

グルコースポリマー透析液の生体適合性研究と
間葉系幹細胞の分化・増殖制御技術の開発

平成 18 年 度

三重大学大学院工学研究科
博士前期課程 分子素材工学専攻

前 田 尚 悟

平成 18 年度 修士論文

グルコースポリマー透析液の生体適合性研究と
間葉系幹細胞の分化・増殖制御技術の開発

**Investigation of biocompatible in glucose polymer dialysate solution
and
Development of control technology for mesenchymal stem cell
differentiation and proliferation**



三重大学大学院工学研究科 博士前期課程

分子素材工学専攻

前田 尚悟

第1部. グルコースポリマー透析液の生体適合性研究

1. 緒言	1
1-1. 腎臓の機能と腎不全	2
1-2. 腹膜透析(CAPD)	3
1-3. グルコースポリマー透析液	4
1-4. D-グルコース透析液	4
2. 目的	6
3. 方法	7
3-1. 中皮細胞同定(免疫組織化学法)	7
3-2. 細胞活性の測定(MTT 試験)	7
3-3. 細胞増殖能の測定(BrdU 試験)	7
3-4. 細胞障害性の測定(LDH 試験)	7
3-5. 細胞周期の測定(frow cytometry 解析)	8
3-5-1. 透析液の影響による細胞周期の変化	8
3-5-2. グルコースポリマーの影響による細胞周期の変化	8
3-6. 細胞死の測定(frow cytometry 解析)	8
4. 結果	9
4-1. 中皮細胞の同定結果(免疫組織化学法)	9
4-2. 細胞活性の測定結果(MTT 試験)	10
4-3. 細胞増殖能の測定結果(BrdU 試験)	12
4-4. 細胞障害性の測定結果(LDH 試験)	13
4-5. 細胞周期の測定結果(frow cytometry 解析)	14
4-5-1. 透析液の影響による細胞周期の測定結果	14
4-5-2. グルコースポリマーの影響による細胞周期の測定結果	15
4-6. 細胞死の測定結果(frow cytometry 解析)	16
5. 考察	19
6. 結論	24

第2部. 間葉系幹細胞の分化・増殖制御技術の開発

1. 緒言	25
1-1. 胚性肝細胞と体性幹細胞	25
1-2. 骨髄幹細胞	27
1-2-1. 造血幹細胞 (hematopoietic stem cell)	27
1-2-2. 間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell)	28
1-2-3. 中胚葉系幹細胞 (mesodermal stem cell)	29
1-3. 間葉系幹細胞の分化	29
1-3-1. 軟骨細胞 (chondrocytic cell)	30
1-3-2. 骨芽細胞 (osteoblastic cell)	32
1-3-3. 脂肪細胞 (adipose cell)	35
1-3-4. 骨格筋細胞 (skeletal muscle cell)	36
1-3-5. 靭帯細胞 (ligament cell)	37
1-4. 特殊細胞培養法	37
1-4-1. 三次元細胞培養	37
1-4-2. 微小重力条件細胞培養	38
1-5. 細胞外マトリックス (ECM)	40
1-5-1. エラスチン (Elastin)	41
1-5-2. コラーゲン (Collagen)	42
2. 目的	43
3. 方法	44
3-1. 間葉系幹細胞同定 (flow cytometry 解析)	44
3-2. 間葉系幹細胞の骨細胞分化誘導実験	44
3-3. ゲルコート上細胞培養実験	45
4. 結果	46
4-1. 間葉系幹細胞の同定結果 (flow cytometry 解析)	51
4-2. 間葉系幹細胞の骨細胞分化誘導実験結果	56
4-3. ゲルコート上細胞培養実験結果	57
5. 考察	58
6. 結論	63

7. 参考文献	64
8. 謝辞	70
9. Appendix	71
9-1. 各種溶液の調整	
9-2. 初代培養	
9-3. 継代培養	
9-4. 細胞凍結・解凍方法	
9-5. MTT 試験(細胞活性解析)	
9-6. BrdU 試験(細胞増殖解析)	
9-7. LDH 試験(細胞障害性解析)	
9-8. flow cytometry 解析	
9-9. ゲル濾過クロマトグラフィー	
9-10. 酵素染色	
9-11. 免疫化学染色	
9-12. コーティング法	
9-13. コラーゲン・ゲル培養法	

語句説明

- AC : [adenylate cyclase]アデニル酸シクラーゼ
- AGE : [Advanced glycation end-products]糖化終末物質
- Akt : 生存シグナル伝達因子
- ALP : [alkaline phosphatase]リン酸化合物分解酵素
- AML-1 : [Acute Myeloid Leukemia-1]胎仔期の造血に関連する転写因子
- APC : [[adenomatous polyposis coli]癌抑制遺伝子
- ATP : [adenosine triphosphate]アデノシン三リン酸
- Axin : [Axis inhibition protein]Wnt シグナル負の制御因子
- bFGF : [basic fibroblast growth factor]塩基性繊維芽細胞増殖因子
- BMP-2 : [bone morphogenetic protein-2]骨形成因子
- BrdU : [5-bromo-2'-deoxy-uridine] ブロモデオキシウリジン
- BSP : [bone sialoprotein]骨シアロタンパク質
- CaM : [calmodulin]カルモジュリン(カルシウム・イオン応答タンパク)
- cAMP : [cyclic adenosine monophosphate]サイクリックアデノシン一リン酸
- CaN : [calcineurin]カルシニューリン(酵素)
- CAPD : [continuous ambulatory peritoneal dialysis]
持続的携帯型腹膜透析
- CBP : [CREB binding protein]転写コアクチベーター
- cerberus : 細胞外における Wnt シグナルの抑制因子
- C/EBP : [CCAAT/enhancer-binding protein]脂肪生成転写因子
- c-myb : 骨髄球系の分化促進関連転写因子
- C-Myc : STAT3 標的転写因子
- Col2A1 : コラーゲン II 型の α -1 鎖を指令する遺伝子
- CRE : [cAMP responsive element]cAMP 応答配列
- CREB : [cAMP responsive element binding protein]
CRE 配列に結合する転写因子
- Csx : [cardiac-specific homeobox]心筋分化調節因子
- DAG : [diacylglycerol]ジアシルグリセロール
- 3-DG : [3-deoxyglucosone]3-デオキシグルコソン
- DKK : [Dickkopf]Wnt、LRP、Fz の相互作用に対する阻害因子
- Dlx5 : 骨細胞分化に関連する遺伝子
- DMEM : [Dulbecco's Modified Eagle's Medium]間葉系幹細胞培養培地
- DMSO : [dimethyl sulfoxide]ジメチルスルホキシド
- DTT : [Dithiothreitol]ジチオスレイトール

- Dsh : [Dishevelled] β カテニンのリン酸化抑制関連細胞質因子
- ECM : [extracellular matrix]細胞外マトリックス
- EGF : [epidermal growth factor]上皮増殖因子
- EKLF : [Erythroid Krüppel-like factor]赤血球の分化関連転写因子
- ERK : [extracellular signal regulated protein kinase]
細胞外シグナル制御キナーゼ
- ES 細胞 : [embryonic stem cell]胚性幹細胞
- FACS : [fluorescence activated cell sorting]flow cytometry(FCM)
- FAK : [focal adhesion kinase]接着斑キナーゼ
- FBS : [Fetal Bovine Serum]ウシ胎仔血清
- FGF-2 : [fibroblast growth factor-2]繊維芽細胞増殖因子
- FKBP : [FK506- binding proteins]免疫抑制剤 FK506 結合蛋白質
- FRP : [Frizzled-related protein]細胞外 Wnt シグナル阻害因子
- Fz : [Frizzled]7 回膜貫通型受容体(Wnt シグナル経路)
- F-12 : [Dulbecco's Modified Eagle's Mixture F-12 HAM]
繊維芽細胞培養培地
- GATA3 : [GATA binding protein3]T 細胞への分化関連転写因子
- GATA4 : GATA をコンセンサス配列にもつ心筋分化関連転写因子
- GDF : [growth differentiation factor]増殖分化因子
- GDP : [glucose degradation products]グルコース分解産物
- GDP : [guanosine diphosphate]グアノシン二リン酸
- GFP : [green fluorescent protein]緑色蛍光タンパク質
- GSK-3 β : [glycogen synthase kinase-3 β]グリコーゲン合成の活性化酵素
- GTP : [guanosine triphosphate]グアノシン三リン酸
- HC : [Hydrocortisone]ヒドロコルチゾン
- HMC : [human mesenchymal stem cells]ヒト間葉系幹細胞
- 5-HMF : [5-hydroxymethylfurfural]5-ヒドロキシメチルフルフラール
- HNF-3 β : [Hepatocyte Nuclear Factor-3 β]肝細胞核因子
- HPMC : [human peritoneal mesothelial cells]ヒト腹膜中皮細胞
- Id : [inhibitor of differentiation]分化抑制因子
- IGF : [Insulin-like Growth Factor]インスリン様成長因子
- IGF-R : [Insulin-like Growth Factor reseptor]
インスリン様成長因子受容体
- IKK : [I κ B kinase]I κ B キナーゼ
- I κ B : [Inhibitor of NF- κ] NF- κ B 阻害因子

