能障害 (Cre  $\geq 1.5$  及び透析実施患者)、またはその両方を持つ。これら合併症が増殖に与える影響を確認するため合併症の有無及び種類毎に増殖能を比較した結果、これら合併症による増殖能への影響は SC/SCM 及び SF/SFM とともに認められなかった。さらに  $1 \times 10^9$  個の細胞を回収する為に



要する培養期間を比較した結果、SFMはSCMに比べ約10日培養期間を短縮できる可能性が示唆された(図12C)。

以上の結果から、本無血清培養系は合併症等異なる患者背景に影響を受ける事なく短期間に安定してAT-MSCsを培養・増幅することが可能な培養系であることが示唆された。

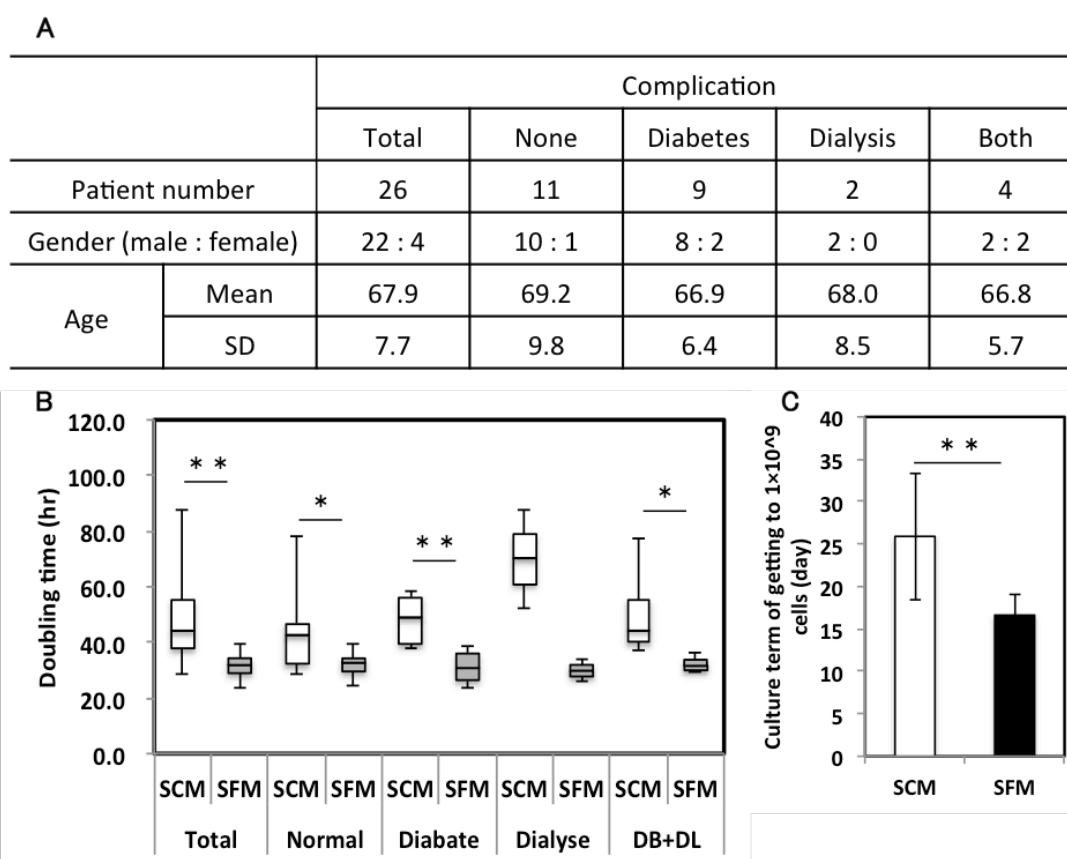


図12 疾患背景の違いによる無血清培養への影響

AT-MSCsは、基礎疾患として心疾患を持つ患者の脂肪組織から採取され、SC/SCMまたはSF/SFMで分離培養した。A:合併症の有無による分類毎の患者数、男女比、年齢の平均及び標準偏差。B:患者の合併症の有無及びその種類により分類したSC/SCMまたはSF/SFMで培養した細胞の倍加時間。C: 26検体の継代毎の細胞数から近似直線を作成し、そこから $1 \times 10^9$ 個の細胞数が回収できるまでの培養期間を算出した。\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$

### 4.2.3. 無血清培養細胞の性質評価

次に無血清分離-培養系で単離・増幅した細胞が MSCs であることを同定するため、表面抗原解析及び中胚葉系細胞（脂肪、骨、軟骨）への分化能を評価した。5 継代培養後の SF/SFM 細胞は SC/SCM 細胞と同様に MSCs マーカーである CD73, CD90, CD105 や CD13, CD166 陽性、血球及内皮細胞マーカーである CD14, CD31, CD34, CD45, HLA-DR 陰性を示した(図 13)。さらに SF/SFM 細胞は、骨芽細胞及び脂肪細胞分化培養液で培養後、それぞれ石灰化及び脂肪滴形成の指標であるアリザリンレッド及びオイルレッド-O により赤く染色された。その染色強度から SF/SFM 細胞は SC/SCM 細胞と同様の骨芽細胞及び脂肪細胞への分化能を有することがわかった(図 14A-E)。さらに分化誘導前後での骨芽細胞及び脂肪細胞関連遺伝子の発現を確認した。結果、骨芽細胞関連遺伝子である Runx2, Osteopontin, Osteocalcin, ALP, type I collagen が骨芽細胞分化誘導後強い陽性を示した(図 14F)。一方脂肪細胞のマスターレギュレーターである PPAR $\gamma$ , LPL もまた脂肪分化誘導後、両条件で陽性を示したことから SF/SFM 細胞が表現系のみならず遺伝子レベルでも分化することが確認できた。(図 14G)。また、軟骨細胞分化のためスフェロイド形成後、軟骨分化培養液で培養した結果、両条件ともにスフェロイドはトルイジンブルー陽性を示したことから、これらの細胞が軟骨への分化能を有していることが確認された(図 14C)。

以上の結果から、SF/SFM 細胞は従来の SC/SCM 細胞と同様に MSCs 様の表面抗原プロファイルを示し、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有する MSCs であることがわかった。このことから SF/SFM が MSCs を選択的に増幅できる培養系であることが確認された。

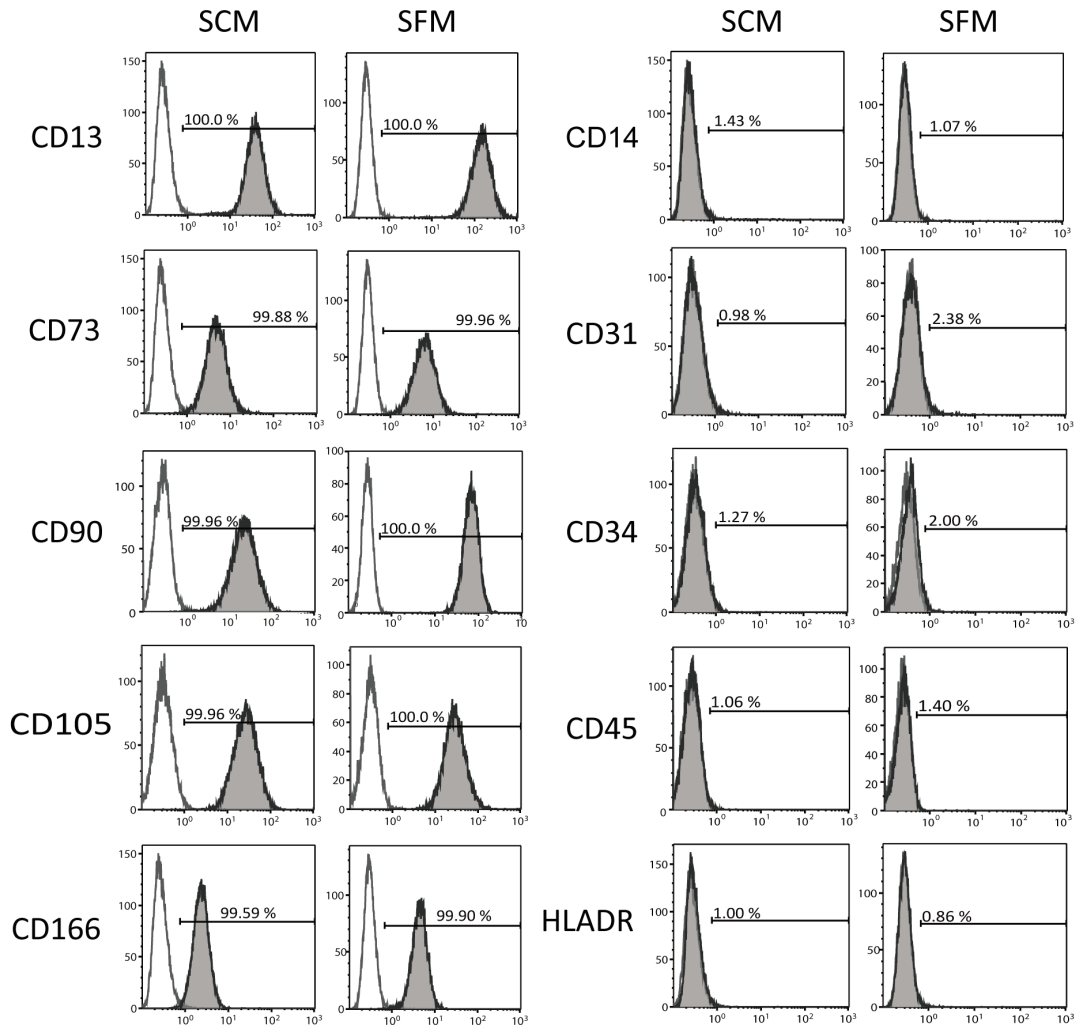


図13 培養細胞の表面抗原解析

SC/SCMまたはSF/SFMで5継代培養した細胞の表面抗原をフローサイトメーターで測定した。

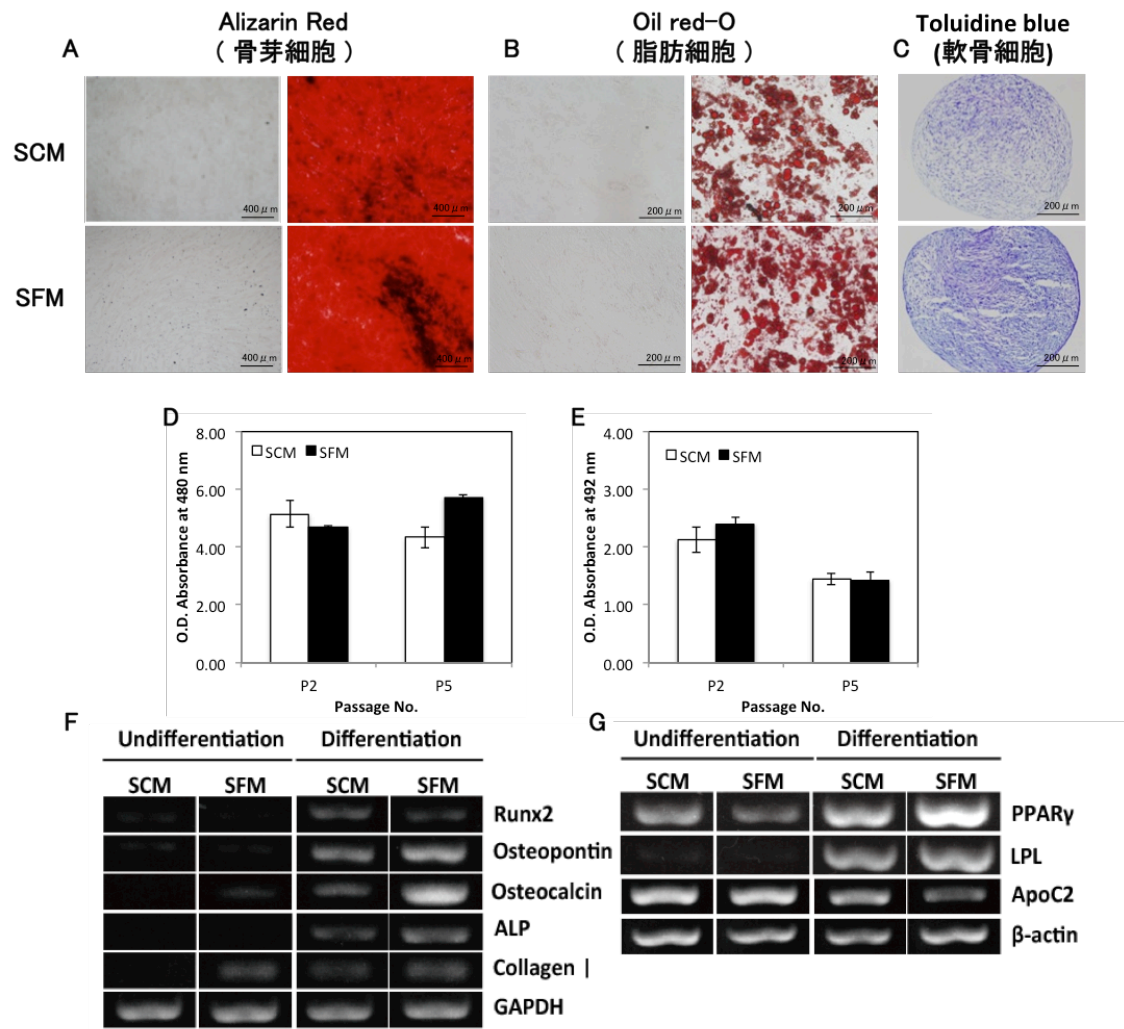


図14 培養細胞の多分化能解析

SC/SCMまたはSF/SFMで5継代培養した細胞の骨芽細胞及び脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を染色法及びRT-PCR法による遺伝子発現解析により比較した。A:骨分化誘導30日後のアリザリンレッド染色像、B:脂肪分化誘導30日後のオイルレッドO染色像、軟骨分化誘導30日後のトルイジンブルー染色像、D:骨芽細胞分化強度、E:脂肪細胞分化強度、F:骨分化誘導12日目の骨関連遺伝子発現、G:脂肪分化培養12日目の脂肪関連遺伝子発現。D,Fは平均値を示した。

