

脱細胞化骨髄を用いた人工造血システムの構築

Formulation of Artificial Hematopoiesis System using Decellularized Bone Marrow

○ 中村奈緒子 (東医歯大 生材研) 橋本良秀 (東医歯大 生材研)
 船本誠一 (東医歯大 生材研) 南広祐 (東医歯大 生材研) 木村剛 (東医歯大 生材研)
 藤里俊哉 (阪工大 工) 岩田博夫 (京大 再生研) 岸田晶夫 (東医歯大 生材研)

Naoko NAKAMURA¹, Yoshihide HASHIMOTO¹, Seiichi FUNAMOTO¹,
 Kwangwoo NAM¹, Tsuyoshi KIMURA¹, Toshiya FUJISATO², Hiroo IWATA³, Akio KISHIDA¹
 1 Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
 2 Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology
 3 Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

Abstract: The function of the hematopoietic stem cells (HSCs) is known to be maintained in the hematopoietic stem cell niche. In the hematopoietic stem cell niche, it is also well known that the proliferation and differentiation of HSCs are regulated by biological substances secreted from various supporting cells. On the other hand, the role of the structural factor such as 3-D structure, surface elasticity and surface roughness of the niche are not fully understood. In order to regenerate the hematopoietic functions, the understanding and the regeneration method of hematopoietic stem cell niche are indispensable. In this study, we attempted to construct the artificial niche by using decellularized bone marrow and mesenchymal stem cells (MSCs). MSC is one of the supporting cells and decellularized bone marrow is expected to provide the 3-D structural template of the artificial niche. Here, we investigate the construction of the artificial niche in vitro.

Key Words: Decellularization, Bone Marrow, Hematopoietic Stem Cell, Niche

1. 緒言

白血病や悪性リンパ腫などの治療法である抗癌剤の大量投与や放射線治療時の骨髄抑制(白血球、赤血球、血小板の減少)に対する二次的治療、および再生不良性貧血に対する一次的治療法として造血幹細胞移植が行われている。移植した造血幹細胞は骨髄内に存在するニッチ(niche)と呼ばれる微小環境に生着するが、その微小環境が造血幹細胞の機能に大きく影響することが近年わかってきている⁽¹⁾。造血ニッチは造血支持細胞と細胞外マトリックス(ECM)で構成されている。骨髄内で支持細胞が分泌する物質が造血幹細胞の自己複製や分化を制御していると言われていたが、三次元構造や表面特性など、造血ニッチの構造因子についてはまだ明らかになっていない。ニッチを人工的に構築することが可能となれば、生体外での血液産生、造血幹細胞移植への利用、白血病の制御機構の解明などの造血幹細胞研究へ貢献できる。そこで、人工的に造血を導く培養システムの開発を目的とし、その中心要素である造血巣の構築を目指す。本研究では、人工造血システムの細胞の足場となる細胞培養担体の三次元空間的因子を探索するため、界面活性剤処理法^(2,3)および高静水圧処理法^(4,5)によって生体組織から細胞を除去した脱細胞化骨髄と、多孔体構造を有するハイドロキシアパタイト/ β -TCP複合体、超高分子量ポリエチレン多孔体を用いた。三次元構造や表面特性などの三次元空間因子がニッチを構築する細胞へどのように影響するのかを明らかにすることを目的とし、支持細胞の一つと考えられているヒト間葉系幹細胞を用いて、細胞培養実験を行った。それぞれについて細胞接着能を組織学的評価で、細胞分化能を遺伝子発現解析によって評価し、脱細胞化骨髄を用いた造血システムの構築について検討を行った。

2. 実験方法

2-1 脱細胞化骨の作製

ブタ肋骨の海綿骨部を直径8 mm、厚さ3 mmに成形した。界面活性剤法に関しては、これまでに心臓や血管にて脱細胞化が報告されている TritonX-100を用いた方法⁽⁴⁾と SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)を用いた方法⁽⁵⁾の2種を応用した。高静水圧処理法に関しては、高静水圧印加装置を用い、10℃、10,000気圧の高静水圧印加を10分間行い、細胞を破壊した。その後、DNase含有生理食塩水に浸漬し、振盪洗浄を37℃、無菌環境下で4週間行い、細胞残渣を除去した。その後、80%アルコール溶液に浸漬し、振盪脱脂した。調整した脱細胞化骨髄は、ヘマトキシリン-エオジン染色、走査型電子顕微鏡観察、および Picogreen による DNA 定量にて脱細胞化を評価した。