•PI(3,4,5)P3	: [phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate] ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸
•PI(4,5)P2	: [phosphatidylinositol 3,4-diphosphate] ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸
•PKA	: [protein kinase A]CREB リン酸化キナーゼ
•PKC	: [protein kinase C]Ca ²⁺ 、リン脂質依存プロテインキナーゼ
•PLC	: [phospholipase C]ホスホリパーゼ C(酵素)
•PPAR γ	: [peroxisome proliferator-activator receptor- γ 2] 脂肪細胞分化関連転写因子
•PS	: [Penicillin Streptomycin]ペニシリン・ストレプトマイシン
•PU.1	: 単球・B 細胞の分化関連転写因子
•p38	: SAPK の MAP キナーゼ
•p50	: NF- κ B の二量体を構成
•P300	: 転写コアクチベーター
•Raf	: [Ras substrate of C3]MEK キナーゼ (MAPKKK)
•Ras	: Raf(MAPKKK)活性化因子
•RelA	: NF- κ B の二量体を構成 (p65)
•RNase	: [ribonuclease]RNA 鎖の分解酵素
•Runx2	: [runt-related transcription factor 2]骨芽細胞分化関連転写因子
•RXR	: [retinoid X receptor]レチノイド X 受容体
•SAPK	: [stress-activated protein kinase]ストレス応答 MAP キナーゼ
•SCL	: [stem cell leukaemia]造血幹細胞発現の遺伝子
•SH2/3	: [Src homology 2/3]リン酸化チロシンとの結合ドメイン
•Smad	: 細胞外からのシグナルを核内に伝達する遺伝子調節タンパク
•SMAP	: [smooth muscle activating protein]平滑筋活性化蛋白質
•Sos	: Ras アクチベーター
•Sox9	: [SRY-related HMG [high-mobility group] box9] 軟骨細胞分化関連転写因子
•Src	: 非受容体型チロシンキナーゼ
•SSRE	: [Shear Stress Responsive Element]ずり応力応答配列
•STAT3	: [signal transducer and activator of transcription]チロシン型受容体からのシグナルを核内に伝達する遺伝子調節タンパク
•ST2	: 骨髄由来ストローマ細胞
•S473	: Akt を構成する HM ドメインのリン酸化部位 (Ser473)
•TAB1	: [TAK1 binding kinase 1]TAK1(MAPKKK)活性化因子
•TAK1	: [TGF- β -activated kinase 1]SAPK の MAPKKK

- Tal : [talín]テーリン(タリン)
- TCF/LEF : [T-cell-specific factor/lymphoid enhancer binding factor]
DNA 結合性転写活性化因子
- TeM : [Tenomodulin]II 型膜貫通型タンパク質
- TGF β : [transforming growth factor- β]形質転換増殖因子
- TNF- α : [tumor necrosis factor- α]腫瘍壊死因子
- T308 : Akt を構成するキナーゼドメインのリン酸化部位 (Thr308)
- Vinc : [vinculin]ビンキュリン
- WIF : [Wnt-inhibitory factor]細胞外での Wnt シグナル阻害因子
- Wnt : 発生・形態形成関連シグナル伝達関連因子

第 1 部

グルコースポリマー透析液の生体適合性研究

1. 緒言

毎年、増加している末期の腎不全患者に対する対症療法である透析療法には、血液透析と腹膜透析の2種類がある。全世界の末期腎不全患者170万人の内、透析患者は約8割(130万人)を占める。そして、世界中の透析患者130万人のうちの約9割が血液透析の治療を受けているのに対して、腹膜透析を受けているのはわずか1割にすぎない。本邦では全世界の透析患者の約2割を占め、その中で腹膜透析患者は5%のみである¹⁾。血液の溶質組成の改善、体液除去に対する1日あたりの効率に大きな差はないが、腹膜透析は持続的に行われるため、血液中の溶質や体液量の変化も緩やかであり、水分除去による循環器系への負担が軽減される。また、在宅治療が可能でありかつ機械に拘束されないことから社会復帰の可能性の高さが評価されている^{2,3)}。社会全体の高齢化に伴い、医療経済やQuality of Life(生活の質)の向上が問われるこれからの透析医療において血液透析と相補しあう対症医療としての重要な位置を占めるものと思われる。透析患者数の年次推移を図1-1Aに示した。



図1-1A. 透析患者数の年次推移⁴⁾

1-1. 腎臓の機能と腎不全

腎臓は主に以下のような働きをしている⁵⁾。

- ①体内に溜まった代謝産物や老廃物を尿として体外に排出。
- ②体内の水分量を尿の量によって調整。
- ③体液中のナトリウム、カリウム、カルシウムなどの電解質濃度を調整。
- ④血液の酸塩基平衡を維持。
- ⑤エリスロポエチンを産出。

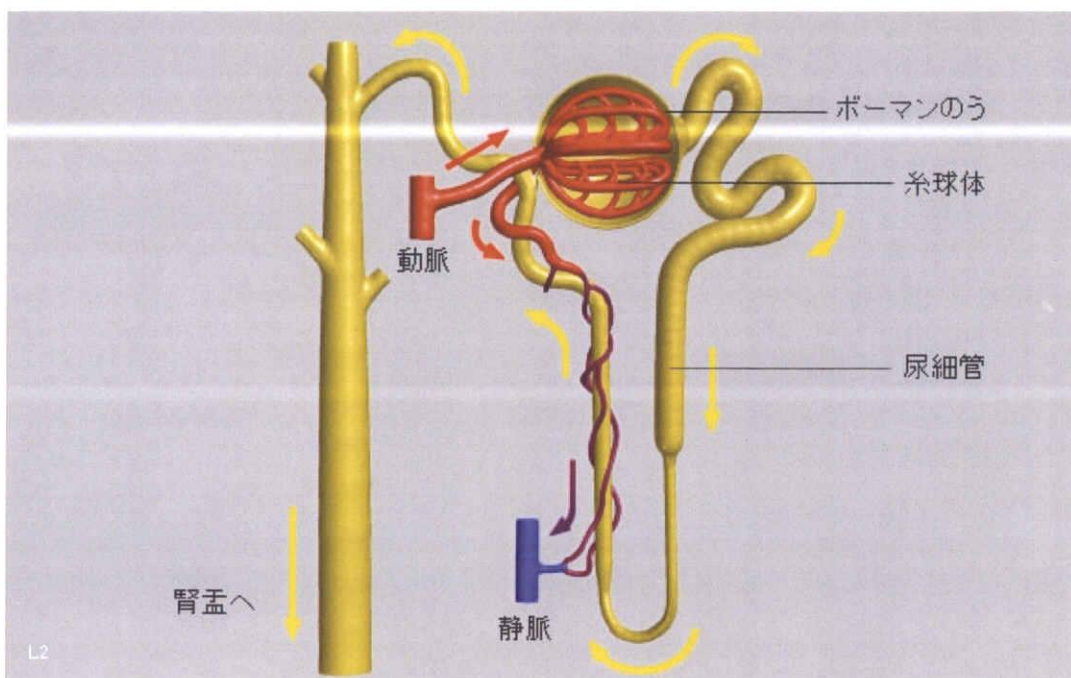


図 1-2A. 腎臓の構造⁶⁾

腎機能が低下すると尿毒症症状を呈し、さらに症状が悪化すると脳症を引き起こす。また、血液中のカリウムが上昇すると高カリウム血症となり、心臓に不整脈が生じ、重篤な場合は心停止を起こす。尿の量が減少すると循環血液量が上昇し、心臓に負荷がかかり、肺に水分が貯留し呼吸困難を起こす。いずれの場合も、そのまま放置すると、死に至る。

腎不全の治療としては腎臓移植が最良の治療法の一つであるが、ドナー臓器不足の問題から、移植療法は普及していない。

1-2. 腹膜透析(CAPD)

透析の種類には大きく分けて、ダイアライザーを用いる血液透析と、自分自身の腹膜を用いる腹膜透析とに分類できる。どちらの療法も拡散と限外濾過という原理には変わらない。血液透析は、ダイアライザーの中で血液と透析液が拡散と限外濾過を行う。一方、腹膜透析でダイアライザーの膜に該当するのは、毛細血管内皮および毛細血管基底膜と粗結合組織により成り立つ⁵⁾。

<腹膜透析>

腹膜とは小腸、大腸、肝臓などの臓器の周囲を被っている薄い膜で、腹腔という袋を形成している。腹腔内に透析液を注入し、一定時間貯留している間に腹膜を介して血液中の不要な老廃物は透析液中の濃度との濃度勾配に従って移動する。血液中の過剰な水分は透析液と体液との間に生じる浸透圧によって移動する。腹膜透析は、腹膜が半透膜として機能すると想定した血液浄化法で、透析液中に含まれる浸透圧剤によって生じる浸透圧差を利用して体内の余分な水分や老廃物を除去する治療法である⁷⁻⁹⁾。特徴として、透析は24時間継続的に続けることができ、患者が自分で毎日の体重・血圧を管理でき、社会復帰に適していることが挙げられる。図1-3Aに透析の原理図を示した。