#### 4.2.4. 市販無血清培養液との比較

MSCs用の無血清培養液は国内外いくつかの企業が開発、販売しており、市販無血清培養液に関する論文報告も多数ある(Chase et al., 2010)。今回開発したSFMと市販の無血清培養液との性能比較を行った。本実験ではMSCs用無血清培養液の先駆けでもあ

り多くの論文報告がある StemPro CTS (Gibco, Lindroos et al., 2009)及び Gottipamula et al.(2013)の報告でも高い性能を示す Mosaic(BD)の2つの無血清培養液を選定した。脂肪組織から MSCs を分離後、SCM で初代培養を行った細胞を使い無血清培養液及びコントロールである血清含有培養液で継代培養を行った。結果、倍加時間は SFM が最も短く、次いで Mosaic であり、SCM と StemPro は同程度だった (図 15A)。またこれら市販の無血清培養液は血清含有培養液と同様に検体毎に増殖性能にバラツキが大きく、特に StemPro CTS は4検体中2検体で継代後、細胞形態が変化し増殖が極端に鈍化したため長期間培養を維持することができなかった(図 15B, C, D)。一方で SFM は検体間での増殖性能差が少なく、全ての検体で安定して培養することができた(図 15A-C)。さらにこれら培養細胞の骨芽細胞、脂肪細胞への分化能を評価した結果、StemPro で培養した細胞は他の細胞に比べ脂肪細胞への分化能が有意に低かった(図 16B, D)。一方、骨芽細胞への分化能は全ての条件間で同程度であった(図 16A, C)。

以上の結果から、新たに開発した SFM は、本実験で使用した市販無血清培養液と同等以上の増殖促進性能及び培養安定性を有する可能性が示唆された。

#### 4.2.5. 他組織由来幹細胞への応用

間葉系幹細胞様細胞は、骨髄を始め脂肪、臍帯血、胎盤、歯等様々な組織に存在し、それらの機能は異なることが報告されている。新たに開発した SFM が他組織由来幹細胞の培養に応用可能かを検討するため、骨髄由来間葉系幹細胞及び歯髄由来幹細胞、歯根膜由来幹細胞で SFM による無血清培養を行った。この結果、全ての細胞で SFM は 20 日以上培養を継続し細胞を増幅することができた。また SFM の増殖傾向は全ての細胞種で SCM と同様だった(図 17A-C)。これらの結果から、SFM は AT-MSCs のみなら

ず骨髄由来、歯根膜由来、歯髓由来幹細胞の培養にも応用可能であることが示唆された。

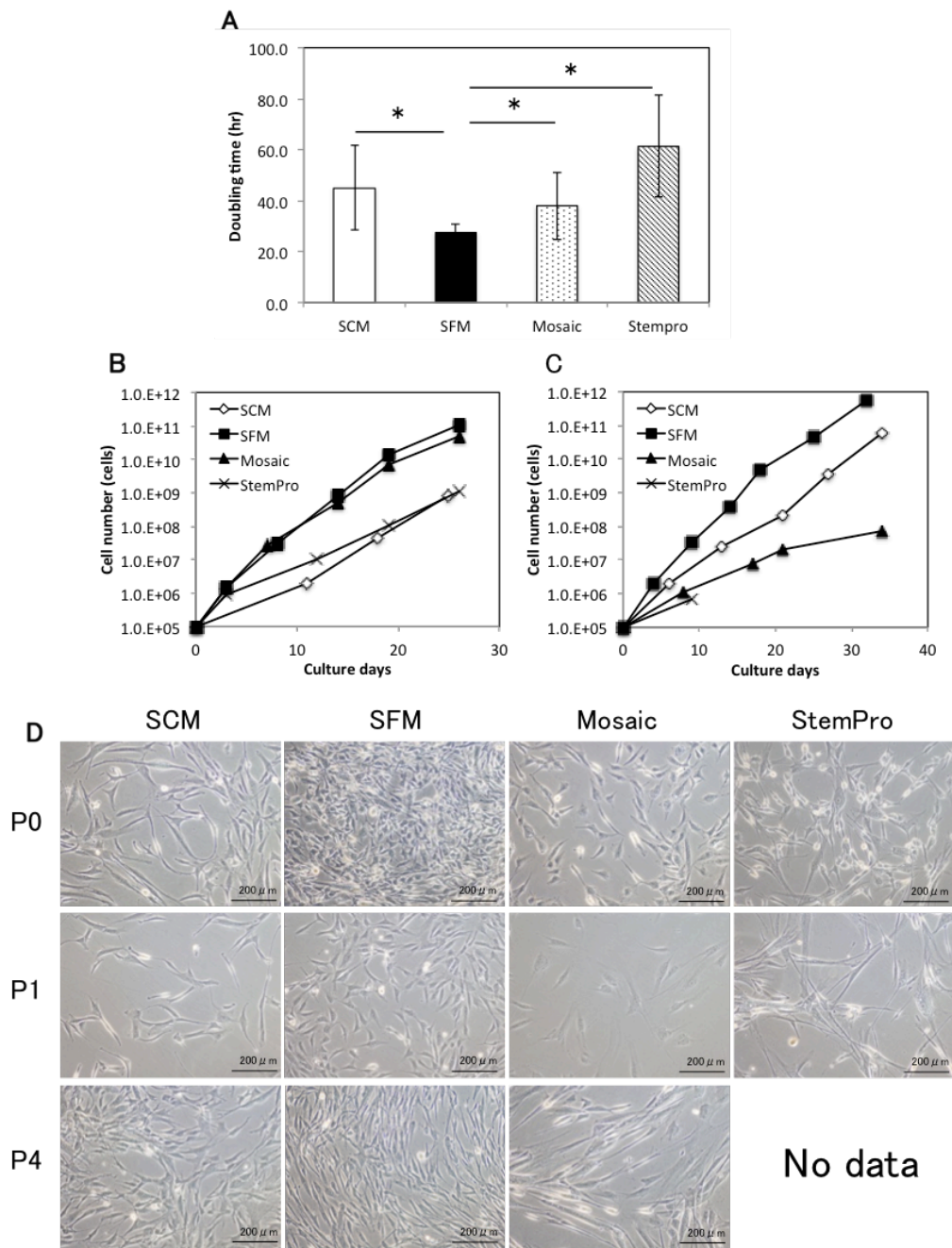


図15 市販無血清培養液との増殖性能の比較

新たに開発した無血清培養液と市販のMSCs用無血清培養液との増殖性能を比較した。A:平均細胞倍加時間(n=4)、B: AT#91の増殖曲線、C:AT#93の増殖曲線、D:AT#93の0、1、4継代培養時の細胞形態画像。AT#93ではStemPro CTSは4継代目まで培養できなかった。

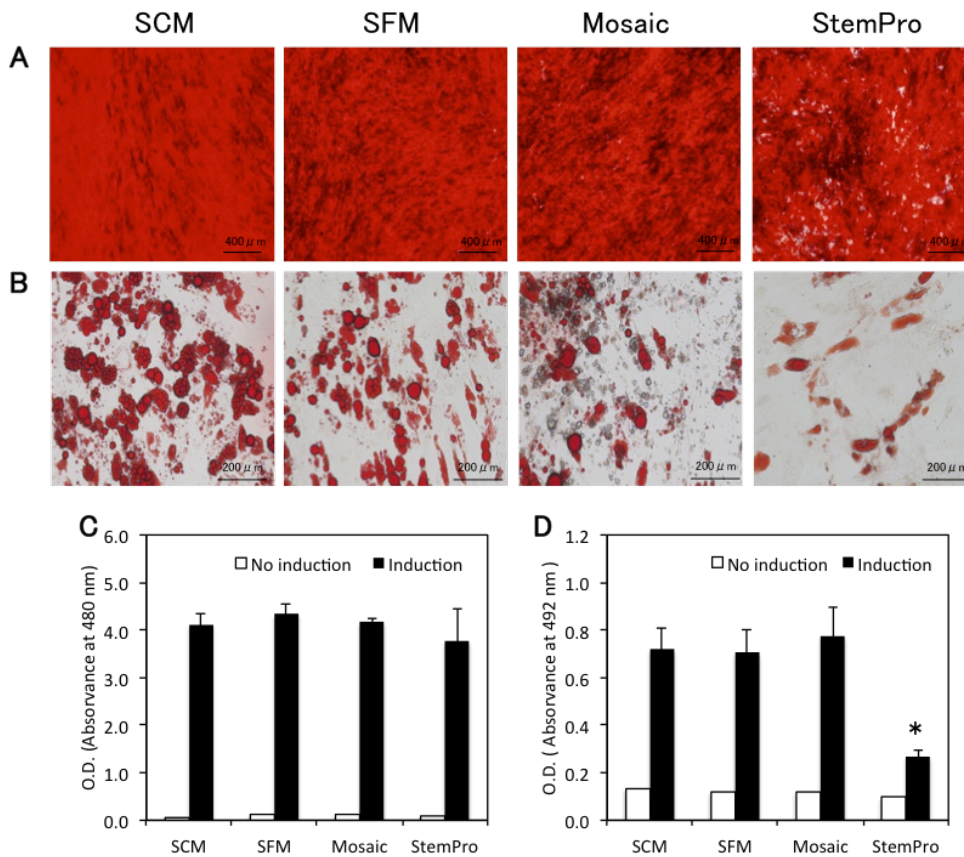


図16 各無血清培養液で培養した細胞の脂肪及び骨芽細胞分化能の比較

AT-MSCsは開発培地を含む3種類の無血清培養液及び血清培養液(コントロール)で4継代培養し、脂肪又は骨分化誘導因子を含む各分化培養液で30日間培養した。A:アリザリンレッド染色画像、B:オイルレッドO染色画像、C:骨芽細胞分化強度、D:脂肪細胞分化強度。C及びDは平均値(n=3)を示した。\* P<0.05

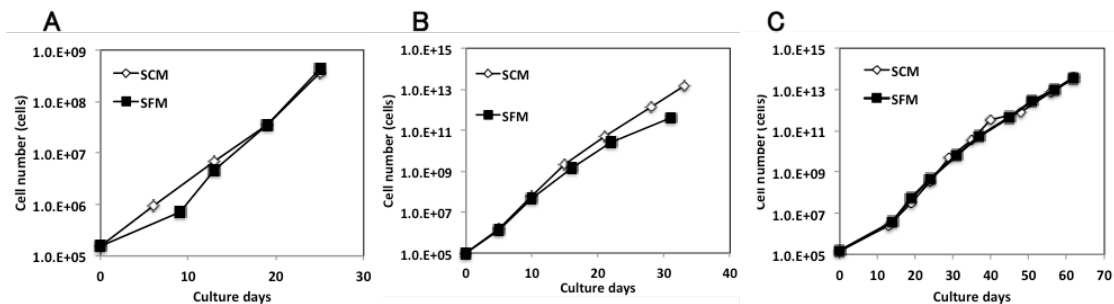


図17 SFMの他組織由来幹細胞への応用

骨髄由来幹細胞(A)、歯髄由来幹細胞(B)、歯根膜由来幹細胞(C)をSFMで培養し、長期培養が可能か検証した。ControlとしてSCM( $\alpha$  MEM +10%FBS +10ng/mL bFGF)を設定した。

### 4.3. *in vitro* での無血清培養細胞の性質及び機能評価

#### 4.3.1. 無血清培養細胞の細胞老化と未分化能

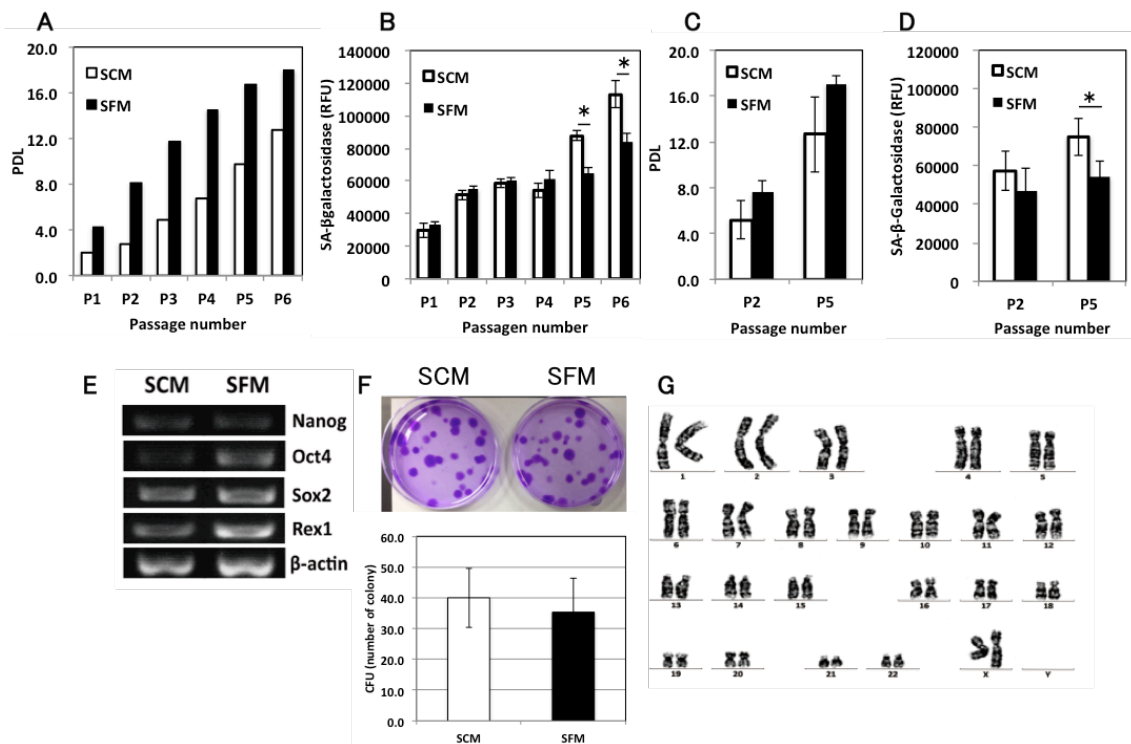
これまでの評価で SFM を用いた無血清培養系（分離-増幅系）は脂肪組織から多分化能を有する AT-MSCs を特異的に増幅することができ、その増幅効率は血清を用いた従来の培養液に比べ有意に高いことを示した。一方で、細胞分裂回数の亢進は細胞の老化を促進し、未分化マーカーの発現低下や分化能の低下を引き起こすことも報告されている (Bonab et al., 2006, Kim et al., 2009, Eom et al., 2014)。さらに過剰な増殖刺激と分裂回数の亢進は、染色体異常を引き起こし、結果として培養細胞の癌化を惹起する可能性がある。先に述べたように SF/SFM は高い増殖誘導効果を有し短期間に多量の細胞が得られる一方、増幅した細胞の機能低下や染色体異常が起きた場合、本無血清培養系を細胞治療に応用することは難しい。このことから SF/SFM 細胞の老化の程度を SA- $\beta$ -Galactosidase(Sa $\beta$ Gal)活性を指標に SC/SCM 細胞と比較した。また幹細胞としての未分化性を評価するため未分化マーカーの発現及び CFU-F assay によるコロニー形成能を評価した。さらに G バンド法により染色体異常の有無を確認した。

