

講座名 再生医療・細胞治療研究  
代表者 特任准教授 常 徳華  
構成員 大学院生 朱 燦基  
研究員 申屠 雲超  
研究員 小林 正樹  
研究員 木田 克彦  
研究補佐員 梶原 紀子

### 【 講座概要 】

再生医療・細胞治療研究講座は高分子培養基材を用いた三次元ヒト臍帯由来間葉系幹細胞 (UCMSCs) の大量培養と UCMSCs に関する画像診断の開発などを推進する目的として、令和 3 年 4 月に設置されました。

間葉系幹細胞 (MSCs) とは生体内に存在する体性幹細胞の一つで、中胚葉に由来する組織で、骨、軟骨、心筋細胞などに多分化能をもつ細胞であり、骨髄や脂肪、臍帯など様々な組織から採取することが可能となります。MSCs は細胞増殖促進効果、抗炎症効果、血管新生促進効果などを持つサイトカイン・増殖因子を分泌し、パラクラインを介して組織の修復を支持することも明らかにされています。

MSCs の培養においては、通常、平面二次元培養 (2D) と三次元培養 (3D) の 2 種類に分類され、2D 培養より 3D 培養の方が細胞の自然な形状が保たれており、細胞間の結合も広く見られ、細胞間のコミュニケーションが可能となります。3D 培養することにより、細胞の凝集塊を形成して、より生体内に近い培養環境である三次元的な状態で細胞を増殖し、間葉系幹細胞の特徴を維持しながら細胞の機能を高めることが可能となります。

また、MSCs を用いた創薬研究や、細胞治療などにおけるその再現性、信頼性、安全性と有効性を担保するために、細胞品質評価が必要となってきます。MSCs はマーカーとして CD105, CD73, CD90 などを持っていると定義されていますが、これらのマーカーが発現していても増殖する細胞かどうかなどの品質の良さは判断できないため、MSCs の品質評価法が重要であります。その為、細胞画像診断技術 (ニコン株式会社) を用い、UCMSCs の 3D 大量培養中の細胞品質評価を行います。

### 【 研究内容 】

高分子培養基材 Cellhesion® (日産化学株式会社) で培養した MSCs は、従来の 2D 培養された細胞に比べ約 7 倍の抗炎症作用を示しており、様々な疾患の治療への応用が期待されています。令和 4 年度の本研究では Cellhesion を用いた 3D と 2D 培養 UCMSCs の特徴と機能について比較し、検討しました。また、細胞品質評価については、位相差顕微鏡で撮影された 3D と 2D 培養 UCMSCs の画像解析を行いました。

実験の結果として、3D 培養した UCMSCs は間葉系幹細胞の特徴である骨、軟骨、脂肪への分化能が保たれており、細胞表面マーカーとして CD73、CD90、CD105 が陽性、CD11b、CD19、HLA-DR

が陰性であることが確認されました。3D 培養することにより、細胞の凝集塊を形成し、より生体内に近い培養環境である三次元的な状態で細胞が増殖していることも走査性電子顕微鏡 (SEM) で観察されました。2D 培養に比べ 3D 培養では細胞の増殖が高まり、培養を開始して 4 日後にピークとなりました。UCMSCs より分泌された血管分泌因子 HGF、VEGF、IL-6、IL-8 についてはその量が増加していることが明らかとなりました。血管新生については、invitro 管腔形成試験で、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、培地中に血管新生促進物質である VEGF などが含まれた培養上清を加えたことにより血管新生が観察されました。2D 培養に比べ 3D 培養では血管新生の管腔面積、総延長および分枝点数が多く見られました。

細胞品質評価については、位相差顕微鏡では基材と細胞の境界線が明確にならないため、観察が難しかったのですが、三次元培養した後に、基材と細胞を分離させ、画像診断技術を用いた所、2D 培養に比べ 3D 培養では細胞数が多く、コンフルエントの割合が高く見られました。

### 【 今後の展望 】

3D培養した間葉系幹細胞は、間葉系幹細胞の未分化能・遊走能が保たれており、2D培養では得られない大量かつ高い細胞活性が見られることから、再生医療・細胞治療などへ応用することが期待されます。

### 【令和4年度活動実績】

#### <論文・著書>

##### 英文論文

1. Shuang Gao, Yongqiang Jin, Jianlin Ma, Juan Wang, Jing Wang, Zehua Shao, Taibing Fan, Mingkui Zhang & **Dehua Chang\***. Preclinical study of human umbilical cord mesenchymal stem cell sheets for the recovery of ischemic heart tissue. *Stem Cell Res Ther.* 2022, 13: 252.
2. Juan Wang, Shuang Gao, Yufei Zhao, Taibing Fan, Mingkui Zhang, and **Dehua Chang\***. Manufacture and quality control of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell sheets for clinical use. *Cells* 2022, 11, 2732
3. Nanbo Liu, Shuoji Zhu, Yuzhi Deng, Ming Xie, Mingyi Zhao, Tucheng Sun, Changjing Yu, Ying Zhong, Rui Guo, Keluo Cheng, **Dehua Chang\***, Pingzhu. Construction of multifunctional hydrogel with metal-polyphenol capsules for infected full-thickness skin wound healing. *Bioactive Materials* 24 (2023) 69-80
4. **Dehua Chang\***, Xiaotong Yang, Siyang Fan, Taibing Fan, Mingkui Zhang, Minoru Ono. Engineering of MSCs sheet for the prevention of myocardial ischemia and for left ventricle remodeling. *Stem Cell Research & Therapy* March 30, 2023. Accepted

#### <学会・講演会発表>

## 国内学会

1. 常德華、木田克彦、小林正樹、堀川雅人、王威、朱燦基、小野稔. 高分子を用いた三次元培養による間葉系幹細胞の特徴と機能について検. 第 22 回日本再生医療学会総会（京都）0-17-5.
2. 木田克彦、金木達朗、畑中大輔、岩上昌史、阿武志保、小野稔、Dehua Chang. 浮遊懸濁培養基材 Cellhesion を用いたヒト間葉系幹細胞の性質に関する解析. 第 22 回日本再生医療学会総会（京都）0-32-5.

## 国際学会

1. Dehua Chang. ヒト臍帯由来間葉系幹細胞シート重症心不全治療臨床前研究. Guangzhou Academy of Medical Sciences Strategy & Development Symposium. 2022 年 7 月 28 日-8 月 6 日 Guangzhou China
2. Dehua Chang, Shuoji Zhu, Minoru Ono. Effect Of Two-Dimensional and Three-Dimensional Culture Microenvironments on Human Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cell. TERMIS 2023 Annual Conference & Exhibition. April 11-14, 2023, Boston USA