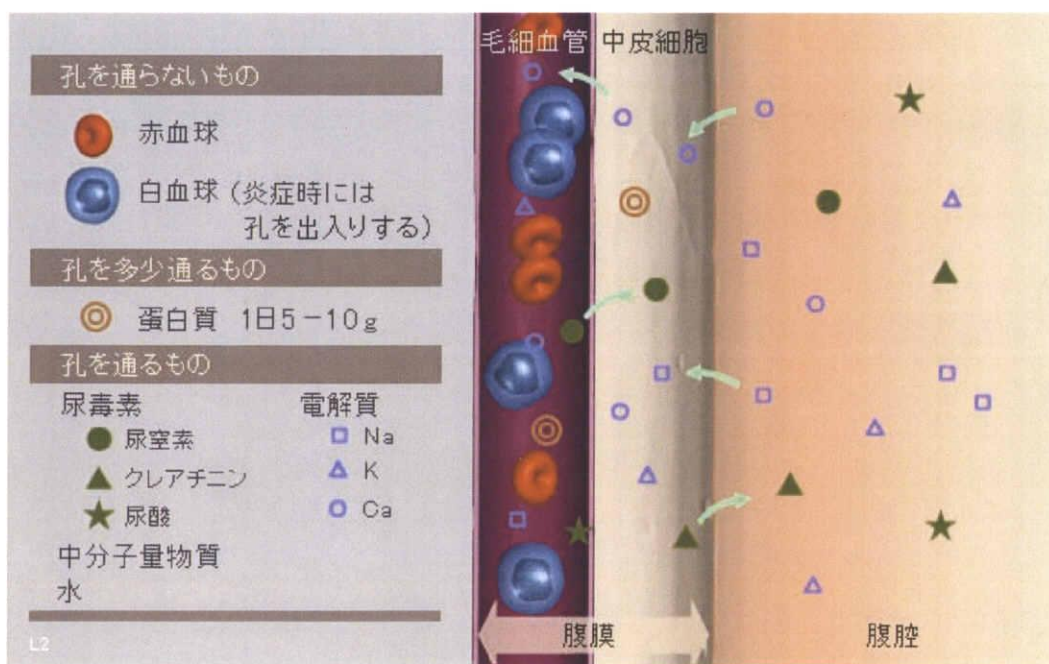


図1-3A. 腹膜透析の原理⁶⁾

1-3. グルコースポリマー透析液

グルコースポリマー透析液は 90 年代より開発が進み、米国 Baxter 社から Extraneal として市販されている。本邦では 2003 年に厚生省により使用許可された。原料はトウモロコシデンプンで、平均分子量 16000 Da の多糖である¹⁰⁾。この透析液はグルコースポリマーを 7.5% 含み、pH=5.0~5.7 で、総浸透圧は 282 mOsm/L である。含まれるその他電解質濃度は D-グルコース透析液とほぼ等しい。このグルコースポリマー透析液の特徴としては従来の D-グルコース透析液と比較し長時間貯留した際の高い除水効果が挙げられる¹¹⁻¹³⁾。これはグルコースポリマーの分子量が大きいため、膠質浸透圧物質として作用すると考えられるが、長時間に亘り浸透圧勾配を維持している明確な機序は未だはっきりとはわかっていない^{14,15)}。

グルコースポリマー透析液は長時間体内に貯留されるため、細胞に対して継続的な影響を与えてしまう。その結果、細胞核の肥大や多核化などの細胞障害発生の報告などもあり、安全面に対する早急な検討が必要とされる^{16,17)}。

《グルコースポリマーの構造》

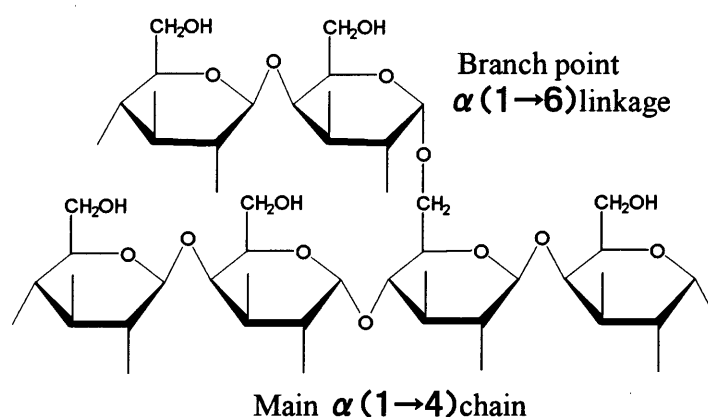


図 1-4A. グルコースポリマーの構造式^{10,22)}

1-4. D-グルコース透析液

従来の腹膜透析液は全て浸透圧物質として D-グルコースが使用されており、その他に電解質として塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウムを含む。しかし、D-グルコースは分子量 180 と小さく、透析液として使用した場合、腹腔から D-グルコースが急速に吸収されてしまい、持続的な限外濾過が得られない、更には数時間で除水量がマイナスになってしまうという問題点があり、そのため 1 日に何回ものパックの交換を要求され透析に費やす労力の点で患者の負担

を大きくしてしまう。そこで、1日の除水量が不足する場合は高濃度 D-グルコース含有腹膜透析液が処方されるが、この場合、長期的な使用により、肥満や高脂血症を起こしやすくするなどの代謝への影響や腹膜組織の糖化、さらには組織化、硬化を引き起こすと報告されている。更に D-グルコースは高圧蒸気滅菌の際に分解され、主に 3-DG (3-deoxyglucosone)や 5-HMF (5-hydroxymethylfurfural)といったグルコース分解産物 (glucose degradation products、以下 GDP)を産生する¹⁸⁾。これらの GDP は細胞傷害性があることが知られており、更に透析液中の D-グルコースや GDP は生体内で糖化反応によって種々の AGE(Advanced glycation end-products)を産出する。AGE の形成はタンパク質の性質における劇的な変化をもたらして生体に有害な影響を与えることが危惧されている¹⁹⁻²¹⁾。

D-グルコース透析液とグルコースポリマー透析液の除水量の違いについて図 1-5A に示した。

《透析液使用による除水量の推移》

2.27%D-グルコース、3.86%D-グルコース、7.5%グルコースポリマー透析液
2ℓ 使用した場合の除水量

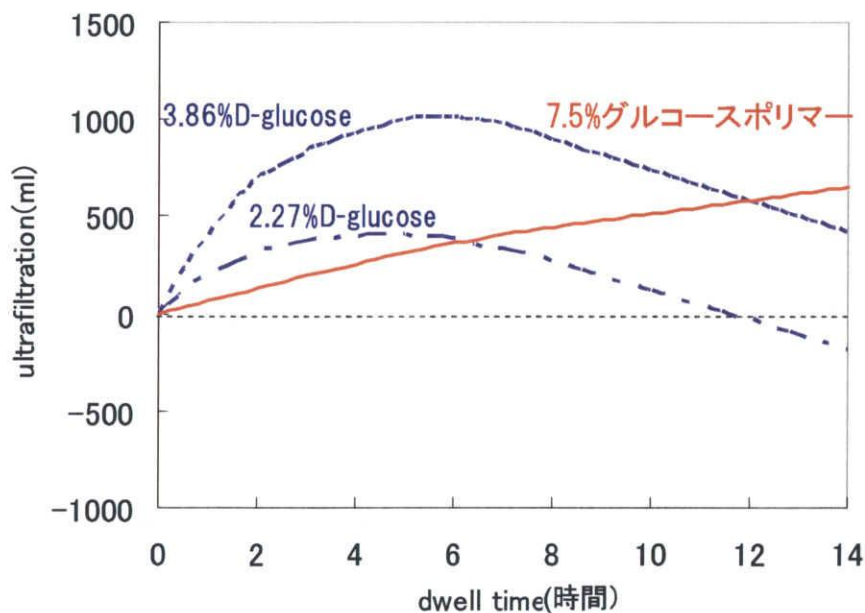


図 1-5A. 透析液の除水曲線²³⁾

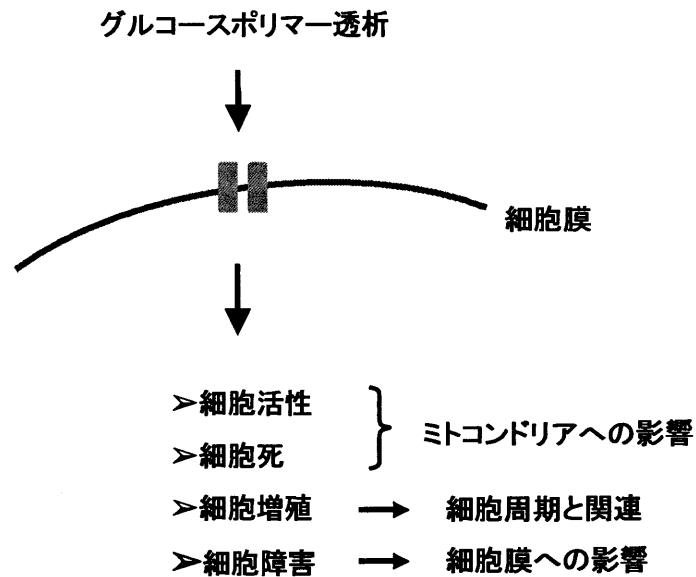
2. 目的

グルコースポリマー透析液の生体適合性の検証。

本研究では、従来の D-グルコース透析液とグルコースポリマー透析液を比較しながら、透析液が腹膜中皮細胞に与える影響を測定し、グルコースポリマー透析液の生体適合性を評価した。

具体的には、生体外において

- 細胞活性能
 - 細胞増殖能
 - 死細胞率
 - 細胞障害性
- の測定を行った。



3. 方法

3-1. 中皮細胞同定(免疫組織化学法)