図 18A には AT-MSCs#132 の各継代時の累積細胞分裂回数を示した。SF/SFM は SC/SCM に比べ全ての継代で高い分裂回数を示した。一方 SF/SFM の SA  $\beta$  Gal 活性は、同じ継代時分裂回数が多いにも関わらず、その活性は4継代目まで SC/SCM と同程度であり、5 継代目以降有意に低い値を示した(図 18B)。さらに 5 人の患者由来 AT-MSCs の 2 及び 5 継代目の累積分裂回数及び Sa $\beta$ Gal 活性の平均値を比較した結果、AT-MSCs#132 の結果と同様に 5 継代目の SA- $\beta$ -Gal 活性は SF/SFM 細胞で SC/SCM 細胞に比べ有意に低かった (図 18C, D)。次に両条件下 5 継代目まで培養した細胞の未分化マーカー (Oct4, Nanog, Sox2, Rex1) 遺伝子の発現を図 18E に示した。SF/SFM 細胞は SC/SCM 細胞と



同様に Nanog, Oct4, Sox2, Rex1 の全ての未分化マーカーを発現した。さらに CFU-F assay の結果 SF/SFM 細胞は SC/SCM 細胞と同様のコロニー形成能を示した(図 18F)。最後に SF/SFM 細胞の染色体異常の有無を G-band 法により解析した結果、10 継代培養後の細胞におい染色体異常は認められなかった(図 18D)。

以上の結果から、SF/SFM 細胞は分裂回数が SC/SCM 細胞に比べ亢進しているにも関わらず細胞の老化が低く抑えられる可能性が示唆された。さらに、SF/SFM 細胞は、未分化マーカーの発現や自己複製能等の幹細胞としての性質が 5 継代培養後も維持されていること、10 継代(30 日以上)培養後も染色体異常はみられないことが確認された。

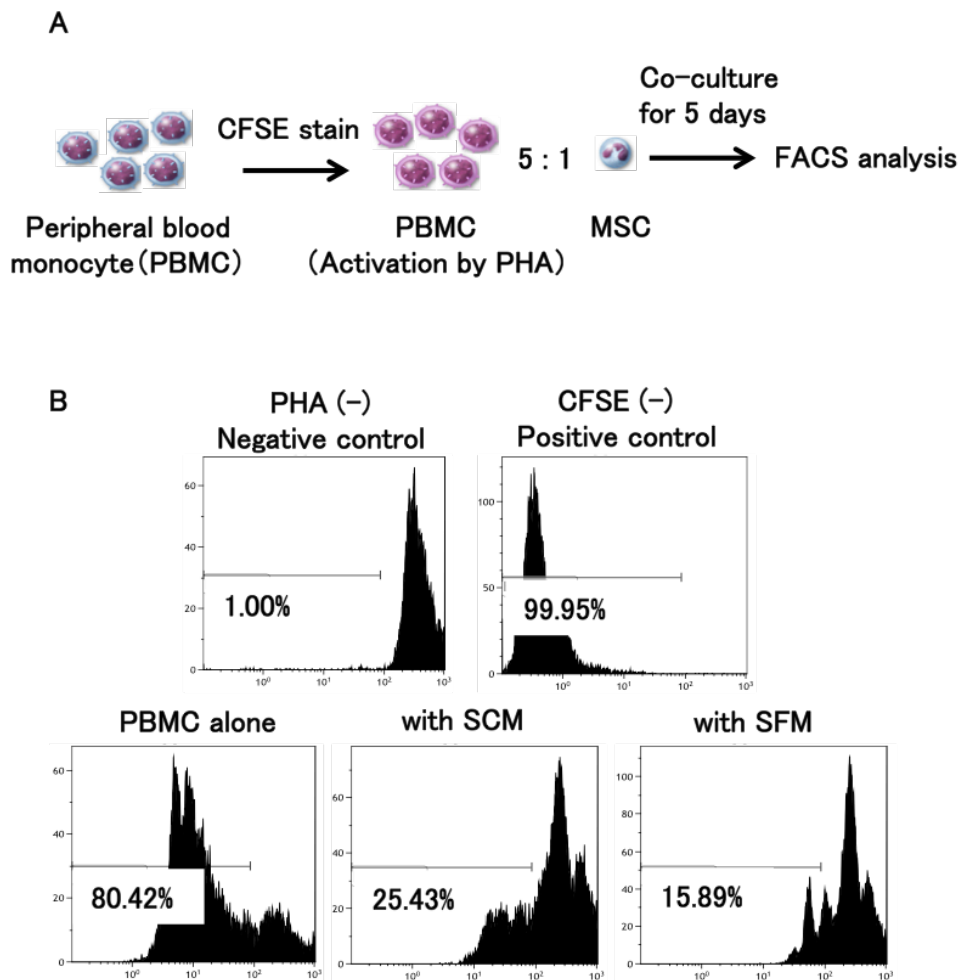


**図18 SF/SFM細胞の老化と幹細胞性質**

細胞分裂回数の亢進に伴うSF/SFM細胞の老化と幹細胞としての性質変化をSC/SCM細胞と比較、評価した。さらにSF/SFMに伴う染色体異常発生の有無を評価した。A:継代毎の累積分裂回数、B:継代毎のSA-β-galactosidaseの変化。2及び5継代時の分裂回数(C)及びSA-β-galactosidase活性(D)の平均値(n=4)、E:RT-PCR法による5継代培養した細胞の未分化マーカー遺伝子発現評価。F:CFU-F assayによる5継代培養した細胞のコロニー形成能評価。G:Gバンド分色法によるSF/SFMで10継代培養した細胞の核型解析。\* P<0.05

### 4.3.2. 免疫抑制活性の評価

MSCs の特徴的な機能の一つに強力な免疫抑制作用がある。無血清培養細胞の免疫抑制活性を評価するため、蛍光色素 CFSE で染色したヒト末梢血リンパ球(hPBMC)を SC/SFM または SF/SFM 細胞とリンパ球活性化因子である PHA を含む培養液中で共培養し、



**図19 SF/ SFM細胞の免疫抑制活性の評価**

SF/SFM細胞の免疫抑制能をMLR法により評価した。CFSEで染色したhPBMCをMSCsと5:1で5日間共培養した。その際、リンパ球を活性化するためPHAを加えた。リンパ球 (CD3+CD45+細胞) の増殖変化はCFSEの蛍光強度の減衰により評価した。A:実験方法。B-F:共培養5日後のCFSEの蛍光強度を示すヒストグラム。B:PHAにより刺激を行わない細胞(ネガティブコントロール)、C:CFSE非染色細胞のヒストグラム(ポジティブコントロール)。D:リンパ球単独培養(非共培養)。SC/SFM細胞と(D)またはSF/SFM細胞と(G)共培養。データは代表例を示した。

hPBMC の増殖をフローサイトメーターで評価した(図 19A)。この CFSE 色素は増殖に伴う細胞分裂でその蛍光強度は約半分に減少するため、その蛍光強度を指標に細胞の増殖の程度を簡便に評価することができる。

結果、hPBMC の増殖に伴い CFSE の蛍光強度は 5 日間で 80%以上減少した。一方で、MSCs との共培養により蛍光強度の減衰率は SF/SFM で約 15%、SC/SCM で約 25%と、両培養細胞ともに同程度のリンパ球増殖抑制能を示していることが確認できた(図.19B)。特に SF/SFM は SC/SCM と同等以上の免疫抑制作用を示した。

以上の結果から、SF/SFM 細胞は従来の血清培養細胞と同様に免疫抑制機能が保持されていることが確認された

#### 4.3.3. サイトカイン産生能の評価

MSCs から産生される様々なサイトカインは、in vivo での組織修復や免疫抑制等の機能発現において重要である (Amble et al., 2014、Chen et al., 2004、Galindo et al., 2011)。特に AT-MSCs は他組織由来 MSCs に比べ高いサイトカイン産生能を持つことから、SF/SFM 細胞のサイトカインプロファイルを把握し、SC/SCM 細胞との違いを明確にすることは、SF/SFM 細胞の in vivo での組織修復効果を予測するための重要な情報となる。本実験では、組織修復や免疫系に作用するサイトカインの遺伝子発現を qPCR により解析した。

結果、SF/SFM 細胞の bFGF や PDGF、VEGF、EGF 等の増殖因子、炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ )、抑制性サイトカイン(IL-10、IL-13)の遺伝子発現は SC/SCM 細胞と同程度であった。一方で骨分化に重要な BMP2 やケモカイン (CCL2 や CCL5) の発現が SC/SCM 細胞に比べ有意に高かった(図 20)。CXCL12 は発現が高い傾向にある

ものの、検体毎の発現にバラツキがあり有意差は確認できなかった(図 20)。さらに遺伝

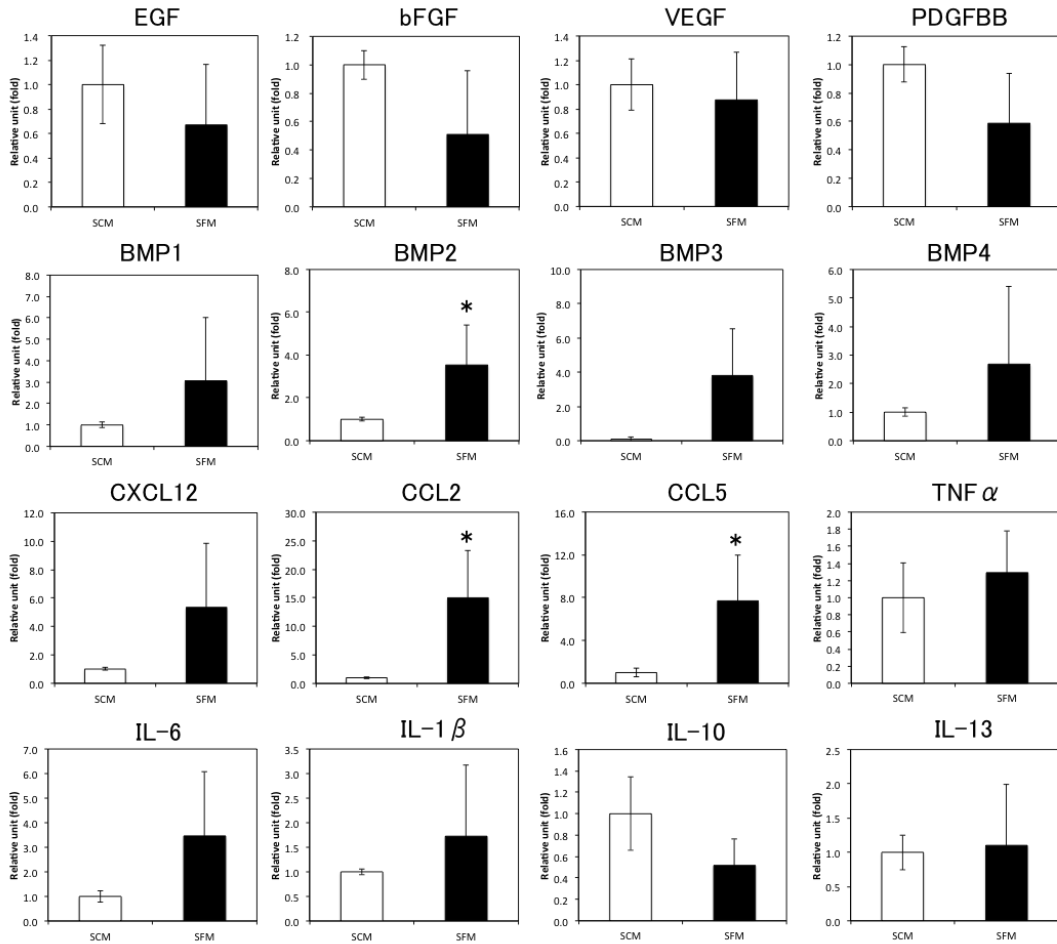


図20 培養細胞のサイトカイン関連因子の遺伝子発現

SC/SCM及びSF/SFM細胞の各種サイトカイン遺伝子の発現をqPCRで測定し、 $\Delta\Delta$ CT法により比較した。RNAは3-5継代培養した細胞から抽出した。TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-13は3名、BMP4、IL-10は4名、その他は5名の異なる患者から採取し3-5継代培養したMSCsの平均±標準偏差で示した。\*P<0.05

