

有機 - 無機ナノハイブリッド技術を用いた ヒト骨髄細胞のための温度応答性培養皿の開発

育成研究：JSTイノベーションプラザ広島 平成21年度採択課題
「肝硬変・肝不全に有用な骨髄由来 Nano-induced Stem Cell (Nano-ISC) 分離培養技術の臨床開発」

代表研究者：山口大学大学院医学系研究科 消化器病態内科学
教授 坂井田 功



■ 研究概要

我々の肝硬変症に対する「自己骨髄細胞投与療法 (ABM / 療法)」の有効性は多施設共同研究を含めて確認されたが、全身麻酔下に骨髄液を採取する必要がある。そこで局所麻酔下に採取した少量の骨髄液から肝硬変改善効果のある細胞分画を培養して投与する「肝修復再生療法」を実現するため、ヒト骨髄細胞が効率的に増殖し温度変化のみで回収可能となる有機 - 無機ナノハイブリッド培養皿を開発した。

■ 研究内容、研究成果

これまで我々は、非代償性肝硬変症に対して「自己骨髄細胞投与療法 (ABM / 療法)」を多施設臨床研究として行い、その有効性及び安全性を明らかにしてきたが、全身麻酔下に骨髄液を採取するため適応には制限がある。そこで局所麻酔で採取した少量の骨髄液から肝修復再生効果のある細胞を培養増殖し再投与する「低侵襲的な肝再生修復療法」の開発を進めており、これまで培養ヒト骨髄間葉系マーカー陽性細胞投与が免疫不全肝硬変モデルマウスの肝線維化及び肝機能を改善させることを報告している。そこで、有機 - 無機・ナノハイブリッドシステムによりヒト骨髄単核球細胞から間葉系マーカー陽性細胞を効率的に増殖させる培養皿の開発を行った。

配合組成の異なる有機 - 無機ナノコンポジット材料をコーティングした40種類の培養皿を開発し、それぞれにマウス骨髄単核細胞を播種し通常培養により生着細胞数で性能スクリーニングを行った。マウスモデル系で評価の高かった組成は、さらに市販ヒト骨髄単核球細胞 (ロンザジャパン; 2M-125A) を $2.0 \times 10^6 / 3.8 \text{cm}^2$ で播種し再評価した。結果、Nano40N7 組成では、ヒト骨髄単核球細胞の培養効率は有意に良好で、94%以上が CD73/CD105 陽性かつ CD11b/CD45 陰性細胞であり、トリプシン処理なしに低温変化だけで培養細胞は剥離回収された。また Nano40N7 培養細胞の骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能も確認した。

従って、この開発した Nano40N7 培養皿を用いれば、少量のヒト骨髄液からでも効率的に多分化能を維持した間葉系マーカー陽性細胞を培養増殖させることができ、少ない細胞障害で剥離回収が可能である。以上のように、局所麻酔で採取した自己骨髄液から有機 - 無機・ナノハイブリッドシステムで培養した間葉系マーカー陽性細胞を投与する「低侵襲的な肝再生修復療法」の可能性が示唆された。

■ 今後の展開、将来の展望

開発した培養皿の産業化に向けて、すでに GLP 基準化等の取り組みを開始している。具体的には、細胞毒性に関する品質管理手法の検討、最適な滅菌法 (ガンマ線照射等) の検討、培養液中のコーティング基材溶出の有無の検討等を行い、最適手法および条件を確立する。このように GLP 基準化を先行させ、さらに製造工程の GMP 基準化を図ることにより、少量の自己骨髄液から本培養皿で培養したヒト骨髄間葉系細胞を投与する新たな肝修復再生療法の開発を進めていく。

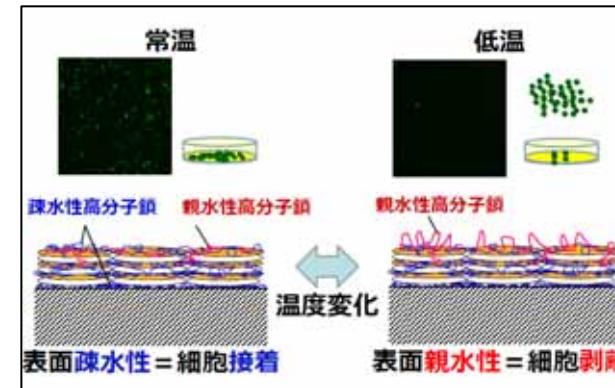


図1 有機-無機・ナノハイブリッド培養皿概念図
常温 (37℃) から低温に変化させると培養皿表面が疎水性から親水性へと変化し、トリプシン処理なしでも細胞が剥離する。