体網組織とは腹腔臓器を腹側面から覆っている構造物であり、この組織からは中皮細胞と繊維芽細胞が採取できる。中皮細胞は Vimentin, Cytokeratin18, Desmin に陽性で、FactorVIII, α -smooth muscle actin に陰性であり、繊維芽細胞は Vimentin に陽性、Cytokeratin18, FactorVIII, α -smooth muscle actin, Desmin に陰性であることから、免疫組織化学法によって同定を行った。

(※免疫組織化学法の詳細については Appendix9-11 を参照)

3-2. 細胞活性の測定(MTT 試験)

MTT 試験は生存細胞数や細胞への毒性傷害効果を定量することができる簡便な測定法である。本研究では、生体外で培養した中皮細胞に対して透析液(D-グルコース、グルコースポリマー)と中皮細胞培養用培地 M199 を 10:0、8:2、6:4、4:6、2:8、0:10 の割合で調整した溶液を細胞に対してそれぞれ 30 分、3 時間、6 時間曝露したときの細胞活性の変化を測定した。

(※MTT 試験の詳細については Appendix9-5 を参照)

3-3. 細胞増殖能の測定(BrdU 試験)

BrdU は、細胞周期のS期で新たに合成される DNA 中に特異的に取り込まれるため、その取り込み量は細胞の増殖速度に比例する。本研究では、生体外で培養した中皮細胞に対して透析液(D-グルコース、グルコースポリマー)と中皮細胞培養用培地 M199 を 10:0、8:2、6:4、4:6、2:8、0:10 の割合で調整した溶液を細胞に対してそれぞれ 30 分、3 時間、6 時間曝露したときの細胞増殖能の変化を測定した。

(※BrdU 試験の詳細については Appendix9-6 を参照)

3-4. 細胞障害性の測定(LDH 試験)

LDH (lactate dehydrogenase: 乳酸脱水素酵素)は全ての哺乳類細胞に含まれる細胞質酵素である。通常 LDH は細胞膜を透過しないが、細胞膜がダメージを受けると、細胞膜の透過性が変化し、細胞外へLDHが漏出するため、LDHの漏出は細胞死や細胞膜ダメージと相関関係がある。本研究では、透析液(D-グルコース、グルコースポリマー)と中皮細胞培養用培地 M199 を 10:0、8:2、6:4、4:6、2:8、0:10 の割合で調整した溶液を細胞に対してそれぞれ 24 時間曝露したときの細胞障害性の変化を測定した。(※LDH 試験の詳細については Appendix9-7 を参照)

3-5. 細胞周期の測定(flow cytometry 解析)

細胞は増殖する過程において、細胞周期に従って増殖しており、それと共に細胞内の核に存在する DNA 量も増加する。よって、DNA 量を測定することでその細胞が細胞周期のどの状態にあるかを推測可能となる。本研究では、透析液(D-グルコース、グルコースポリマー)の影響による中皮細胞の細胞周期の変化を測定し、さらに平均分子量 16000 Da のグルコースポリマー中のどの分子量範囲が最も影響が強いのかを測定するために、グルコースポリマーを分子量で 5 分画し、それぞれについて細胞周期に与える影響を測定した。

(※flow cytometry 解析の詳細については Appendix9-8 を参照)

3-5-1. 透析液の影響による細胞周期の変化

透析液(D-グルコース、グルコースポリマー)を細胞に対してそれぞれ曝露したときの細胞周期の変化を flow cytometry を用いて測定した。細胞を培地で培養し、48 時間 growth-arrest した後に、透析液による 24 時間の曝露を行った。

3-5-2. グルコースポリマーの影響による細胞周期の変化

平均分子量 16000 Da のグルコースポリマーを分子量範囲によって 5 つに分画し、それぞれを浸透圧剤とする透析液で 24 時間曝露したときの細胞周期の変化を flow cytometry を用いて測定した。

まず、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、グルコースポリマー透析液中のグルコースポリマーとその他の電解質を分離した。その後、グルコースポリマーの画分分子量 1~5 をそれぞれ 15 g/L と、塩化ナトリウム 5.35 g/L、乳酸ナトリウム 4.48 g/L、塩化カルシウム 0.257 g/L、塩化マグネシウム 0.051 g/L を含む溶液を 5 ml ずつ調整し、分画分子量 1~5 を浸透圧剤とする透析液を作成した。(以下、分画溶液 1~5) (※グルコースポリマーの分子量分画の詳細は Appendix9-9 を参照)

3-6. 細胞死の測定(flow cytometry 解析)

アポトーシスは細胞死の一つの形態であり、透析液の影響によるアポトーシス細胞数の変化から細胞障害性を測定した。本研究では、中皮細胞に透析液(D-グルコース、グルコースポリマー)を 30 分、6、12、24、36、48 時間曝露したときのアポトーシス細胞数の変化量を細胞膜上のホスファチジルセリン量で示した。ホスファチジルセリンは通常細胞内に局在化しており、アポトーシスが起るときは細胞膜上に局在することが知られている。これを flow cytometry を用いて測定し、アポトーシス細胞の指標とした。(※flow cytometry 解析の詳細は Appendix9-8 を参照)

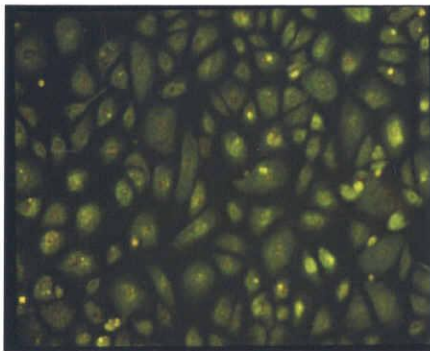
4. 結果

4-1. 中皮細胞の同定結果(免疫組織化学法)

体網組織から採取される中皮細胞と繊維芽細胞についての同定のための免疫化学染色の測定結果を以下に示した。

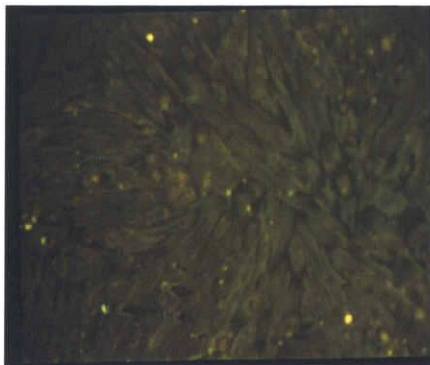
これらの結果から、本研究で使用した大網由来細胞が腹膜中皮細胞であることが同定できた。

《中皮細胞 anti-Human Desmin/FITC》



	mesothelial
cytokeratin18	+
FactorVIII	-
desmin	+
α -SMA	-
vimentin	+

《線維芽細胞 anti-Human Vimentin/FITC》



	fibroblast
cytokeratin18	-
FactorVIII	-
desmin	-
α -SMA	-
vimentin	+

図 4-1A. 中皮細胞、繊維芽細胞の同定

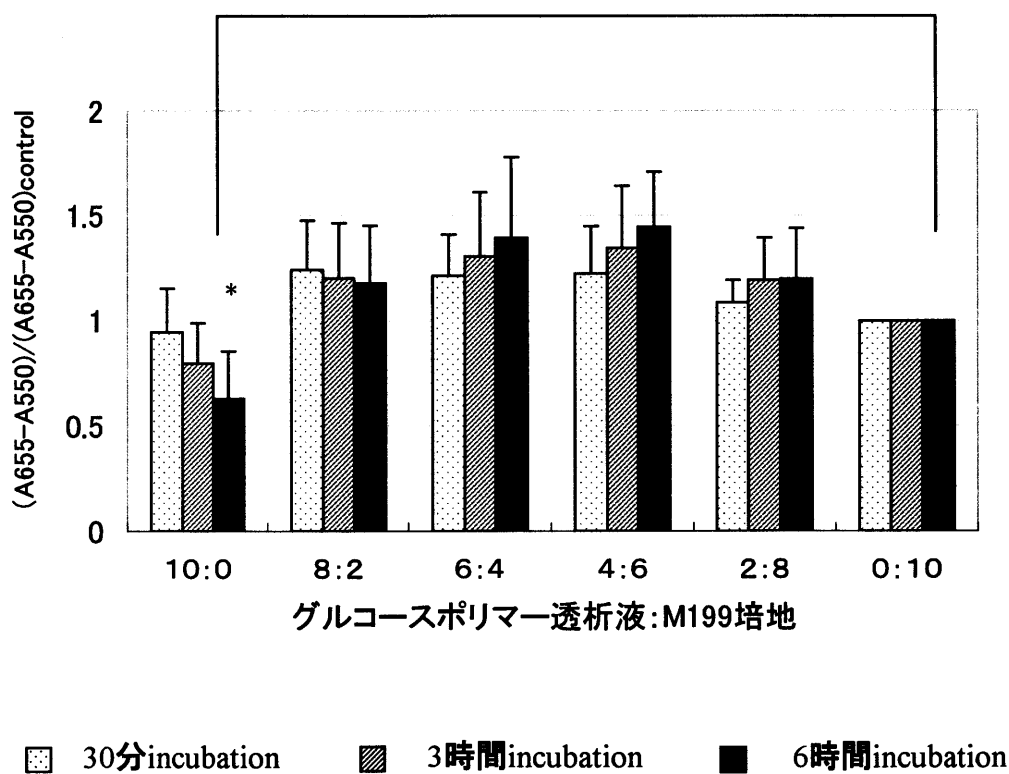
4-2. 細胞活性の測定結果(MTT 試験)