子発現強度に有意差が見られた因子についてタンパクレベルでの産生量を比較するためELISA assayを行った。結果、CCL2はSF/SFM細胞でSC/SCM細胞に比べ約5倍以上高い産生量を示した(図 21A)。しかしBMP2及びCCL5は培養上清中から検出することはできなかった。このためTNF $\alpha$ で細胞を刺激した後、再度測定した結果、CCL5はSC/SCM細胞に比べ有意に高い産生量を示した(図 21B)。一方でBMP2はTNF $\alpha$ で刺激後、SF/SFM細胞で検出されたが、SC/SCM細胞では検出できなかった(図 21C)。

以上の結果から、SF/SFM細胞はSC/SCM細胞に比べ骨形成タンパク質の一つである

BMP2 や CCL2,CCL5 等のケモカインの産生能が高い可能性が示唆された。またこれら因子は骨欠損修復や血管新生に働くことが知られる。特に骨欠損の修復には血管新生の寄与も大きいことから、SF/SFM 細胞が *in vivo* で骨欠損修復に特に有効に働く可能性がある。

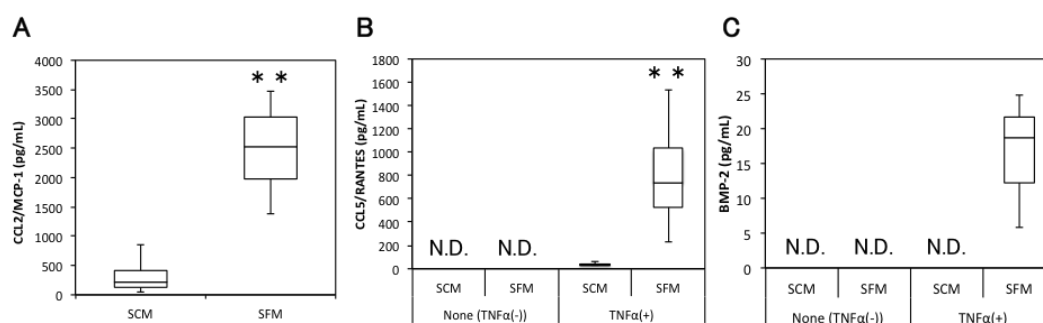


図21 培養細胞のサイトカイン産生能力比較

SC/SCM及びSF/SFM培養細胞の培養上清中に産生された各サイトカインの量をELISAにより比較、評価した。CCL2及びBMP2は培養上清中に検出することが出来なかったため、TNF $\alpha$ で刺激後の培養上清中の産生量を合わせて測定した。データは4名の患者から採取したMSCsを各培養液で3-4継代培養後の上清中の産生量を箱ひげ図で示した。\* \*P<0.01。

#### 4.4 *in vivo* での無血清培養細胞による組織修復能の評価

##### 4.4.1. 大腿骨骨折モデルマウスを用いた骨修復能の定性評価

これまで血清培養で増幅した MSCs が欠損組織の修復に寄与する報告が多数なされている (Granero et al., 2009, Pak, 2012)。一方で、無血清培養細胞が *in vivo* での組織修復に対して有効性を示すか否かについて詳細に解析した報告はない。細胞自身が骨関連細胞へと分化する能力を持ち、さらにサイトカイン産生能の評価から、BMP2 や CCL2、CCL5 を多く産生する SF/SFM 細胞は SC/SCM 細胞に比べ高い骨欠損修復効果をもつ可能性があると考えた。このことから本実験では、大腿骨欠損モデルマウスを用い *in vivo* での骨欠損修復に対する SF/SFM 細胞の有効性について検証した。

8-12 週齢のマウスの右大腿部を切開し大腿骨をハサミで切断後、注射針で骨を固定することにより大腿骨欠損モデルマウスを作成した。この大腿骨欠損部に医療用ゼラチン（ゼルフォーム）に混ぜた AT-MSCs を移植した。

図 22A,B には細胞移植 20, 30, 40 日後の欠損骨の状態を X 線及び  $\mu$  CT 画像、さらに H&E 染色後の組織切片像により示した。  $\mu$  CT 画像から細胞移植 20 日後、大腿骨には大きな傷が残るが、その後徐々に修復し 40 日後には欠損が小さくなり修復が進んでいることがわかる。特に SF/SFM は他の条件に比べ欠損部の修復が進んでおり、40 日目には骨表面の傷は認められなかった(図 22A)。さらに欠損組織の状態について組織切片を作成し確認した。移植 20 日後、欠損部位には薄い青紫色で示される多くの線維芽細胞様の細胞が集まり、40 日後、骨の両端（写真上下）からピンク色で示される Osteocyte の形成が進んでいることが観察できる(図 22B)。特に SF/SFM 細胞を移植した大腿骨は 20 日後、他の条件に比べ線維芽細胞様の層が少ない一方、Osteocyte の形成が進んでおり、40 日後には線維芽細胞様細胞が Osteocyte に置き換わり、骨融合が進んでいることが確認された(図 22B)。この結果から SF/SFM 細胞が SC/SCM 細胞に比べ高い骨修復能を持つ可能性が示唆された。

#### 4.4.2. 大腿骨骨折モデルマウスを用いた骨修復能の定量評価

次に、修復骨の状態を定量的に評価するため、AT-MSCs 移植 30 日後の大腿骨の骨密度、骨強度(Stiffness 及び Failure load)を測定した。修復中の大腿骨の骨密度及び Stiffness は SF/SFM 細胞移植骨で AT-MSCs 非移植骨や SC/SCM 細胞移植骨に比べ有意に高かった(図 23A, C)。一方 Failure load は SF/SFM 細胞移植骨で AT-MSCs 非移植骨に比べ有意に高かったが、SC/SCM 細胞移植骨と同程度であった(図 23B)。以上の結果から、S

F/SFM 細胞は、SC/SCM 細胞に比べ高い骨欠損修復作用をもち、従来法に比べ治療期間を短縮できる可能性が考えられた。

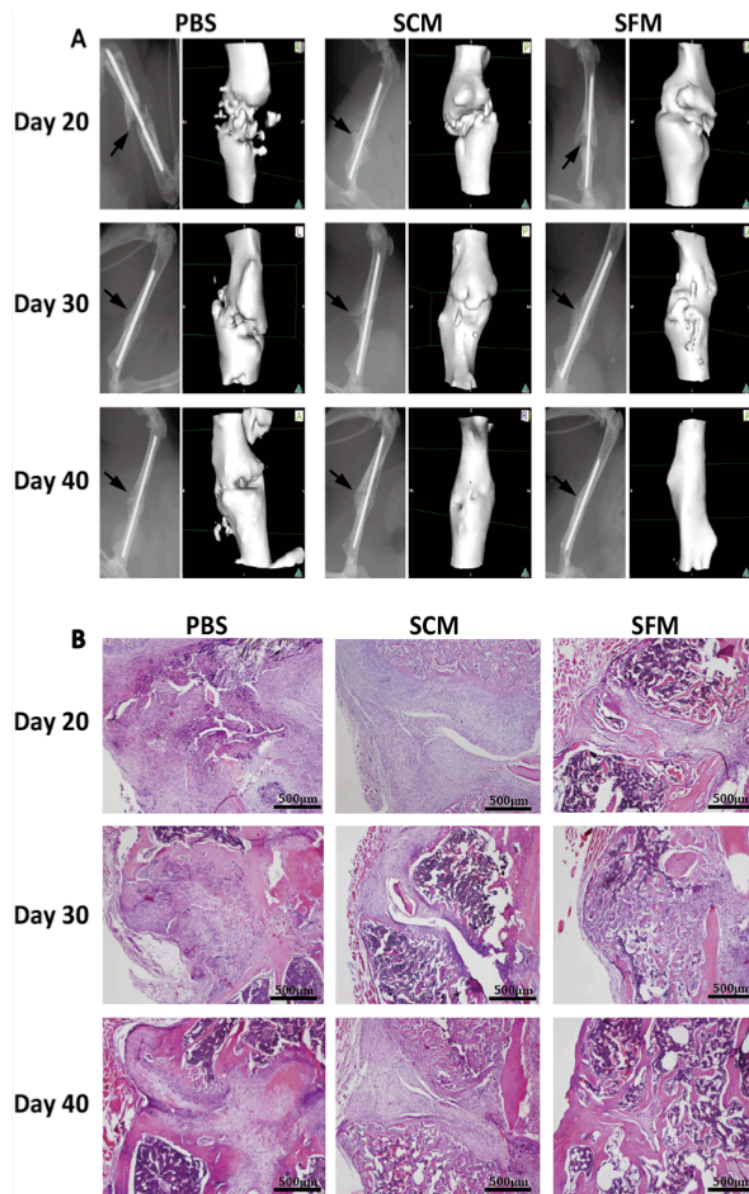


図22 骨修復過程の定性評価

各培養液で4-5継代培養したMSCsをゼラチンとともに大腿骨骨折モデルマウスの骨損傷部位に移植し、20、30、40日後の損傷骨の状態を画像により評価した。なおネガティブコントロールとしてPBSをゼラチンとともに移植した条件を設定した。A:大腿骨のx線画像及び $\mu$ CT画像。矢印は骨折部位を示した。B:H&Eにより染色した損傷部位の組織染色像。

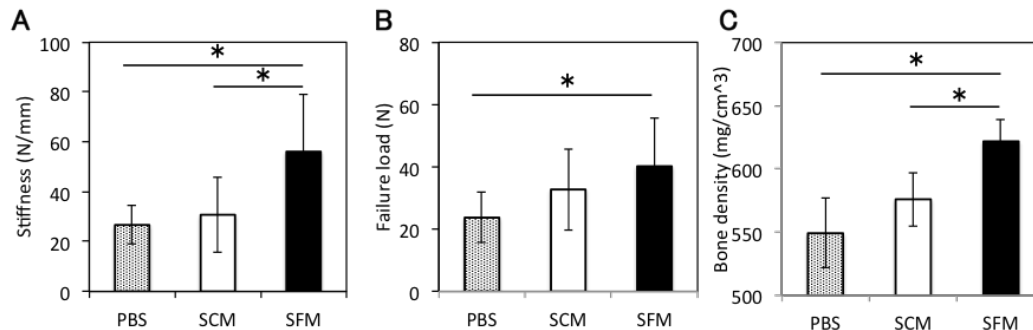


図23 大腿骨品質の定量評価

各培養液で4-5継代培養したMSCsをゼルフォームとともに大腿骨骨折モデルマウスの骨損傷部位に移植後、30日後の損傷骨の状態を定量評価した。なおネガティブコントロールとしてPBSをゼラチンとともに移植した条件を設定した。骨強度試験機による三点折り曲げ試験で算出された(A)stiffness、(B)Failure load、(C)  $\mu$  CTにより測定された骨密度。データはA,B:PBS; n=6, SCM; n=11, SFM; n=10, C:PBS; n=5, SCM; n=6, SFM; n=6。\* $P<0.05$ 。

#### 4.5. 蛍光量子ドット（Qdots）を用いた移植細胞の体内動態解析

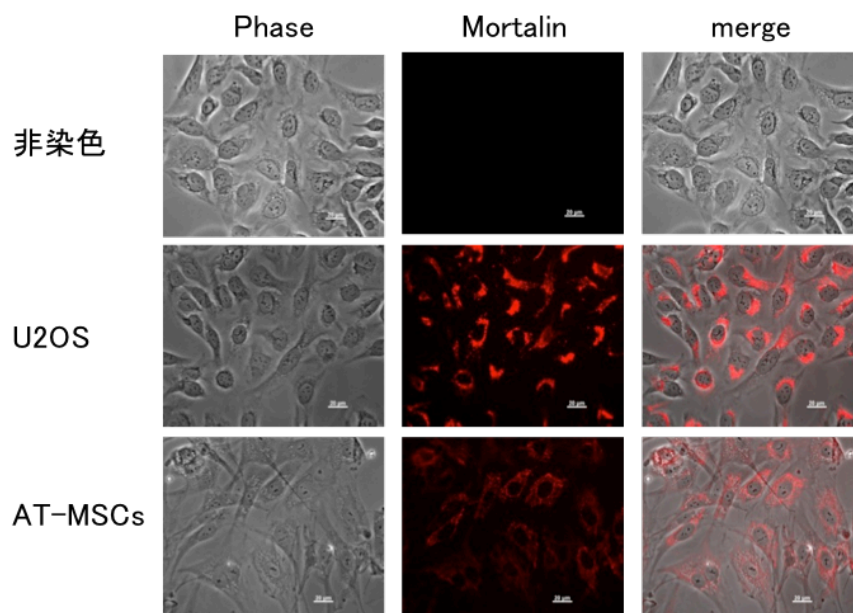
##### 4.5.1. Qdots の取り込み効率及び増殖能、分化能への影響

前項の結果、SF/SFM 細胞は、骨欠損の修復に対して有効に作用する可能性が示唆された。MSCs 移植による骨組織修復の詳細なメカニズムは未だ解明されていないが、多くの研究者は、①移植した MSCs 自身が骨芽細胞または軟骨細胞に分化し組織修復を促進することや、②移植した MSCs が産生するサイトカインが、生体内の骨髄由来幹細胞や単球、マクロファージ等の遊走を促し、さらに欠損組織での血管新生や骨関連細胞の集積が進むことで欠損骨が修復されることを考察している (Knight et al., 2013)。無血清培養細胞の骨欠損修復メカニズムを検討するため欠損組織での移植細胞の動態を調べることにした。この検討では、蛍光量子ドット(Quantum dots-655(QD655))を使用した。



具体的には、QD655 を AT-MSCs の細胞内に導入し、QD655 の蛍光シグナルを持つ AT-MSCs を大腿骨欠損部位に移植することで、QD655 の赤色蛍光から移植細胞を追跡できる(Ohyabu, Y et al., 2007, Pietilä et al., 2013, Yoshioka et al., 2011)。本実験では QD655 を細胞内に保持するため抗モータリン抗体を conjugate 化した Qdots655(i-QD) を使用した。モータリンはヒートショックプロテインの一種であり、テロメラーゼの活性制御に関与することが知られている。主に癌化した細胞に発現するモータリン 1 は核周囲に、正常細胞に発現するモータリン 2 は細胞質に発現することが知られている。