2-2 細胞培養

得られた脱細胞化骨髄、多孔体構造を有するハイドロキシアパタイト/ β -TCP複合体、および超高分子量ポリエチレン多孔体にヒト間葉系幹細胞(5×10^5 cells)を播種した。培地には10% Fetal bovine serum、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin 含有 Dulbecco's modified essential medium (DMEM)を用いた。播種後1日目にアルカリフォスファターゼ染色およびヘマトキシリン-エオジン染色にて、細胞接着性を評価した。細胞播種後3日目に培地を分化誘導培地に切り替え、分化誘導を行った。また、6日目および10日目にリアルタイム RT-PCRにて遺伝子は右舷解析を行った。発現解析は内在性コントロールとして GAPDH を用い、骨芽マーカーである Alkaline Phosphatase、RUNX2、Osteopontin、脂肪マーカーである FABP4 の5種類の遺伝子を標的とした。それぞれのプライマー配列を Table. 1 に示す。

Table.1 Primer Sequences for RT-PCR

Gene	Primer Sequences (5'-3')
GAPDH	AGCCGCATCTTCTTTTTCGCTC TCATATTTGGCAGGTTTTTCT
ALP	TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC
RUNX2	CAGTTCCTCAAGCATTTTCATCC TCAATATGGTCGCCAAACAG
Osteopontin	CTAGGCATCACCTGTGCCATACC CAGTGACCAGTTCATCAGATTCATC
FABP4	TGGTTGATTTTCCATCCCAT TACTGGCCAGGAATTTGAC

3. 結果と考察

界面活性剤処理法および高静水圧処理法にて脱細胞化骨髄を調製した。未処理骨および脱細胞化骨髄のヘマトキシリン-エオジン染色の結果を Fig.1(A, B, C, D)に示す。未処理骨では骨梁、骨髄部にて多数の細胞核が観察された。一方、脱細胞化骨髄に関しては、SDS 処理および高静水圧処理の脱細胞化骨髄にて、細胞核の完全な除去が確認された。TritonX-100 処理では、細胞核の数は大幅に減少したものの、完全には除去できなかった。また、細胞の除去に成功した SDS 処理および高静水圧処理の両者を比較すると、SDS 処理では海綿骨中の細網組織を含む骨髄が細胞と同時に除去されていたのに対し、高静水圧処理では細網組織の残存が確認された。残存 DNA 定量では、SDS 処理および高静水圧処理による脱細胞化骨髄では検出限界値まで減少しており、組織学的評価の結果と一致していた。これらの結果は、脱細胞化骨髄の調製が可能であることを示している。

脱細胞化が確認された SDS 処理および高静水圧処理による脱細胞化骨髄、多孔体構造を有するハイドロキシアパタイト/ β -TCP 複合体、および超高分子量ポリエチレン多孔体にヒト間葉系幹細胞 (5×10^5 cells) を播種した。アルカリフォスファターゼ活性染色にて細胞接着を評価した結果を Fig.2(A, B, C, D)に示す。SDS 処理および高静水圧処理による脱細胞化骨髄、ハイドロキシアパタイト/ β -TCP 複合体はよく染色されており、細胞が多数接着していることが確認された。一方、超高分子量ポリエチレンには、わずかに