MTT 試験を用いた細胞活性の測定結果を以下に示した。
透析液(D-グルコース、グルコースポリマー)と中皮細胞培養用培地M199を10:0、8:2、6:4、4:6、2:8、0:10の割合で調整した溶液を細胞に対してそれぞれ30分、3時間、6時間曝露したときの細胞活性を測定した。

グラフの横軸は、透析液とM199培地の混合割合を示しており、縦軸はM199培地のみの影響(透析液:M199培地 = 0:10)のときの吸光度の値を1としたときの相対値として示した。

《グルコースポリマー透析液》

グルコースポリマー透析液を曝露した結果、コントロール(M199培地のみ)と比較して、細胞活性の増加が確認できた。

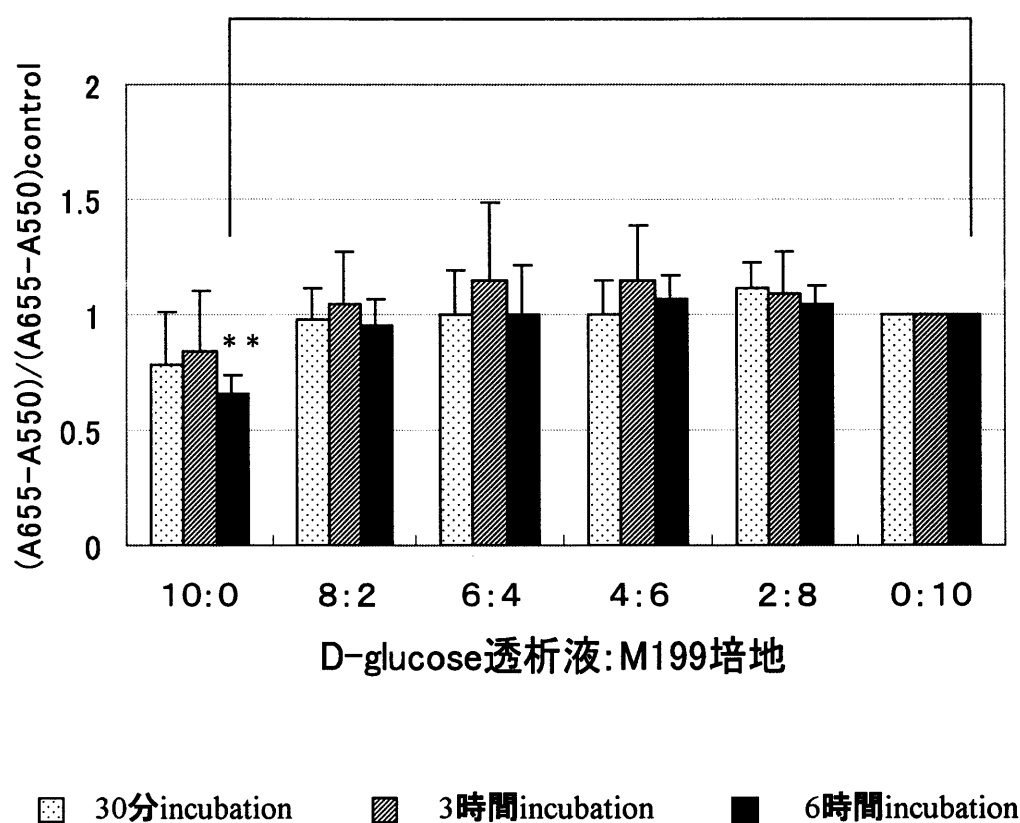


(* $P < 0.05$ vs.control)

図 4-2A. グルコースポリマー透析液の影響による細胞活性の変化

《D-グルコース透析液》

D-グルコース透析液を曝露した結果、コントロール(M199 培地のみ)と比較してほとんど変化がなく、細胞活性に影響しないことが確認できた。



(** $P < 0.01$ vs.control)

図 4-3A. D-グルコース透析液の影響による細胞活性の変化

4-3. 細胞増殖能の測定結果(BrdU 試験)

BrdU 試験を用いた細胞増殖能の測定結果を以下に示した。

透析液(D-グルコース、グルコースポリマー)と中皮細胞培養用培地M199を10:0、8:2、6:4、4:6、2:8、0:10の割合で調整した溶液を細胞に対してそれぞれ0.5、3、6時間曝露したときの細胞活性を測定した。

グラフの横軸は、透析液とM199培地の混合割合を示しており、縦軸はM199培地のみの影響(透析液:M199培地 = 0:10)のときの吸光度の値を1としたときの相対値として示した。

この結果から、グルコースポリマー透析液の影響によって細胞増殖能は抑制されることが確認できた。

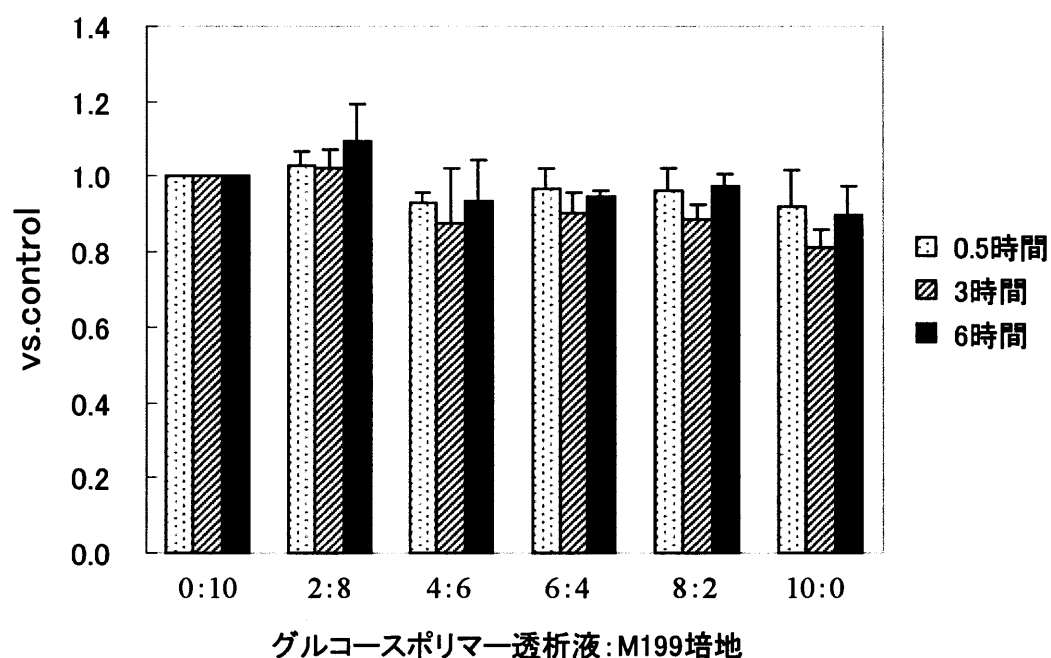


図 4-4A. グルコースポリマー透析液の影響による細胞増殖能の変化

4-4. 細胞障害性の測定結果(LDH 試験)

LDH 試験を用いた細胞障害性の測定結果を以下に示した。
透析液(D-グルコース、グルコースポリマー)と中皮細胞培養用培地 M199 を 10:0、8:2、6:4、4:6、2:8、0:10 の割合で調整した溶液を細胞に対してそれぞれ 24 時間曝露したときの細胞障害性を測定した。

グラフの横軸は、透析液と M199 培地の混合割合を示しており、縦軸は M199 培地のみの影響(透析液:M199 培地 = 0:10)のときの LDH 放出量を 100 としたときの相対値として示した。

この結果から、透析液が強く影響する程、D-グルコース透析液では LDH 放出量の増加が、グルコースポリマー透析液では LDH 放出量の減少傾向が確認できた。

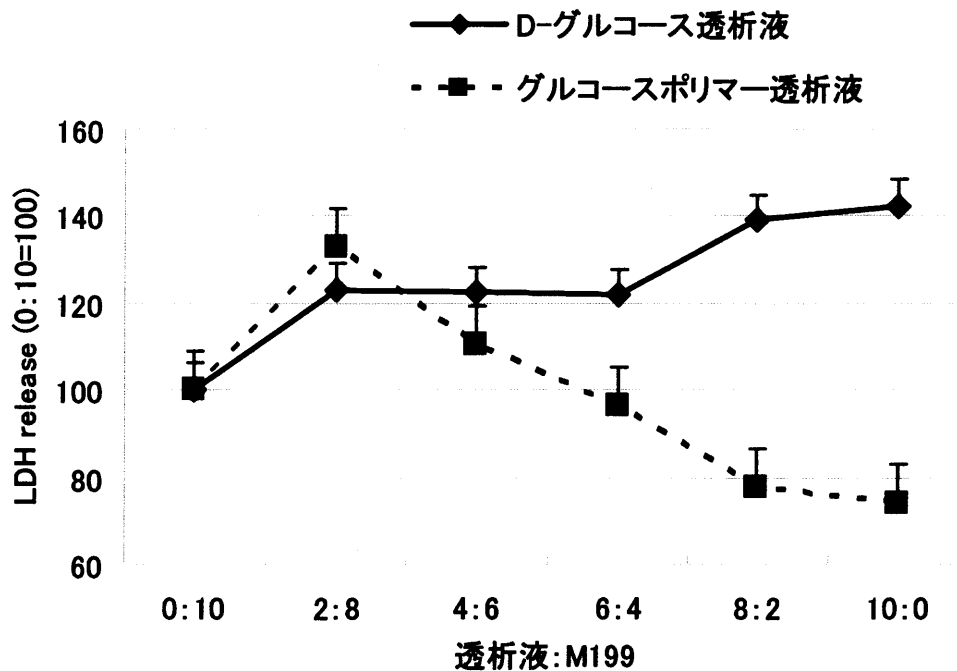


図 4-5A. 透析液の影響による LDH 放出量の変化

4-5. 細胞周期の測定結果(flow cytometry 解析)

flow cytometry 解析を用いた細胞周期の測定結果を以下に示した。測定は、透析液そのものの影響と、透析液中からグルコースポリマー(多糖)を分離し分子量で5分画した後、それぞれを浸透圧剤とする透析液を作成し、その分画分子量それぞれを含む透析液の影響を確認した。