始めに予備検討としてこのモータリン抗体が AT-MSCs に発現することを *in vitro* で確認した。結果、モータリンの発現はポジティブコントロールとして使用した乳癌細胞株 (U2OS) では核周囲に、AT-MSCs では細胞質全体みとめられた(図 24)。



**図24 AT-MSCsでのモータリンタンパク発現**  
AT-MSCsのモータリン発現をICC法により評価した。またポジティブコントロールとして乳癌細胞株U2OSを使用した。

次に i-QD を細胞へ取り込ませ、その取り込み効率及び i-QD が増殖能や分化能に影響するかを検証した。結果、i-QD の取り込み効率は約 90%とほとんどの AT-MSCs で取り込まれることが確認された(図 25A)。また i-QD を取り込んだ AT-MSCs (i-QD+細胞) と非処理の細胞で増殖能を比較した結果、同様の増殖傾向を示した(図 25B, C)。さらに、i-QD+細胞を脂肪及び骨芽細胞用分化培養液で 20 日間培養後、蛍光顕微鏡で観察した結果、QD655 の赤色シグナルは分化誘導後も確認する事ができた(図 25D)。これら予備検討の結果、i-QD の取り込みは、細胞の増殖及び分化誘導能に影響せず、分化誘導後も

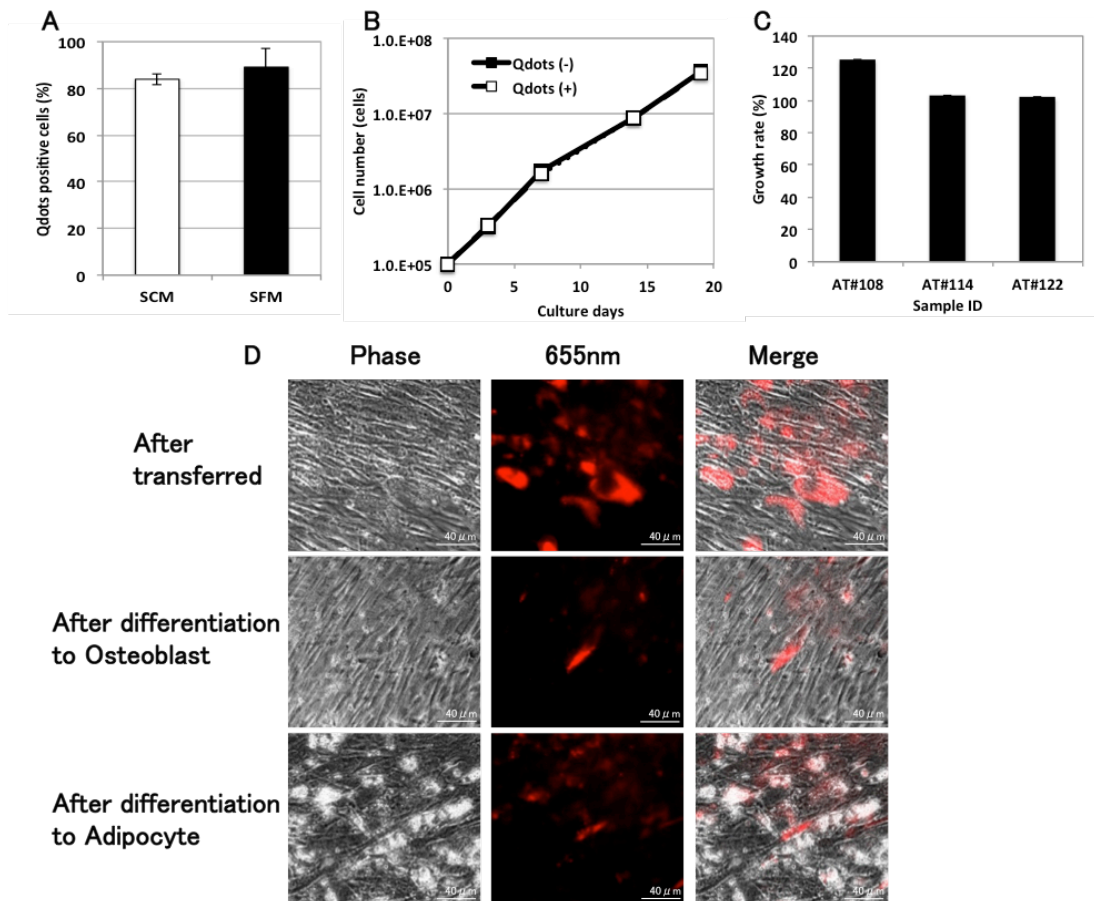


図25 QD655導入による無血清培養細胞への影響

QD655導入に伴う無血清培養細胞への影響の有無を確認した。A:QD655導入効率、QD655導入細胞及び非導入細胞との増殖比較(B)及び3検体の増殖率(C)。QD655導入細胞の脂肪及び骨芽細胞分化誘導後の画像(D)。Aはn=5、B-Dは代表値。

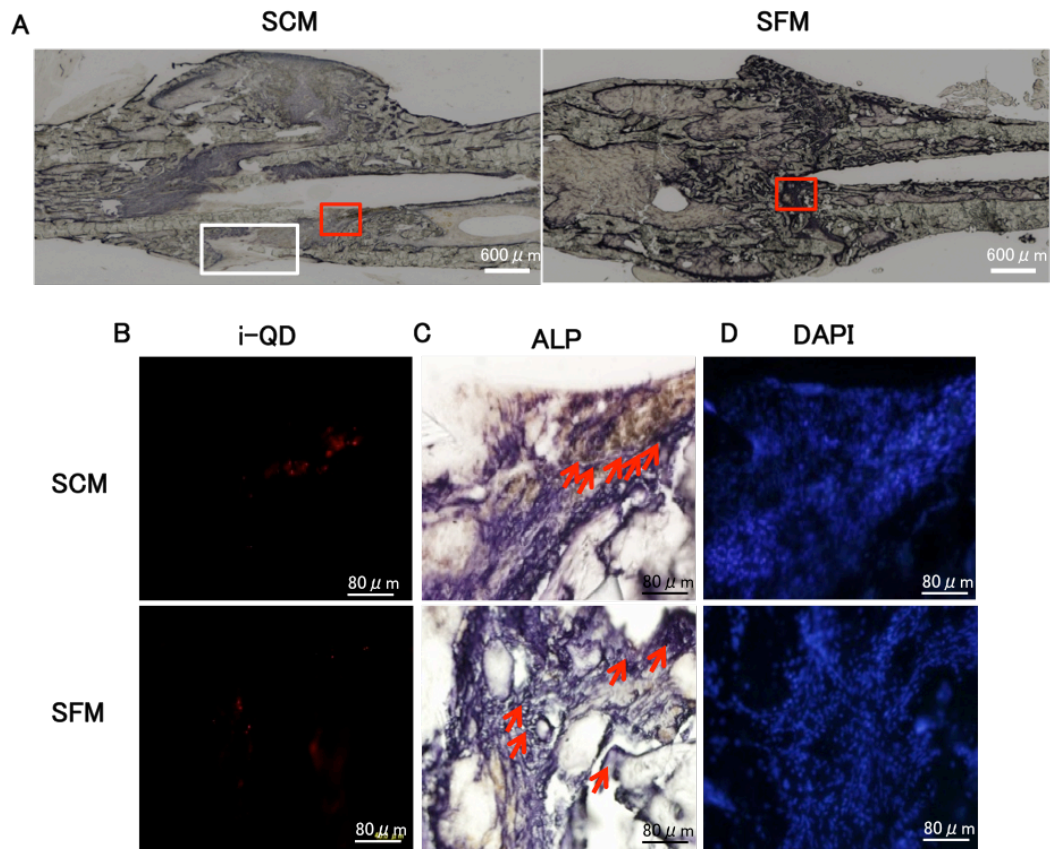
QD655 のシグナル検出が可能であることが確認された。この結果をもとに、i-QD を使

用し *in vivo* での細胞の追跡解析を行った。

#### 4.5.2. 移植細胞の体内動態解析

移植した AT-MSCs の大腿骨欠損部位での動態（生存部位、骨関連細胞への分化の有無）を確認するため、i-QD を取り込ませた SC/SCM 及び SF/SFM 細胞を骨折モデルマウスに移植し 30 日後、作成した凍結切片をアルカリホスファターゼ（ALP）及び DAPI で染色した。ALP は骨芽細胞及び軟骨細胞に発現する酵素で、ピロリン酸からカルシウムを生成し骨の石灰化を引き起こす重要な骨関連細胞マーカーである。一方、DAPI 陽性部位は細胞の核を示す。ALP 染色像から SF/SFM 細胞を移植した大腿骨は骨全体が強く ALP の紫色を示した（図 26A）。一方で SC/SCM 細胞移植骨は SF/SFM 細胞移植骨と同様に多くの場所で紫色の ALP 陽性領域を示したが、白枠で示すように一部で非染色領域が認められた（図 26A）。さらに i-QD の赤色蛍光は SC/SCM 及び SF/SFM に関わらず大腿骨欠損修復部位の一部で確認された（図 26B）。また QD655 の赤色シグナルの多くは細胞の核を示す DAPI の青色蛍光やアルカリホスファターゼ陽性領域を示す紫色部位と重なることから（図 26C、D）、移植細胞の多くは ALP 陽性細胞に分化している可能性が示唆された。

以上の結果から、移植した AT-MSCs の一部はその培養条件（SC/SCM, SF/SFM）に関わらず大腿骨欠損部位にとどまり骨関連細胞に分化することで骨欠損の修復に寄与している可能性が示唆された。



**図26 移植細胞の追跡解析**

QD655を導入した細胞をモデルマウスの大腿骨欠損部に移植した。30日後大腿骨の凍結連続切片を作成し、DAPI(青)またはALP(紫)で染色した。A:ALP染色した大腿骨の全体像。さらに画像A中の赤で示した範囲の拡大画像をB,C,Dで示した。白枠は、ALP非染色領域を示した。B:655nmの蛍光画像、C:ALP染色画像、D:DAPI染色像。赤矢印はQD655が確認された場所を示した。

## 第 5 章 考察

近年、幹細胞研究は大きく進展し、細胞機能の多様性が徐々に明らかになっている。また研究の進展にあわせ、その高い機能性を医療に利用するための研究も進み、動物実験を始めヒトに対する臨床研究でも幹細胞の有効性が示されている。一方で、細胞を体外で加工する際に行われる培養方法の多くは、従来の研究室レベルの培養が行われており、ウシ血清を始めとした動物由来因子が様々な工程で使用され安全性に問題を抱える。今後、研究段階から実用化段階への移行に伴い、様々な背景を持った患者由来の細胞を安定的に且つ効率的に増幅し、医療サービスとしての患者への投与が行われることが考えられることから、これら課題を解決することは、幹細胞の再生医療への実用化を促進し、様々な難治性疾患の治療法開発につながる可能性がある。

本研究開発では、脂肪組織から MSCs の単離から増幅までの全ての工程を無血清化するとともに、これまで報告されている無血清培養の問題点である、①培養安定性の改善、②増幅効率性の向上、③初代培養における接着不良等を改善し、血清培養系と同等以上の安定性や増幅効率性を有する無血清培養系を構築することを目的とし実験を行った。さらに無血清培養系で増幅した AT-MSCs が *in vivo* での組織修復に対して有効に作用するのか、またその有効性は血清培養細胞と比較して高いか否かを検証した。新たに開発した無血清培養系は、脂肪組織から MSCs を従来法と同程度の効率で回収でき、FBS を使用した血清培養系に比べ有意に高い増幅効率を示した。さらに背景の異なる 26 名の患者全ての検体を安定的に培養、増幅することができた。また無血清培養細胞は、血清培養細胞に比べ高い骨修復能を持つ事が明らかとなった。本研究の項目別の考察につ

いて以下に述べる。

### 5.1. 無血清培養液の開発

市販無血清培養液を使用した論文で報告されているような、培養の不安定性の改善とさらなる増幅効率向上が可能な無血清培養液を開発するため、特に重要性が高い基礎培養液と増殖因子の選定を行い  $\alpha$  MEM 及び bFGF, PDGFBB, TGF $\beta$  の組み合わせが最も適していることを示した(図 2、5)。 $\alpha$  MEM に含まれる核酸やアスコルビン酸は他の培養液には含まれておらず特徴的な因子である。特にアスコルビン酸はコラーゲンの生合成に関与し、増殖因子と組み合わせることで MSCs に対して増殖促進効果を有する報告もある(Gronthos et al., 1995)。また核酸は通常細胞自身に合成する能力があるものの、消費量に対し合成量が不十分な場合、外部からの供給することで有効に作用することが考えられる。このことからこれらの因子が  $\alpha$  MEM による高い増殖性能に寄与した可能性がある。この結果は様々な基礎培養液が使用される MSCs 培養において、基礎培養液の選定が MSCs の増幅効率を向上させるうえで重要であることを示すものである。また増幅効率の向上と培養の安定化を期待し、最適な増殖因子として bFGF、PDGFBB、TGF $\beta$  を選定した。この結果は以前 BM-MSC の増殖に有効な増殖因子の評価を行った Ng et al.(2008)らの報告と同様であり MSCs の培養安定化や増幅効率向上に対する有効性は明らかであることが考えられた。しかし、当初の予測に反し、無血清条件下これら増殖因子と  $\alpha$  MEM との組み合わせは短期的に増殖を促進するものの長期的に増殖を維持することができなかった。これは、無血清培養へ移行する前に使用していた血清成分がわずかながらも実験系に混入しそれが短期的に増殖維持を可能にしたと考えられ、無血清条件下長期的に安定した増殖を維持するにはさらに必須な因子が不足している可能性

