

真空加圧含浸法を用いた 細胞含有コラーゲン材料の作製と脂肪再生機能解析

所属：信州大学繊維学部応用生物科学科

助成対象者：根岸 淳

共同研究者：

概要

真空加圧含浸法を用いて脂肪由来幹細胞を導入したコラーゲン材料の脂肪組織再生について、細胞試験及び動物試験で評価した。従来法と比較して、真空加圧含浸法により高効率にコラーゲン多孔質材料へ脂肪由来幹細胞を導入可能なことが明らかにされた。また、脂肪由来幹細胞含有コラーゲン材料の脂肪細胞分化誘導試験により、真空加圧含浸法で導入した脂肪由来幹細胞が材料内で脂肪細胞に分化可能なことが明らかにされた。さらに、ラット皮下埋植試験において、細胞含有コラーゲン材料内部に細胞がとどまり、組織再生が促進される可能性が示唆された。

以上から、脂肪由来幹細胞含有コラーゲン材料による脂肪組織再生の応用可能性が見い出された。

abstract

The adipose tissue regeneration of the collagen material into which adipose-derived stem cells were introduced using the vacuum pressure impregnation (VPI) method was evaluated by a cell test and an animal test. Compared with the conventional method, it was revealed that the cells can be introduced into the collagen porous material with higher efficiency by the VPI method. In addition, an adipocyte differentiation induction test of the cells-containing collagen material revealed that the cells introduced by VPI can differentiate into adipocytes in the material.

Furthermore, in a rat subcutaneous implantation test, it was suggested that cells might stay inside the cell-containing collagen material and tissue regeneration could be promoted.

From the above, it has been found that adipose tissue regeneration can be applied by a collagen material containing adipose-derived stem cells.

研究内容

【背景】

細胞医療技術の向上により、心筋梗塞や角膜損傷の治療法として細胞シート移植が実施可能になり、細胞を用いた組織再生が実現しつつある。しかし、細胞のみの移植では、厚みのある組織の再生は困難であり、細胞の足場となる材料と細胞との併用が検討されている。連通孔を有する多孔質材料は、生体内・生体外での材料内部への細胞浸潤が可能であり、大規模欠損の治療に有用だと考えられている。現在、多孔質材料への細胞播種と細胞含有溶液のゲル化を用いて細胞含有材料が作製されているが、播種は細胞遊走に時間が必要なことや細胞懸濁液が浸透しにくい素材には細胞導入できないことが問題であり、細胞含有溶液のゲル化は細胞が生存可能な条件でゲル化可能な素材にしか適用できないことが課題である。

報告者らの研究グループは、真空下で材料と溶液を接触させ、その後加圧することで溶液を材料に浸透させる真空加圧含浸法の生体材料への応用を検討し¹⁾、多孔質材料への線維芽細胞導入に真空加圧含浸法が有用であることを見出している。

本研究では、真空加圧含浸法を用いて脂肪由来幹細胞を導入した細胞含有コラーゲン材料を作製、脂肪組織再生材料としての応用可能性を明らかにする。

【目的】

脂肪由来幹細胞含有コラーゲン材料による脂肪組織再生の基盤確立に向けて、以下の項目を本研究の目的とした。

1. 脂肪由来幹細胞の多孔質材料への導入法としての真空加圧含浸法の有用性解明
2. 脂肪由来幹細胞含有コラーゲン材料の生体外での脂肪細胞分化誘導
3. 脂肪由来幹細胞含有コラーゲン材料の生体内挙動の解明

【結果】

1. 真空加圧含浸処理のラット脂肪由来幹細胞への影響評価

細胞導入に使用する真空加圧処理（真空処理＋加圧処理）のラット脂肪由来幹細胞（rat adipose derived stem cell: rADSC）機能への影響解析として、rADSC 懸濁液に真空加圧含浸処理、真空処理、加圧処理を行い、一定期間培養後の生細胞数を評価した。

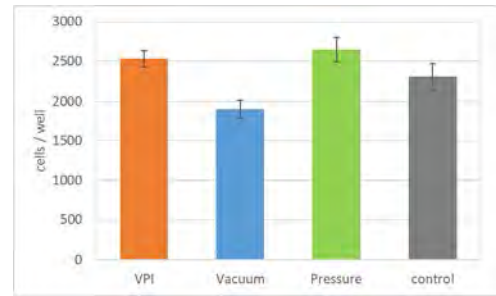


図 1. 各処理後の細胞数

各処理を行った rADSC の生細胞数は、コントロール（未処理群）と同等であった（図 1）。この結果から、真空加圧含浸処理は、rADSC の接着や生存に影響を与えないことが明らかとなり、多孔質材料への rADSC 導入法として真空加圧含浸処理が利用可能だと考えられた。

懸濁液への真空処理では細胞が溶液中に分散しているため、細胞の脱水が生じず、真空処理により生細胞数が減少しなかったと推察される。また、本研究で使用した静水圧印加条件は、細胞破壊が起きる静水圧よりも低いため、加圧処理による細胞死がほとんどなかったと考えられる。