4-5-1. 透析液の影響による細胞周期の測定結果

グルコースポリマー透析液、D-グルコース透析液、をそれぞれ腹膜中皮細胞に24時間曝露したときの細胞周期の変化を測定した。グラフの横軸はDNA含有量を蛍光強度として表しており、縦軸は細胞数(個)を示している。細胞は合計20000個測定した。コントロールとして、M199培地溶液で24時間培養したときの結果は、全細胞中の74.3%がG0/G1期に、9.74%がS期に、15.96%がG2/M期に含まれていた。

この結果から、特にグルコースポリマー透析液の影響によって、増殖期の細胞数が減少することが確認できた。

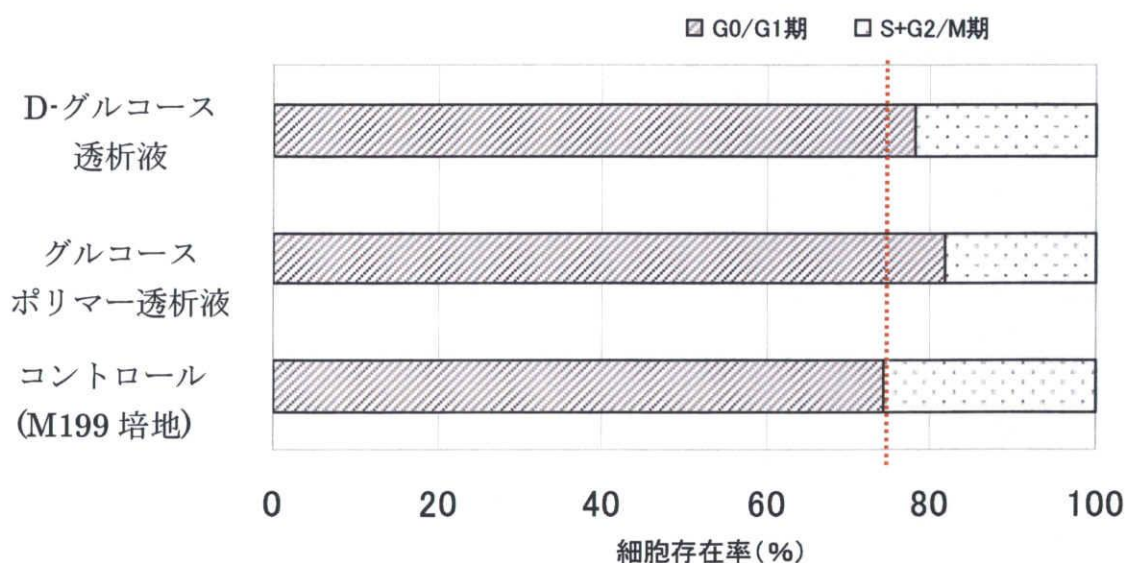


図 4-6A. 透析液の影響による増殖細胞存在率の変化

4-5-2. グルコースポリマーの影響による細胞周期の測定結果

中皮細胞に対して分画溶液 1~5 を 24 時間曝露したときの細胞周期の変化を測定した結果を以下に示した。

グラフの横軸は DNA 含有量を蛍光強度として表しており、縦軸は細胞数(個)を示している。細胞は合計 20000 個測定した。コントロールとして中皮細胞培養用培地である M199 溶液を用いたときは、全細胞中の 74.3% が G0/G1 期に、9.74% が S 期に、15.96% が G2/M 期に含まれていた。分画溶液 1~5 の全細胞中の細胞の割合はそれぞれ、以下のようになった。

1)分画溶液 1:80.17%が G0/G1 期、7.71%が S 期、12.12%が G2/M 期。

2)分画溶液 2:81.06%が G0/G1 期、6.93%が S 期、12.55%が G2/M 期。

3)分画溶液 3:78.65%が G0/G1 期、5.29%が S 期、16.06%が G2/M 期。

4)分画溶液 4:79.41%が G0/G1 期、4.34%が S 期、16.25%が G2/M 期。

5)分画溶液 5:85.90%が G0/G1 期、2.48%が S 期、11.62%が G2/M 期。

M199 培地に細胞増殖因子 PDGF を 50ng/ml 加えたときの結果は、66.9%が G0/G1 期、19.47%が S 期、13.62%が G2/M 期に存在しており、この値をポジティブコントロールとした。

この結果から、分画溶液 1~5 それぞれにおいて細胞増殖能を抑制させる傾向が確認された。特に、分画溶液 5 は増殖能抑制効果が大きかった。

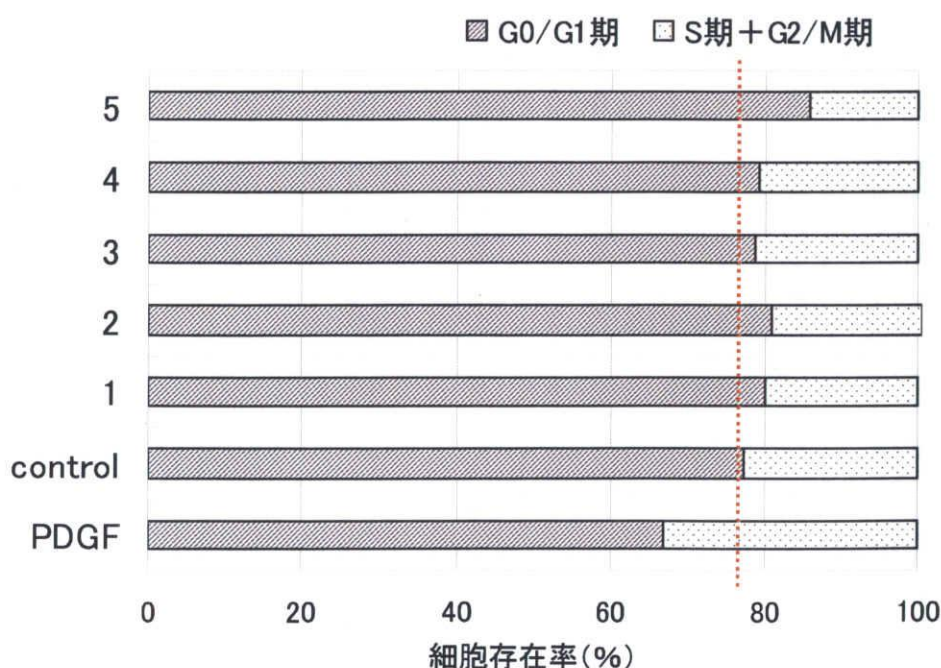


図 4-7A. 分画溶液 1~5 の影響による増殖細胞存在率の変化

4-6. 細胞死の測定 (flow cytometry 解析)

flow cytometry を用いたアポトーシスの測定結果を以下に示した。透析液 (D-グルコース、グルコースポリマー) を細胞に対してそれぞれ 30 分、0.5、6、12、24、36、48 時間曝露したときのアポトーシス細胞数を測定した。図 4-8A は以下の図 4-9A、4-10A から得られた結果をまとめたもので、グラフの横軸は曝露時間 (時間)、縦軸は細胞全体に対する死細胞の割合 (%) で示している。

また、図 4-9A、10A は D-グルコース、グルコースポリマー透析液それぞれの結果を示しており、グラフの横軸は細胞膜上のホスファチジルセリン量を、縦軸は死細胞数をそれぞれ蛍光強度として表している。つまり、グラフの左下にドット表示されている細胞集団は生細胞であり、右上にドット表示された細胞集団は死細胞を示している。細胞は計 10000 個を測定した。