しか細胞が観察されなかった。また、ヘマトキシリン-エオジン染色にて、SDS 処理による脱細胞化骨髄には骨梁表面に細胞接着が観察されたのに対し、高静水圧処理による脱細胞化骨髄では、骨梁表面だけでなく、骨髄である細網組織中に細胞の分布が確認された。以上より、SDS 処理および高静水圧処理による脱細胞化骨髄、ハイドロキシアパタイト/ β -TCP 複合体は細胞接着性に優れており、培養担体としての可能性が示された。遺伝子発現解析の結果、二次元培養のコントロールとして用いた TCPS と比較して、基礎培地で培養をした場合、培養担体を用いた三次元培養では発現の傾向が異なることが示された。また、分化誘導を行った場合、基礎培地の場合と比べて、発現傾向の違いは小さくなるものの、発現量に差が確認された。以上より、SDS 処理および高静水圧処理による脱細胞化骨髄、ハイドロキシアパタイト/ β -TCP 複合体が有する三次元構造や表面特性などの三次元空間的因子が、細胞の分化能に影響を与え、培養担体として機能することが示唆された。

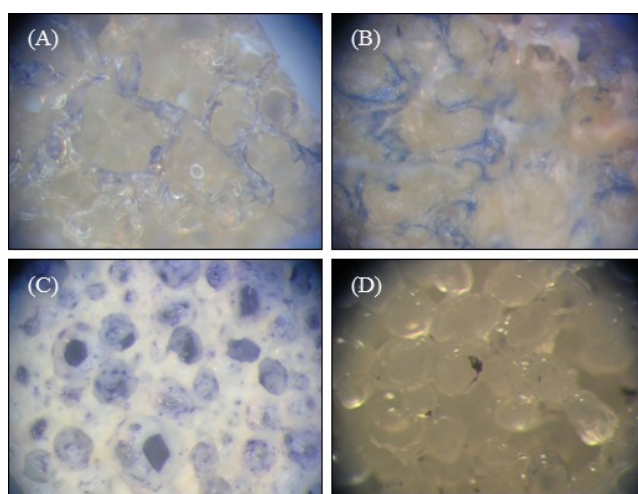


Fig. 2 Photographic images of hMSCs stained by Alkaline Phosphatase staining. (A): Decellularized bone marrow treated by SDS, (B): Decellularized bone marrow treated by HHP, (C): Ceramic composite scaffold that contains hydroxyapatite and β -tricalciumphosphate, (D): Polyethylene sponge.

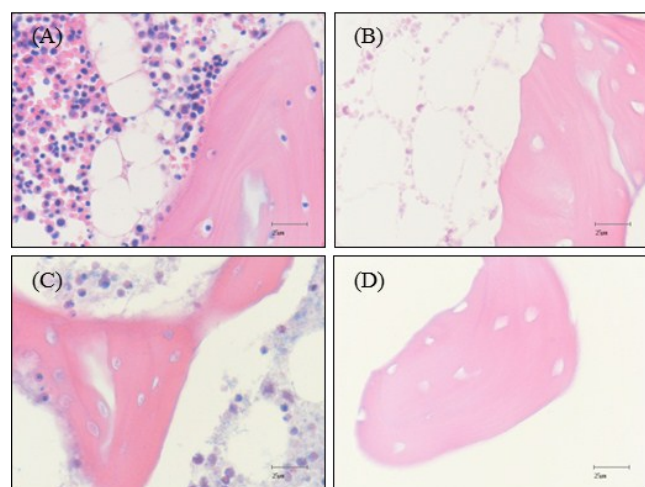


Fig. 1 Histological images of bone marrow. (A): Native bone marrow, (B): Decellularized bone marrow treated by HHP, (C): Decellularized bone marrow treated by TritonX-100, (D): Decellularized bone marrow treated by SDS.

参考文献

- (1) Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, vol.6, no. 2, pp. 93–106, 2006.
- (2) Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. Tissue engineering of heart valves – human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg*, vol. 14, pp. 279–84, 1998.
- (3) Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, et al. Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Valve Dis*, vol. 14, pp. 228–37, 2005.
- (4) Hashimoto H, Funamoto S, Sasaki S, et al. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials*, vol. 31, pp. 3941–48, 2010.
- (5) Funamoto S, Nam K, Kimura T, et al. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularized blood vessels. *Biomaterials*, vol. 31, pp. 3590–95, 2010.