2. コラーゲン材料への rADSC 導入

コラーゲン材料（Koken）に真空加圧含浸処理を用いて rADSC を導入、材料内部の細胞数を DNA 定量により評価した。

コントロール（播種群）と比較して、真空処理、加圧処理、真空加圧処理で有意に DNA 量が多いことが認められた。ま

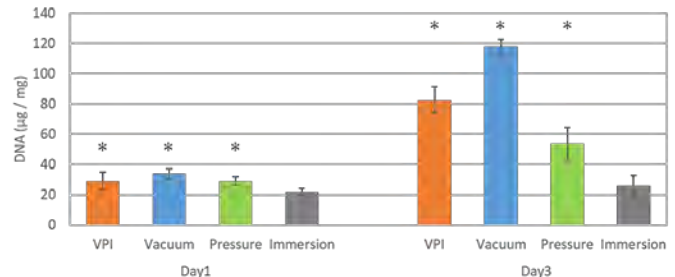


図 2. 材料の DNA 量 (P<0.05)

た、Day1 から Day3 にかけて各材料の DNA 量が増加していることが明らかとなった（図 2）。真空加圧含浸処理によりコラーゲン材料の rADSC 導入が可能であり、また、導入された rADSC が材料内部で増殖可能なことが示された。

細胞播種後のコラーゲン材料の重量は、その他の群と比較して有意に低く、結果として材料内部の細胞数が少なくなったと考えられ、材料内部の空気による溶液浸透阻害が細胞数が少ない原因だと推察される。一方、真空処理、真空加圧処理では材料内部に空気が存在しないため、溶液が材料内部まで浸透し、DNA 量が多くなったと考えられる。

3. rADSC 含有コラーゲン材料の脂肪細胞分化試験

rADSC を導入したコラーゲン材料を脂肪細胞分化培地で培養し、脂肪細胞分化マーカーとして C/EBPα (NM_012524) と Leptin (NM_013076) を使用し、ハウスキーピング遺伝子としては 28S rRNA (V01270) を使用して PCR で評価した²⁾。

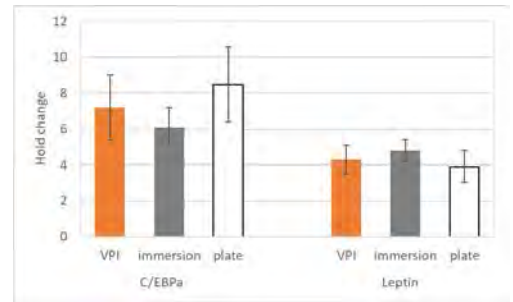


図 3. 遺伝子発現

培養 14 日目において、真空加圧含浸群と播種群ともにプレート培養群と同等の遺伝子発現が認められた (図 3)。この結果から、真空加圧含浸法で導入された脂肪由来幹細胞が脂肪細胞に分化可能であることが示された。

4. rADSC 含有コラーゲン材料のラット皮下埋植試験

細胞含有コラーゲン材料の生体内挙動評価として、ラット皮下埋植試験を行った。

埋植 14 日目の組織学的染色評価において、コラーゲン材料の端部には細胞が認められ、材料中央部には細胞が認められなかった。一方、rADSC 含有コラーゲン材料では、端部と中央部ともに細胞

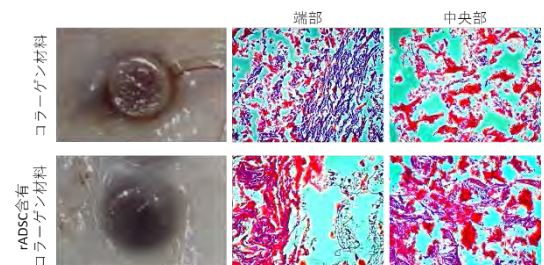


図 4. 移植 14 日目の HE 染色

が認められ、コラーゲン材料以外の細胞外マトリックスが観察された。以上から、rADSC 含有により、細胞浸潤や組織再生が促進された可能性が示唆された。コラーゲン材料内部の rADSC が直接またはレシピエント細胞の遊走を促進したことで、組織再生が早期に生じたと推察される。

【今後】

本研究により、脂肪由来幹細胞のコラーゲン材料への導入に真空加圧含浸法が利用可能なこと、細胞含有コラーゲン材料の脂肪組織再生への応用可能性が明らかになった。組織再生には、対象組織に適した細胞種と足場材料の組合せの選択が重要であり、種々の多孔質材料に細胞導入可能な真空加圧含浸法が有用であると考えられ、軟骨や骨などの組織再生への応用展開を検討する。また、細胞機能解析や材料の特性解析、薬剤候補物質のスクリーニングなどに 3 次元培養が利用されている。生体外で生体内環境を模倣した培養環境を提供することが 3 次元培養では重要であり、本研究で取り組んだ多孔質材料への細胞導

入、細胞含有多孔質材料の培養が応用可能であり、新たな細胞機能や材料機能の知見獲得に取り組む予定である。

最後に、住友電工グループ社会貢献基金により本研究を推進することができ、心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Negishi, Jun, et al. Tissue Engineering Part C: Methods. 2014.
- 2) Venugopal, Balu, et al. J Mater Sci Mater Med. 2017.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

該当なし

[口頭発表]

- 1) 信州大学新技術説明会、多孔質材料に細胞を封入した組織再生材料、2019年8月
- 2) BioJapan 2019 World Business Forum、組織再生に向けた生体材料と細胞含有材料の開発、2019年10月

[ポスター発表]

- 1) BioJapan 2019 World Business Forum、組織再生に向けた生体材料と細胞含有材料の開発、2019年10月

[その他]

該当なし