この結果から、グルコースポリマー透析液で曝露した中皮細胞は D-グルコース透析液の場合と比べて、死細胞率が高いことが確認できた。

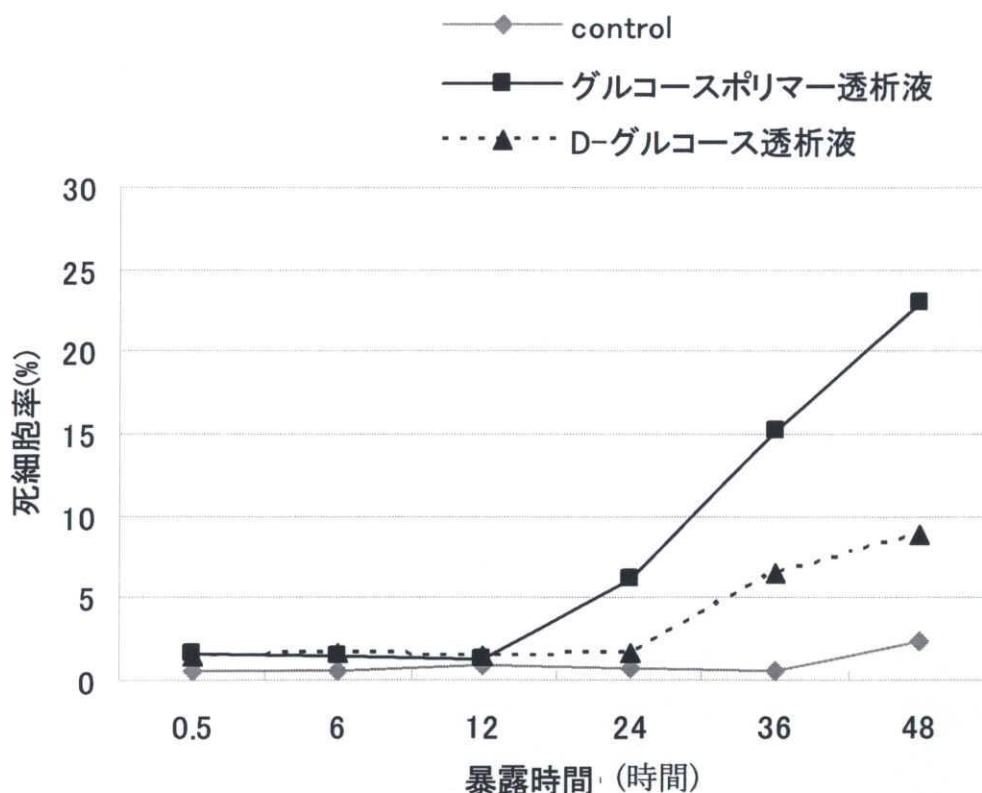
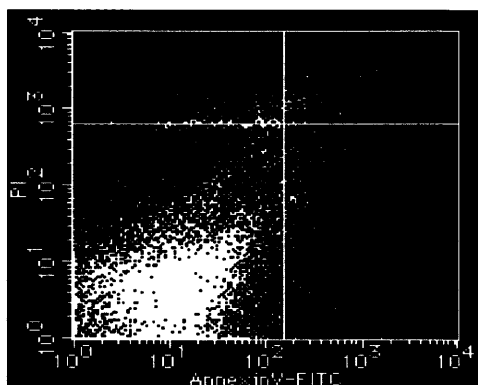


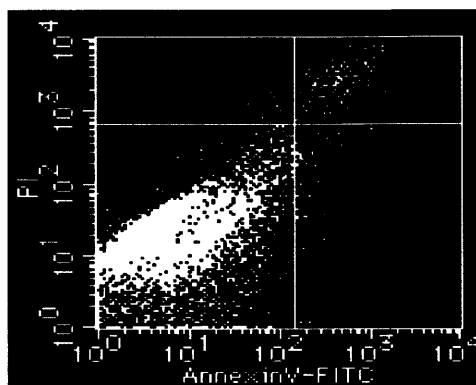
図 4-8A. 透析液の影響による死細胞率の変化

《D-グルコース透析液》

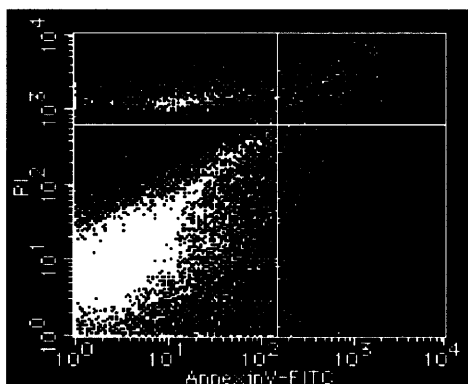
培養 30 分後



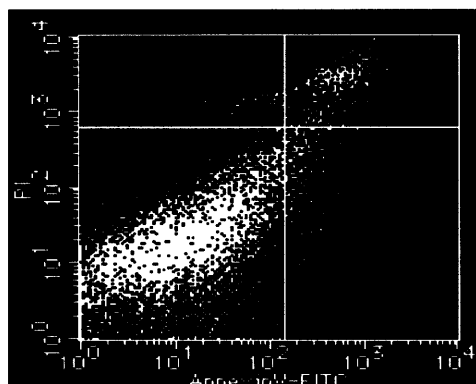
培養 24 時間後



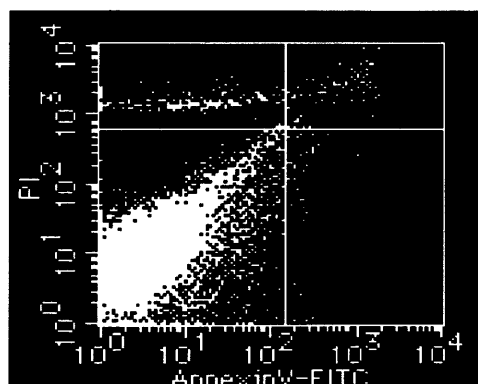
培養 6 時間後



培養 36 時間後



培養 12 時間後



培養 48 時間後

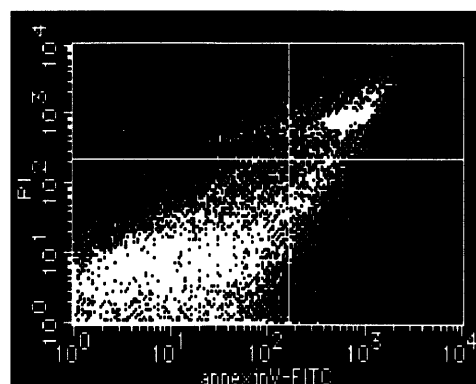
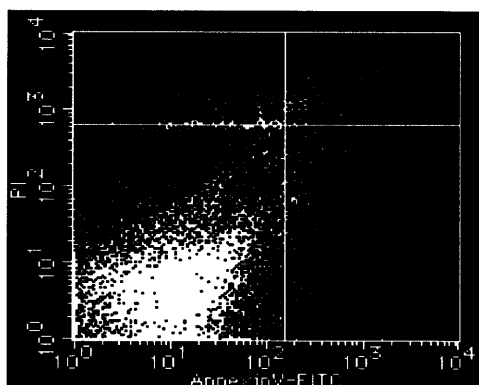


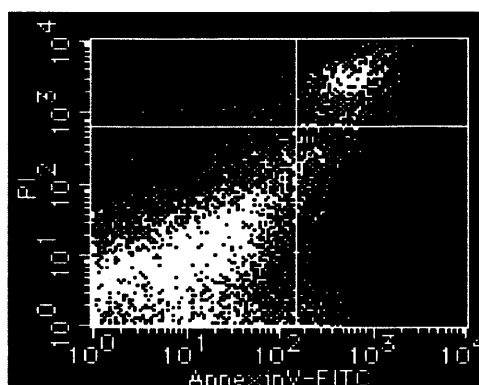
図 4-9A. D-グルコース透析液の影響による死細胞率の変化

《グルコースポリマー透析液》

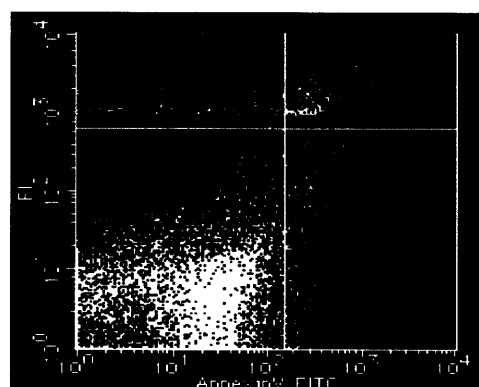
培養 30 分後



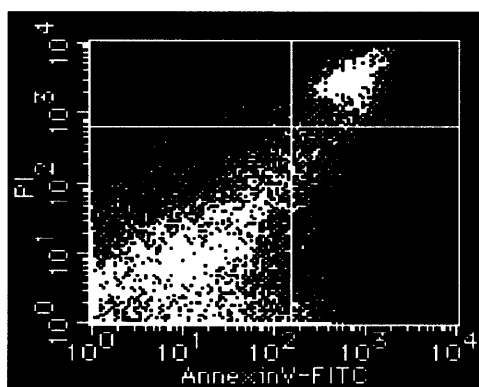
培養 24 時間後



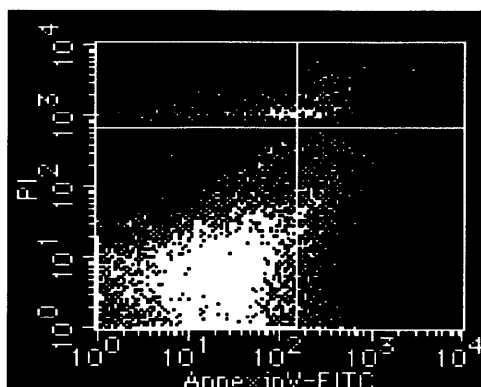
培養 6 時間後



培養 36 時間後



培養 12 時間後



培養 48 時間後

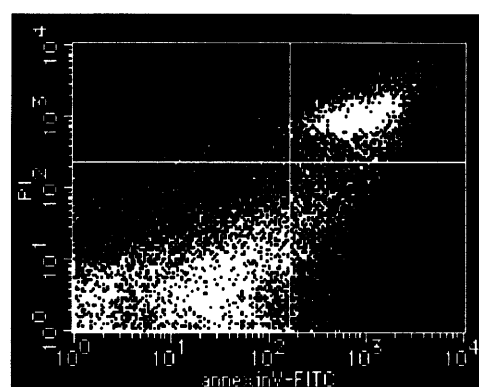


図 4-10A. グルコースポリマー透析液の影響による死細胞率の変化

5.考察

5-1. 細胞活性の評価

MTT 試験での測定結果から、グルコースポリマー透析液の影響による明らかな細胞活性の増加が確認された。30 分の曝露時間で大きな変化がなかったのは、単純に時間が短すぎたため影響がほとんどでなかったからであると考えられる。事実、曝露時間が長くなるのに対応して細胞活性の上昇も、より顕著に観測された。このことから、グルコースポリマー透析液が腹膜内に貯留されている間、除々に細胞に影響を与えており、細胞活性が上昇していくことが示唆される。しかし逆に、100%グルコースポリマー透析液を曝露した場合のみ細胞活性に減少が確認された。その減少は曝露時間が長いほど大きく、特に 6 時間の曝露後では、有意な減少傾向が見られた。