を示すものであった(図 7)。また、SFM と同じ濃度の bFGF、PDGFBB、TGF $\beta$  を SCM に加えた場合、SFM と同様の増殖速度は得られなかったことから(Data not shown)、AT-MSCs の安定且つ効率的な増幅には他に重要な因子が存在し、それを適量使用することが安定且つ高い増幅効率性を持った無血清培養液開発には必要であることが考えられた。この考察から市販無血清培養液の多くで見られる培養不安定性はこれら因子の不足に起因することが推察される。なお本稿では無血清培養液組成の詳細については開示しない。

## 5.2. 無血清培養系の開発

これまで市販無血清培養溶液を使用した無血清培養系の問題点としては初代培養における接着不良がある。また組織から細胞を回収する工程においてその溶媒条件の違いが細胞に与える影響を評価した報告はない。現在多くの報告では PBS または FBS を含む PBS 中でコラゲナーゼ処理が行われるが、37°C 環境下 60 分以上インキュベートされるこの工程では細胞内代謝は維持され、外部環境変化に伴う細胞への悪影響が懸念されることから、培養環境に近い環境下での処理が望ましいと考え、細胞の保護作用があるヒト血清アルブミンを含む培養系中で処理を行う無血清処理条件を設定した。本実験では AT-MSCs の回収効率を評価するため、CD73+CD90+CD31-CD45-を MSCs マーカーとして規定した。通常これらマーカーに加え CD105 陽性が MSCs マーカーとして規定されているが、脂肪組織から回収直後の細胞では CD105 を発現していなかった。Yoshimura et al.(2006)は、MSCs が容器へ接着することにより CD105 を発現することを報告している。この報告からも今回規定したマーカーは評価の上で妥当であると考えている。

MSCs は全てのコラゲナーゼ処理条件で脂肪組織 1g から約  $2 \times 10^5$  個回収でき、コラゲ

ナーゼ処理時の血清の有無や無血清培養液の使用は回収効率及び生細胞率に影響しないことが明らかとなった。一方で初代培養での増殖効率はコラゲナーゼ処理時に PBS+FBS を溶媒として細胞を回収した条件が PBS のみを溶媒とした条件に比べ有意に高く、コラゲナーゼ処理時の FBS の存在がその後の増殖に影響する可能性が考えられた。この結果は先に予想していた結果であり、FBS 中に含まれるアルブミンを始めとした豊富なタンパク成分が細胞膜の安定化や浸透圧維持、さらには脂肪酸等一部の毒性成分を吸着することにより細胞を保護したと考える。一方で生細胞率に違いが見られなかったことから、本実験で見られた初代培養での増殖率の差が、初代培養時の細胞死によるものか、増殖阻害等やその他の影響によるものかは不明であり、さらなる検証が必要である。また、無血清分離条件である改変  $\alpha$  MEM basal medium +HSA を溶媒とした条件で回収した細胞は PBS+FBS を溶媒とした条件と同様に 26 検体全てで安定した容器への接着が見られた。さらに検体毎の差が大きいものの初代培養での増殖率が高い傾向にある。この結果は、細胞内代謝が進むであろう 37°C 環境下における溶媒環境の重要性を示すものである。また、その後 60 日以上培養を続けた結果、改変型  $\alpha$  MEM basal medium + HSA で分離した細胞は PBS+FBS で分離した細胞の増殖と同様であったことから本実験で設定した無血清分離条件は MSCs 増殖に悪影響を与えないことが確認できた。先行研究では市販の無血清培養液 (StemPro) を溶媒として AT-MSCs を分離し、その後 StemPro と Carboxyl-coated flasks (Purecoat BD) を使用し初代培養を行っている。しかし 6 検体中 2 検体で接着ができず、その不安定性を報告している。容器への細胞接着は足場環境に大きく依存する。前述したよう使用する培養液に含まれる増殖因子が影響することもある。開発した無血清培養液は図 8 で示すようにフィブロネクチン以外のラミニンや CELLstart は細胞の接着や増殖を十分誘導できなかつた。これは継代培養時の結果では



あるが、コーティングマトリクスの選定は無血清培養系構築において一つの重要な要素になると考えられ、本無血清培養液に対する最適なマトリクスはフィブロネクチンであり、これらの組み合わせは安定した初代培養細胞の接着培養を可能とすることが示唆される。

以上の結果から、本無血清分離法は血清によるリスクを回避し、高い増殖が得られる分離方法として有用である可能性がある。

新たに開発した SFM を用いた無血清培養系は、線維芽細胞様の形態、MSCs マーカーの発現、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を持つ MSCs の定義を満たす細胞を特異的に増幅できた。さらにその増幅効率は、従来の血清培溶液に比べ有意に高く、実験に使用した背景（年齢、性差、合併症）の異なる 26 検体の細胞全てを安定的に培養、増幅でき、結果的に治療に必要な細胞数を回収するための期間を大幅に短縮できる（図 27、図 12A-C）。培養期間の短縮は治療期間の短縮や培養コストの削減につながることからその利点は大きい。さらに興味深いことは、無血清培養系は血清培養系に比べ本実験で培養した検体間の増殖性能のバラツキを明らかに小さくできることである。これは本無血清培地が各検体の増殖ポテンシャルを引き出した結果と考えている。通常、患者の背景により細胞の増殖能は大きく異なり、必要な細胞数が回収できるまで長期間を要することや、一定の培養スケジュール内で必要な細胞数が得られないケースもある。また検体毎の増殖にあわせた煩雑な工程管理が必要になるが、本無血清培養系はこれら問題を回避できる可能性があり将来的な産業化において大きな利点になると考える。また本実験で使用した検体のドナー平均年齢は約 70 歳と高齢者の検体が多かった。ドナーの年齢が MSCs の増殖や機能低下を起こす報告もあるが (Lund et al., 2010)、本無血清培養系は高齢者サンプルでも安定的且つ効率的に細胞を増幅できることが確認で

きたことは臨床応用に向けた一つの利点となる可能性がある。

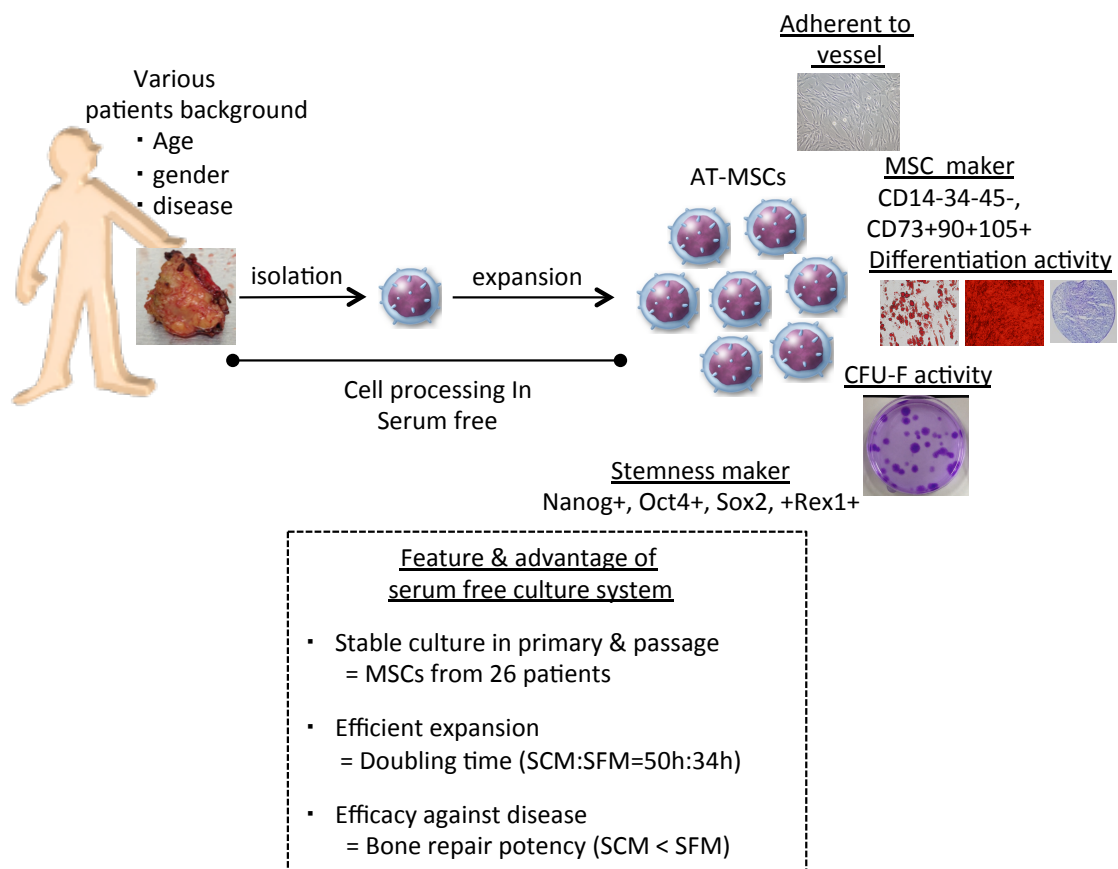


図27 無血清培養系の特徴

他社無血清培養液との増殖能及び分化能を比較した結果、SFMはMosaicやStemproに比べ同等以上の性能を有する培養液であることが示唆された。また他社無血清培養液では一部の検体で継代培養後、増殖が大きく鈍化するなどこれまで報告されているような培養不安定性が見られたが、SFMはこれら他社培養液で高い増殖を維持できなかった検体でも安定した増殖性能を示した。他社無血清培養液は組成が開示されておらず、この原因を考察することは難しいがこれら実験結果はSFMが高い培養安定性を示すことを強く証明する結果であり、一つの優位性であると考えられる。

さらに、SFMは骨髄、歯根、歯髓由来幹細胞等の他の幹細胞を培養可能であり、その汎用性が確認された。しかし、これら増殖能の脂肪由来MSCsで見られたような血清

培養に対する増殖能の優位性は見られなかった。増殖能性能の優劣を評価するためにはさらに多検体での評価が必要となるが、各組織由来 MSCs にあわせ、無血清培養液組成の最適化が必要となる可能性がある。

### 5.3. 無血清培養細胞の質と安全性

通常、細胞の分裂回数はテロメア長に規定され、長期間の増殖は老化が進み、Oct4 や Sox2 等の未分化マーカーの発現低下や多分化能が低下し、結果として幹細胞としての性質を失うことが報告されている (Li et al., 2011、Liu et al., 2013)。増幅効率の高い無血清培養系は血清培養に比べ短期間に細胞分裂回数が亢進し、細胞老化とそれに伴う機能低下を引き起こす可能性が考えられたが、予想に反し老化マーカーの発現は抑えられ、幹細胞としての性質は維持されていることが確認された。この具体的な老化抑制メカニズムは不明だが、Eom et al.(2012)は、老化抑制には AKT シグナル及び ERK シグナル等の活性化が有効であり、MSCs からオートクラインで産生される bFGF、FGF4、EGF がこれらシグナルを活性化することで、細胞老化の抑制や未分化性維持に寄与することを報告している。本実験では両培養液で bFGF を培養液に加え使用しているが無血清培養液では AKT や Erk のリン酸化に作用する PDGFBB も加えられていることから、SFM での老化抑制作用は bFGF と PDGFBB の複合的作用によるものであると考えられる。一方でデータには示していないが、無血清培養でさらに継代培養を続けた場合、急激な SA $\beta$ Gal 活性の増加と増殖の著しい鈍化が見られる。これは細胞自身の分裂限界に伴う変化であると考えられ、テロメア長の解析を行うことで、SF/SFM 細胞の老化と分裂限界による細胞機能の変化が明確になると予想される。一方 G バンド解析の結果から 10 継代培養した細胞の染色体に異常は認められず、本無血清培養系での増幅によ

り癌化が起きる可能性は少ないことが示唆された。

培養環境の変化は MSCs の特徴的機能の一つであるサイトカイン産生能を変化させると考えられるが、BMP2 や CCL2、CCL5 の産生能が SC/SCM 細胞に比べ SF/SFM 細胞で有意に高いことが明らかとなった。また CXCL12 は統計的有意差が無いものの、SC/SCM 細胞に比べ高い発現傾向を示した。van Steensel et al.(2010)は、PDGFB が NF- $\kappa$ B 経路を介し、CCL2 や CCL5、CCL7 等の炎症性サイトカインの産生を高めることを報告している。このことから無血清培養液に加えられた PDGFB は増殖促進だけでなくこれら炎症性サイトカインの産生増加に寄与し、その結果 CCL2 や CCL5 が増加した可能性がある。一方で CCL5 は TNF  $\alpha$  刺激なしには検出することは出来なかった。これは TNF  $\alpha$  で刺激前から本実験で使用した ELISA kit で検出可能な濃度範囲以下の濃度で SF/SFM 細胞の産生量は有意に高かったかもしれない。TNF  $\alpha$  による追加刺激が結果的に検出できる濃度範囲内で、その差を明確に示した可能性がある。さらに MSCs からの BMP2 産生については、いくつか報告がある一方で産生量が非常に微量なためその検出は他の因子に比べ容易ではない。本実験で SF/SFM 細胞が高い産生量を示した具体的な理由は不明であり、さらに詳細な検討が必要であるが、BMP 2 は骨分化誘導促進を始め骨再生に対して重要な因子であることから、SF/SFM 細胞が骨修復に有効に寄与する可能性が高いことはこのデータからも推察される。

以上の結果から、本実験の結果は本無血清培養系の安全性を示しているとともに、幹細胞としての性質及び機能が無血清培養細胞で維持されていることを示す有用な情報になると考える。特に SF/SFM 細胞で見られた BMP2 及び CCL2、CCL5 産生能の向上は、これらの因子が寄与する骨修復のみならず虚血が原因となる疾患に対しても SF/SFM 細胞が *in vivo* で有効に作用する可能性を示唆するものである。