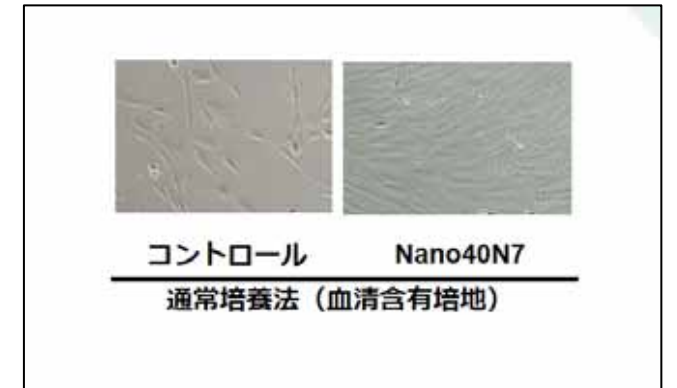


図2 Nano40N7 培養皿によるヒト骨髄単核球細胞の培養
市販ヒト骨髄単核球細胞を Nano40N7 培養皿で通常培養 (ウシ胎児血清含有培地) すると、有意に多くの生着細胞数が観察される。

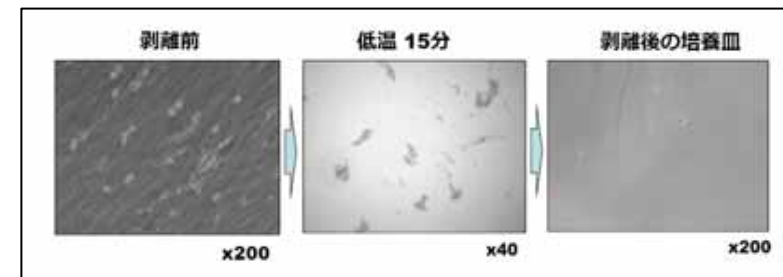


図3 温度応答性能による細胞回収
Nano40N7 培養皿で培養したヒト骨髄単核球細胞は低温への温度変化だけで生着細胞は培養液中へ剥離浮遊する。

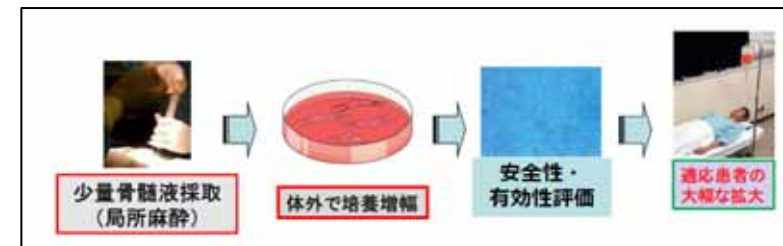


図4 有機-無機・ナノハイブリッド培養皿を用いた新たな肝修復再生療法
有機-無機・ナノハイブリッド培養皿を用いれば、少量の自己骨髄液からでもヒト骨髄間葉系細胞を効率的に培養することが可能である。

■ 研究体制

- ◆ 代表研究者
山口大学大学院医学系研究科 消化器病態内科学 教授 坂井田 功
- ◆ 研究者
寺井 崇二 (山口大学) 山本 直樹 (山口大学) 高見 太郎 (山口大学) 廣瀬 恵一 (山口大学) 原口 和敏 (川村理化学研究所) 武久 敢 (川村理化学研究所) 高田 哲生 (川村理化学研究所) 仁科 博史 (東京医科歯科大学) 加藤 幸夫 (広島大学) 小江 紘司 (DIC) 西江 晴男 (DIC) 安武 幹智 (旭化成クラレメディカル) 岩元 潮 (旭化成クラレメディカル)
- ◆ 共同研究機関
東京医科歯科大学、広島大学、一般財団法人川村理化学研究所
株式会社 DIC、株式会社旭化成クラレメディカル

■ 研究期間

平成21年4月 ~ 平成23年3月