#### 5.4. 骨欠損修復に対する無血清培養細胞の有効性

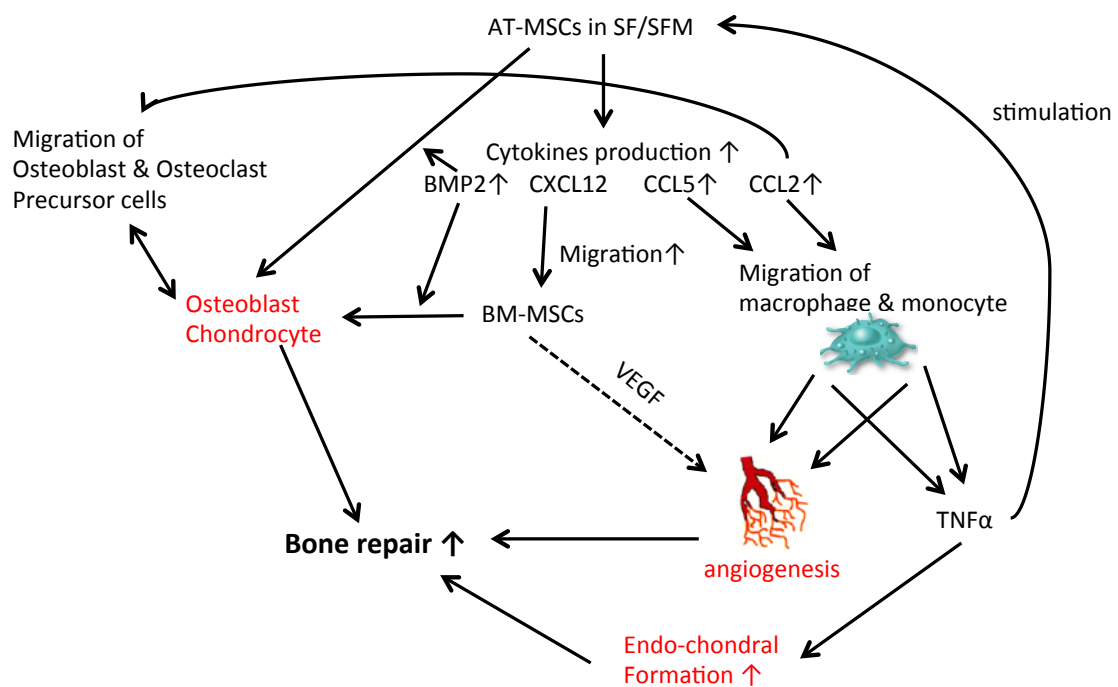
SF/SFM 細胞は SC/SCM 細胞に比べ有意に高い骨欠損修復能を示すことが大腿骨の定性的及び定量的評価から明らかとなった(図 22、23)。さらに移植した AT-MSCs の一部は骨欠損修復部位に留まり、自身が分化することで ALP 発現細胞となり骨修復に寄与している可能性が考えられた。大腿骨に代表される長管骨の修復は多くが軟骨内骨化により行われる。具体的に欠損初期では炎症性反応が進み、続いて血管新生及び MSCs の集積が起こる。これら細胞は欠損部位で増殖し、MSCs は軟骨細胞または骨芽細胞へと分化する。骨芽細胞は内膜骨化過程を経て、石灰化を行う一方、軟骨細胞は急速に増殖し軟骨基質を分泌しながら肥大軟骨となる。肥大軟骨は VEGF 等のサイトカインを産生し、血管を始めとした骨髄形成を促す。さらに形成された血管を介して骨芽細胞が骨基質を産生し一次海綿骨が形成される (Knight et al., 2013)。このように骨修復には MSCs から分化した軟骨細胞や骨芽細胞、そして血管形成が非常に重要な役割を果たしている。MSCs による骨修復の詳細なメカニズムは明らかになっていないが移植細胞自身が骨芽細胞や軟骨細胞に分化する直接的な作用と、移植した MSCs が産生するサイトカインが血管新生やマトリクス産生、骨修復関連細胞の遊走を促進することで骨修復に寄与する間接的作用が報告されている。AT-MSCs は BM-MSC に比べ ALP 活性が低く直接的な作用は弱い、その高いサイトカイン産生能が強く骨修復に寄与する可能性がある。Linero et al. (2014)は、AT-MSCs の培養上清をウサギの骨欠損部位に投与することで高い骨修復効果が得られたことを報告している。またこの報告では MSCs の培養上清中には、IL-6、IGF-1、TGF $\beta$ 、VEGF、PDGFBB、bFGF、EGF、CCL2、CCL5 等が含まれていることが示されており、これらの因子が骨再生過程での血管新生、細胞増殖、遊走、

分化に関与したと考えられる。

これまで報告された MSCs による骨修復メカニズムをもとに無血清培養細胞の骨修復メカニズムの仮説を図 27 に示した。本実験で行った i-QD を使用した追跡解析から、移植した AT-MSCs は培養条件に関わらず ALP 陽性細胞として生着し、直接的に骨修復に関与している可能性が考えられた。定量解析は行っていないものの、組織中で確認された移植細胞の量に培養条件間の大きな差は見られていない。

一方でサイトカイン産生による間接的な修復作用として、本実験で発現が確認されたサイトカインの多くが上述した培養上清中に含まれるサイトカイン (Linero et al., 2014) と一致した。また SF/SFM 細胞では新たに BMP2 の産生や高濃度の CCL2 及び CCL5 の産生が確認されている等、細胞自身による骨関連細胞への分化よりも液性因子による影響が強いと考える。各因子の具体的な作用として BMP2 は MSCs の骨分化において特に重要な因子であり、欠損部位に集積する MSCs の骨分化を促進する (Tsuji et al. 2006)。Li et al.(2007)は、遺伝子導入により BMP2 遺伝子の発現を高めた AT-MSCs がビーグル犬の尺骨欠損に対して高い有効性を示した事を報告し、骨修復における BMP2 の重要性を論じている。一方 CCL2 や CCL5 は単球及びマクロファージの遊走を促しこれらの細胞は続いて血管新生に寄与する (Aplin et al., 2010、Suffee et al., 2011)。さらに単球やマクロファージが産生する TNF $\alpha$  は、骨修復時の軟骨内骨形成において重要な働きを持つことも報告されている (Gerstenfeld et al., 2003)。具体的には TNF $\alpha$  受容体ノックアウトマウスにおいて骨修復初期の MSCs の集積や石灰化軟骨の再吸収等いくつかの修復過程が遅延することから、軟骨内骨化における TNF $\alpha$  の重要性を示している。また、CCL2 は骨修復初期において破骨細胞や骨芽前駆細胞の遊走を促す (Li et al., 2007)。さらに当研究室の先行研究で shRNA により CCL5 の遺伝子発現をノックダウン

した AT-MSCs は血管新生能や大腿骨修復能が著しく低下することを報告している (kimura et al., 2013)。以上の知見に加え、CXCL12 等の遺伝子発現について有意な差は認められなかったものの、無血清培養細胞は血清培養細胞に比べ高い傾向にある。これらの報告と本実験で得られた SF/SFM 細胞のサイトカインプロファイルから、SF/SFM 細胞が骨修復過程で重要な血管新生と骨芽細胞及び軟骨細胞への分化やその遊走を間接的に促した結果、SC/SCM 細胞に比べ高い骨修復能を示したと考えている。この仮説を証明するためにはさらに詳細な研究を行う必要があるが、本無血清培養細胞が骨組織の修復に強く寄与できることは明らかである。



**図28 SF/SFM細胞による骨修復機構**  
骨修復機構に関する論文報告を元にSF/SFM細胞の骨修復メカニズムの仮説を示した。

## 第 6 章 総括

本研究開発をまとめると、新たに開発した無血清培養系は、無血清環境下脂肪組織から MSCs を単離し、安定且つ効率的に増幅できる培養系である。また増幅された無血清培養細胞は、容器への接着、多分化能、MSCs 様マーカーを発現した MSCs であり、約 20 日以上（5 継代）培養後もコロニー形成能を始めとした幹細胞としての性質を維持することが確認された。さらに本無血清培養細胞が大腿骨欠損に対して高い治療効果を持つことを明らかにした。これらの結果は開発した無血清培養系が FBS やその他血清代替物を使用した培養系に比べても優れた性能を有することを示唆するものである(表 5)。

目的の細胞を安定して短期間で必要数まで増殖できる培養系は、再生医療とその産業化を実現するために必要であり、本培養系が有用な手段となりうる可能性がある。さらに本項では骨欠損モデルに対する評価を行ったが、無血清培養細胞による高いサイトカイン産生能は他の病態の治療にも有効に作用する可能性を持つものとする。本培養系はあくまで無血清培養系であり、Xeno-free 化または、Chemically defined な培養系への改良が今後の課題となる。さらに、無血清培養液のコストを下げる事もまた一つの課題である。しかし新たに開発したこの培養系は、従来の血清培養系に比べ効率的で高い安全性が得られることからその有用性は明らかであり、MSCs の再生医療応用のための有用なツールとなるものである。



表5 血清及び血清代替物との性能比較

	Fetal bovine serum (FBS)	Human serum	Platelet lysate(hPL)/platelet rich plasma(PRP)	Serum free medium	SFM
Adherence to plastic	+	+ <sup>1</sup>	+	+ <sup>2</sup>	+
Morphology	Spindle shape	Smaller and more spindle shape	Elongated and more spindle shaped(hLPL)・Smaller cells in PRP	More spindle shape	More spindle shape
CD105	+	+	+	+	+
CD90	+	+	+	+	+
CD73	+	+	+	+	+
CD45	-	-	-	-	-
CD34	-	-	-	-	-
CD14/CD11b	-	+/- <sup>3</sup>	-	-	-
HLA-DR	-	-	-	+/- <sup>3</sup>	-
Tri-lineage differentiation	+	+	+	+ <sup>4</sup>	+
CFU-F efficiency	Large and well spread	Densely packed.Mesh-like growth pattern in later passage	Densely packed.Mesh-like growth pattern in later passge	Varies with media components	Large and well spread
Doubling time	76-89 hr	↓/=	↓/=	↓ (23~72hr.) <sup>5</sup>	約34hr
Cost and availability	約¥50,000-70,000/500mL <sup>6</sup>	Available and cheaper	Available and cheaper	¥36,000~130,000/500mL <sup>6</sup>	-
Others	Different lot to lot. Contaminate with virus.	Different lot to lot. Limited source. Contaminate with virus.	Different lot to lot. Limited source. Contaminate with virus.	safety	safety

引用:Tekkatte et al.,2011 "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. Stem Cells Int. Table1を一部改変。

- 1: Decrease in later passages
- 2: When adhesion factors are added
- 3: Affected by factors added in the medium
- 4: Defined media for each specific differentiation are available
- 5: Gottipamula et al. (2013)のデータから引用
- 6: websiteに表示されている定価の目安を示した。

## 第 7 章 引用文献

1. Amable, P. R.; Teixeira, M. V.; Carias, R. B.; Granjeiro, J. M.; Borojevic, R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res. Ther.* 5:53; 2014.
2. Aplin, A. C.; Fogel, E.; Nicosia, R.F. MCP-1 promotes mural cell recruitment during angiogenesis in the aortic ring model. *Angiogenesis* 13: 219-226; 2010.
3. Baksh, D.; Yao, R.; Tuan, R.S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25:1384–1392; 2007.
4. Batouli, S.; Miura, M.; Brahim, J.; et al. Comparison of stem cell mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J. Dent. Res.* 82:976– 981; 2003.
5. Bjare, U. Serum-free cell culture. *Pharmacol. Ther.* 53:355-74; 1992.
6. Bonab, M. M.; Alimoghaddam, K.; Talebian, F.; Ghaffari, S. H.; Ghavamzadeh, A.; Nikbin, B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 7:14; 2006.
7. Chase, L. G.; Lakshmipathy, U.; Solchaga, L. A.; Rao, M. S.; Vemuri, M. C. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 1:8; 2010.

8. Chen, W. J.; Jingushi, S.; Aoyama, I.; Anzai, J.; Hirata, G.; Tamura, M.; Iwamoto, Y. Effects of FGF-2 on metaphyseal fracture repair in rabbit tibiae. *J. Bone Miner. Metab.* 22: 303-309; 2004.
9. Cowan, C, M.; Shi, Y, Y.; Aalami, O, O.; Chou, Y, F.; Mari, C.; Thomas, R.; Quarto, N.; Contag, C, H.; Wu, B.; Longaker, M, T. Adipose-derived adult stroma l cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol.* 22:560-7; 2004.
10. Dahl, J, A.; Duggal, S.; Coulston, N.; Millar, D,.; Melki, J,.; Shahdadfar, A.; Brinchmann, J,.;E, Collas, P. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. *Int J Dev Biol.* 52:1033-42; 2008.
11. Digirolamo, C, M.; Stokes, D.; Colter, D.; Phinney, D, G.; Class, R.; Prockop, D, J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 107:275-81; 1997.
12. Dominici, M.; Le, Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, Dj.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317; 2006.
13. Eom, Y. W.; Oh, J. E.; Lee, J. I.; Baik, S. K.; Rhee, K. J.; Shin, H. C.; Kim, Y. M.; Ahn, C. M.; Kong, J. H.; Kim, H. S.; Shim, K. Y. The role of growth factors in maintenance of stemness in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445:16-22; 2014.

14. Even, M.S.; Sandusky, C.B.; Barnard, N.D. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends Biotechnol.* 24:105-8; 2006.
15. Friedenstein, A.J.; Chailakhjan, R.K.; Lalykina, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3:393-403; 1970.
16. Fukuchi, Y.; Nakajima, H.; Sugiyama, D.; et al. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 22:649–658; 2004.
17. Galindo, L. T.; Filippo, T. R.; Semedo, P.; Ariza, C. B.; Moreira, C. M.; Camara, N. O.; Porcionatto, M. A. Mesenchymal stem cell therapy modulates the inflammatory response in experimental traumatic brain injury. *Neurol. Res. Int.* 2011: 5640-5649. 2011.
18. Gerstenfeld, L. C.; Cho, T. J.; Kon, T.; Aizawa, T.; Tsay, A.; Fitch, J.; Barnes, G. L.; Graves, D. T.; Einhorn, T. A. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J. Bone Miner. Res.* 18:1584-1592; 2003.
19. Gimble, J. M.; Guilak, F.; Bunnell, B. A. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther.* 1:19; 2010.
20. Goedecke, A.; Wobus, M.; Krech, M.; Münch, N.; Richter, K.; Hölig, K.; Bornhauser, M. Differential effect of platelet-rich plasma and fetal calf serum on bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells expanded in vitro. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5:648-54; 2011

21. Gonzalez-Rey, E.; Gonzalez, M. A.; Rico, L.; Buscher, D.; Delgado, M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 58:929-939; 2009.
22. Gottipamula, S.; Muttigi, MS.; Chaansa, S.; Ashwin, K. M.; Priya, N.; Kolkundkar, U.; Sundarraj, S.; Majumdar, A. S.; Seetharam, R. N. Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013.
23. Gottipamula, S.; Muttigi, M, S.; Kolkundkar, U.; Seetharam, R, N.; Serum-free media for the production of human mesenchymal stromal cells: a review. *Cell Prolif.* 46:608-27; 2013.
24. Granero-Molt, F.; Weis, J. A.; Miga, M. I.; Landis, B.; Myers, T. J.; O'Rear, L.; Longobardi, L.; Jansen, E. D.; Mortlock, D. P.; Spagnoli, A. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 27:1887-1898; 2009.
25. Gronthos, S.; Simmons, P, J. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 15:929-40; 1995.
26. Halme, D, G.; Kessler, D, A. FDA regulation of stem-cell-based therapies. *N. Engl. J. Med.* 19:1730-5; 2006.
27. Hosoya, A.; Hoshi, K.; Sahara, N.; Ninomiya, T.; Akahane, S.; Kawamoto, T.; Ozawa, H. Effects of fixation and decalcification on the immunohistochemical localiz

- ation of bone matrix proteins in fresh-frozen bone sections. *Histochem Cell Biol.* 12:639-46; 2005.
28. Hermida-Gomez, T.; Fuentes-Boquete, I.; Gimeno-Longas, M,J.; et al. Quantification of cells expressing mesenchymal stem cell markers in healthy and osteoarthritic synovial membranes. *J. Rheumatol.* 38:339–349; 2011
  29. Huang, G.T.; Gronthos, S.; Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* 88:792-806; 2009.
  30. Kim, J.; Kang, J. W.; Park, J. H.; Choi, Y.; Choi, K. S.; Park, K. D.; Baek, D. H.; Seong, S. K.; Min, H. K.; Kim, H. S. Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. *Arch. Pharm. Res.* 32:117-126; 2009.
  31. Kimura, K.; Nagano, M.; Salazar, G.; Yamashita, T.; Tsuboi, I.; Mishima, H.; Matsushita, S.; Sato, F.; Yamagata, K.; Ohneda O. The role of CCL5 in the ability of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to support repair of ischemic regions. *Stem Cells Dev.* 23:488-501; 2014.
  32. Knight, M, N.; Hankenson, K, D. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2:306-316; 2013.
  33. Kocaoemer, A.; Kern, S.; Klüter, H.; Bieback, K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells* 25:1270-1278. 2007.

34. Li, H.; Dai, K.; Tang, T.; Zhang, X.; Yan, M.; Lou, J. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356:836-842; 2007.
35. Li, X.; Qin, L.; Bergenstock, M.; Bevelock, L. M.; Novack, D. V.; Partridge, N. C. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 282:33098-33106; 2007.
36. Li, Z.; Liu, C.; Xie, Z.; Song, P.; Zhao, R. C.; Guo, L.; Liu, Z.; Wu, Y. Epigenetic dys-regulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. *PLoS One* 6:e20526; 2011.
37. Lindroos, B.; Boucher, S.; Chase, L.; Kuokkanen, H.; Huhtala, H.; Haataja, R.; Vemuri, M.; Suuronen, R.; Miettinen, S. Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. *Cytherapy* 11:958-972; 2009.
38. Lindroos, B.; Suuronen, R.; Miettinen, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* 7:269-291; 2011.
39. Linero, I.; Chaparro, O.; Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One.* 8;9:e107001; 2014.
40. Liotta, F.; Angeli, R.; Cosmi, L.; Fili, L.; Manuelli, C.; Frosali, F.; Mazzinghi, B.; Maggi, L.; Pasini, A.; Lisi, V.; Santarlasci, V.; Consoloni, L.; Angelotti, M, L.; Romagnani, P.; Parronchi, P.; Krampera, M.; Maggi, E.; Romagnani, S.; Annunziato, F. Toll-like receptors three and four are expressed by human bone marrow-derived m

mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells* 26, 279–89; 2008.

41. Liu, J. F.; Wang, B. W.; Hung, H. F.; Chang, H.; Shyu, K. G. Human mesenchymal stem cells improve myocardial performance in a splenectomized rat model of chronic myocardial infarction. *J. Formosan Med. Asso.* 107:165-174; 2008.
42. Liu, L.; Wei, X.; Huang, R.; Ling, J.; Wu, L.; Xiao, Y. Effect of bone morphogenetic protein-4 on the expression of Sox2, Oct-4, and c-Myc in human periodontal ligament cells during long-term culture. *Stem Cells Dev.* 22:1670-1677; 2013.
43. Lund, T. C.; Kobs, A.; Blazar, B. R.; Tolar, J. Mesenchymal stromal cells from donors varying widely in age are of equal cellular fitness after in vitro expansion under hypoxic conditions. *Cytotherapy.* 12(8):971-81; 2010.
44. McIntosh, K.; Zvonic, S.; Garrett, S.; Mitchell, J. B.; Floyd, Z. E.; Hammill, L.; Kloster, A.; Di Halvorsen, Y.; Ting, J. P.; Storms, R. W.; Goh, B.; Kilroy, G.; Wu, X.; Gimble, J. M. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 24:1246 -53. 2006.
45. Miyahara, Y.; Nagaya, N.; Kataoka, M.; Yanagawa, B.; Tanaka, K.; Hao, H.; Ishino, K.; Ishida, H.; Shimizu, T.; Kangawa, K.; Sano, S.; Okano, T.; Kitamura, S.; Mori, H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat. Med.* 12:459-465; 2006.



46. Ng, F.; Boucher, S.; Koh, S.; Sastry, K, S.; Chase, L.; Lakshmiathy, U.; Choong, C.; Yang, Z.; Vemuri, M, C.; Rao, M, S.; Tanavde, V. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*. 15;112:295-307; 2008.
47. Niemeyer, P.; Vohrer, J.; Schmal, H.; Kasten, P.; Fellenberg, J.; Suedkamp, N. P.; Mehlhorn, A. T. Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice. *Cytotherapy* 10:784 -795; 2008.
48. Ohyabu, Y.; Kaul, Z.; Yoshioka, T.; Inoue, K.; Sakai, S.; Mishima, H.; Uemura, T.; Kaul, S. C.; Wadhwa, R. Stable and nondisruptive in vitro/in vivo labeling of mesenchymal stem cells by internalizing quantum dots. *Hum. Gene Ther.* 20:217-224; 2009.
49. Osugi, M.; Katagiri, W.; Yoshimi, R.; Inukai, T.; Hibi, H.; Ueda, M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng. Part A*. 18:1479-89; 2012.
50. Pak, J. Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads. *Pain Physician*.15:75-85; 2012.
51. Pak, J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *J. Med. Case Rep.* 5:296; 2012.

52. Park, J.C.; Kim, J, M.; Jung, I, H.; et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: In vitro and in vivo evaluations. *J. Clin. Periodontol.* 38:721–731; 2011
53. Parker, A.; Shang, H.; Khurgel, M.; Katz, A. Low serum and serum-free culture of multipotential human adipose stem cells. *Cytotherapy* 7:637-646; 2007.
54. Patrikoski, M.; Juntunen, M.; Boucher, S.; Campbell, A.; Vemuri, MC.; Mannerström, B.; Miettinen, S. Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 4:27; 2013.
55. Peng, L.; Jia, Z.; Yin, X.; Zhang, X.; Liu, Y.; Chen, P.; Ma, K.; Zhou, C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 17:761-773; 2008.
56. Pietilä, M.; Lehenkari, P.; Kuvaja, P.; Kaakinen, M.; Kaul, S. C.; Wadhwa, R.; Uemura, T. Mortalin antibody-conjugated quantum dot transfer from human mesenchymal stromal cells to breast cancer cells requires cell-cell interaction. *Exp. Cell Res.* 19:2770-2780; 2013.
57. Price, P, J.; Gregory, E, A. Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. *In Vitro.* 18:576-84; 1982.
58. Ra, J. C.; Kang, S. K.; Shin, I. S.; Park, H. G.; Joo, S. A.; Kim, J. G.; Kang, B. C.; Lee, Y. S.; Nakama, K.; Piao, M.; Sohl, B.; Kurtz, A.; Stem cell treatment f

- or patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J. Transl. Med.* 9:181; 2011.
59. Rajala, K.; Lindroos, B.; Hussein, SM.; Lappalainen, R. S.; Pekkanen-Mattila, M.; Inzunza, J.; Rozell, B.; Miettinen, S.; Narkilahti, S.; Kerkelä, E.; Aalto-Setälä, K.; Otonkoski, T.; Suuronen, R.; Hovatta, O.; Skottman, H. A defined and xeno-free culture method enabling the establishment of clinical-grade human embryonic, induced pluripotent and adipose stem cells. *PLoS One* 5:e10246; 2010.
60. Russell, K,C.; Phinney, D,G.; Lacey, M, R.; et al. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 28:788–798; 2010.
61. Sarugaser, R.; Lickorish, D.; Baksh.; et al. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 23:220–229; 2005.
62. Schwab, K, E.; Hutchinson, P.; Gargett, C, E. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Hum. Reprod.* 23: 934-943; 2008.
63. Shahdadfar, A.; Fronsdal, K.; Haug, T.; Reinholt, F. P.; Brinckmann, J. E. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 23:1357-1366; 2005.
64. Sharma, R, R.; Pollock, K.; Hubel, A.; McKenna, D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion* 54:1418-37; 2014.

65. Strem, B, M.; Hicok, K, C.; Zhu, M.; Wulur, I.; Alfonso, Z.; Schreiber, RE.; Fraser, J, K.; Hedrick, M, H. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 54:132-41; 2005.
66. Suffee, N.; Richard, B.; Hlawaty, H.; Oudar, O.; Charnaux, N.; Sutton, A. Angiogenic properties of the chemokine RANTES/CCL5. *Biochem. Soc. Trans.* 39:1649-1653; 2011.
67. Taguchi, K.; Ogawa, R.; Migita, M.; Hanawa, H.; Ito, H.; Orimo, H. The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 331:31-36; 2005.
68. Tekkate, C.; Gunasingh, G, P.; Cherian, K, M.; Sankaranarayanan, K. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int.* 5047-5053; 2011.
69. Tondreau, T.; Meuleman, N.; Delforge, A.; et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: Proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 23: 1105–1112; 2005.
70. Tsuji, K.; Bandyopadhyay, A.; Harfe, B. D.; Cox, K.; Kakar, S.; Gerstenfeld, L.; Einhorn, T.; Tabin, C. J.; Rosen, V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat. Genet.* 38:1424-1429; 2006.
71. van Steensel, L.; Paridaens, D.; Dingjan, G, M. van Daele, P, L.; van Hagen, P, M.; Kuijpers, R, W.; van, den.; Bosch, W, A.; Drexhage, H, A.; Hooijkaas, H.; Dik, W, A. Platelet-derived growth factor-BB: a stimulus for cytokine production by

- orbital fibroblasts in Graves' ophthalmopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51:1002-7; 2010.
72. Yañez, R.; Lamana, M. L.; García-Castro, J.; Colmenero, I.; Ramírez, M.; Bueren, J. A. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 24:2582-2591; 2007.
73. Yoshimura, K.; Shigeura, T.; Matsumoto, D.; Sato, T.; Takaki, Y.; Aiba-Kojima, E.; Sato, K.; Inoue, K.; Nagase, T.; Koshima, I.; Gonda, K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 208:64-76; 2006.
74. Yoshioka, T.; Mishima, H.; Kaul, Z.; Ohyabu, Y.; Sakai, S.; Ochiai, N.; Kaul, S. C.; Wadhwa, R.; Uemura, T. Fate of bone marrow mesenchymal stem cells following the allogeneic transplantation of cartilaginous aggregates into osteochondral defects of rabbits. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5:437-443; 2011.
75. Zafranskaya, M. M.; Nizheharodova, D. B.; Yurkevich, M. Y.; Lamouskaya, N. V.; Motuzova, Y. M.; Bagatka, S. S.; Ivanchik, H. I.; Fedulov, A. S. In vitro assessment of mesenchymal stem cells immunosuppressive potential in multiple sclerosis patients. *Immunol. Lett.* 149:9-18; 2013.
76. Zhang, Y.; Khan, D.; Delling, J.; Tobiasch, E. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *Scientific World J.* 79:3823; 2012.

## 第 8 章 謝辞

本論文作成にあたりご指導、ご高閲賜りました、大根田修教授に心から感謝申し上げます。また、筑波大学大学院での研究の機会を与えてくださった細胞科学研究所の佐藤威会長、並びに本研究についてご指導いただいた伊藤丈洋社長、ご助言、ご協力いただいた産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門細胞増殖制御研究グループ Renu Wadhwa グループ長に改めて深謝いたします。さらに本研究に多大なご協力をいただいた産業技術研究所バイオメディカル研究部門 Kaul Sunil 研究員、Ran Gao 研究員、筑波大学心臓血管外科の佐藤藤夫先生、整形外科の菅谷久先生、細胞科学研究所の北村友紀子氏、筑波大学再生幹細胞生物学、高崎真美助教、山下年晴助教並びに研究室メンバーにお礼申し上げます。