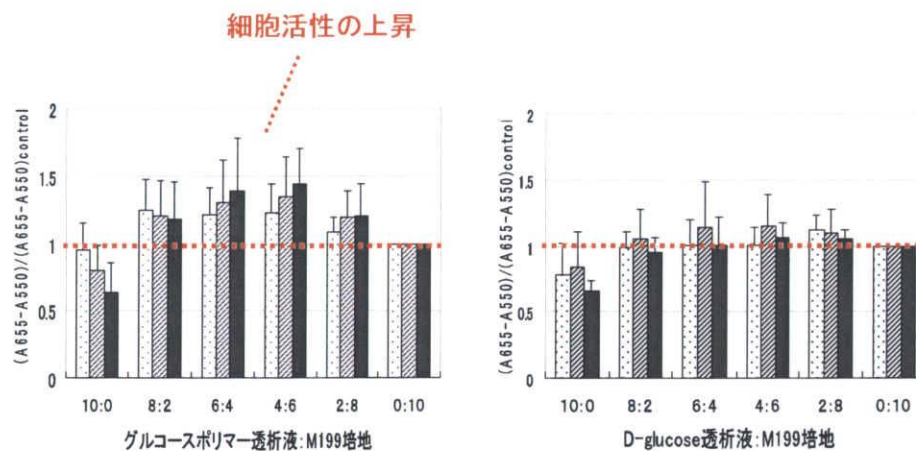


図 5-1A. 細胞活性の比較

この結果から、透析液自体は細胞に対して、細胞活性を抑制する作用があると考えられる。しかし、実際に透析液を使用した場合、100%の状態では透析液が注入され、その後除水により透析液の濃度は徐々に減少していく。つまり、100%の透析液が 6 時間もの間体内に存在し続けることはないため、この透析液によって腹膜中皮細胞の細胞活性はまず減少し、その後、透析液の濃度が薄まるにつれて活性が増加していくことが予想される。生体適合性の維持という観点から考えると、このような急激な活性の上昇・減少の変化は生体組織に対してもマイナスに働く可能性は否定できないと言える。

比較として同社が発売している D-グルコースを用いた透析液についても同様の実験を行った。これは、その他に含まれる電解質濃度がグルコースポリマー透析液とほぼ等しい透析液であり、浸透圧剤としてグルコースポリマーではなく D-グルコー

スを使用した透析液である。結果としては、細胞活性に大きな変化は見られなかった。このことから、グルコースポリマー透析液による細胞活性への影響にはグルコースポリマーのみが関与していると考えられ、D-グルコースと大きく異なる分子量の大きさに注目した。

5-2. 細胞増殖能の評価

MTT 試験の結果から細胞活性の増加を確認したが、この活性の上昇の原因として細胞が増殖したのか、ミトコンドリアに関連した酵素が活性化されたのかを測定する目的で細胞増殖能の変化を、BrdU 試験と flow cytometry による細胞周期の評価によって調べた。結果、グルコースポリマー透析液でも D-グルコース透析液でも細胞の増殖能の増加は確認されず、むしろ減少傾向であった。

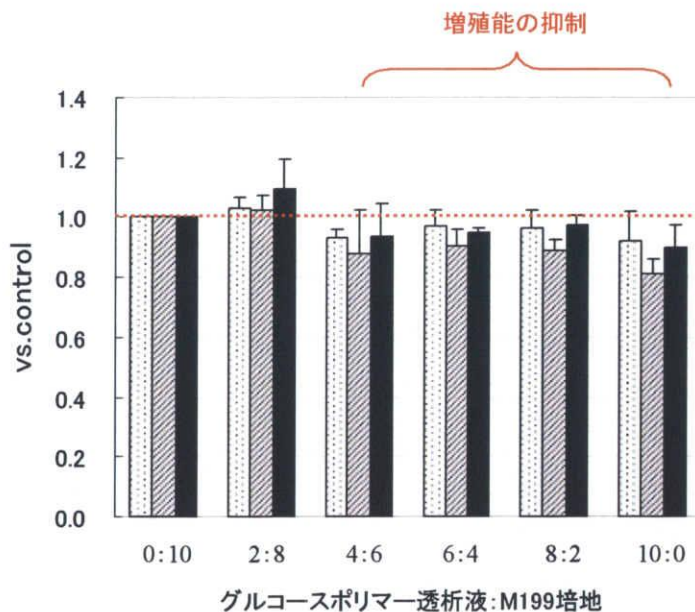


図 5-2A. グルコースポリマー透析液による細胞増殖能の変化

ここで腹膜透析における除水に関して、これには浸透圧が関与する。この浸透圧はファンツホッフの式よりモル濃度に依存する。

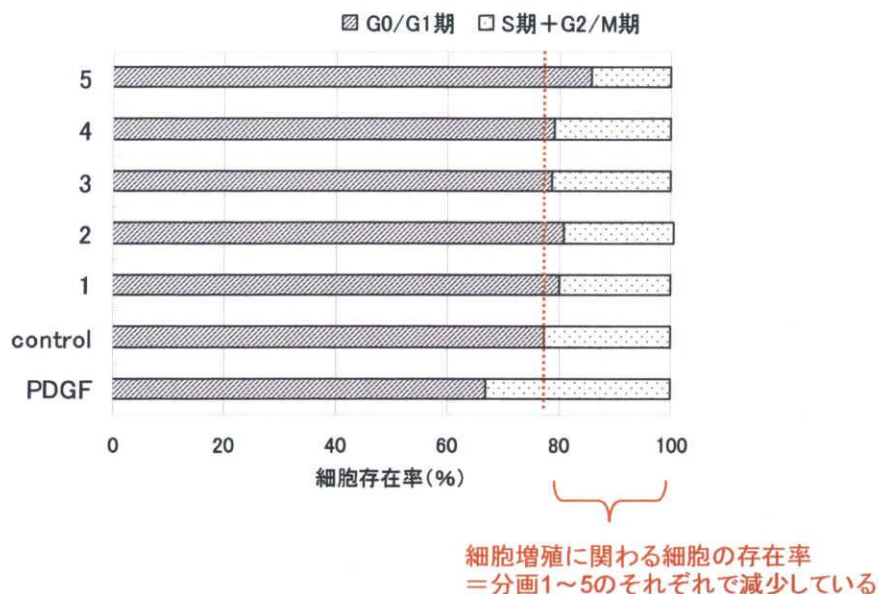
《ファンツホッフの式》

$$\Pi = C_A RT$$

(Π : 浸透圧、 C_A : モル濃度、 R : 気体定数、 T : 絶対温度)

モル濃度は分子量に反比例するため分子量が大きいと除水能は低下する。しかし、分子量が小さいと D-グルコースのように腹膜を通過しやすいため体内に拡散されてしまい長時間の除水ができない。このことから、腹腔内ではグルコースポリマーが分解され、高いモル濃度を維持することで長期的な除水能を持つと考えられる。そこで、平均分子量 16000 Da のグルコースポリマーの中でも、除水だけでなく細胞活性や細胞増殖能に大きく影響している分子量範囲がある可能性を考慮し、グルコースポリマーを分子量で 5 分画し、それぞれの分子量範囲に対する細胞増殖能の変化を flow cytometry で測定した。それぞれの分画分子量の値について、標準試料としてプルランを用いて測定した結果、ほぼ文献値と等しい値を得た。

それぞれの分画分子量範囲での細胞増殖に与える影響を測定した結果、分画 1～5 をそれぞれで細胞増殖を抑制させるような変化が確認された。特に分画 5 (重量平均分子量約 2000 Da) において細胞増殖抑制が大きかったことから、分子量範囲で細胞への影響に違いがあることが示唆された。



	分画1	分画2	分画3	分画4	分画5
重量平均分子量	40943	19223	8415	3856	1987
数平均分子量	46894	18731	7505	3441	1287

図 5-3A. 分画 1～5 の影響による細胞増殖能の変化

この結果から、MTT 試験で得られた細胞活性の上昇は細胞増殖能が増加したことによるものではなく、ミトコンドリアでの酵素活性によるものではないかと考えられる。

4-3. 細胞死、細胞障害性の評価

透析液の影響による死細胞数の変化を flow cytometry を用いて測定した結果、D-グルコース透析液、グルコースポリマー透析液のどちらの場合でも死細胞の割合が曝露時間に比例して増加した。特に、グルコースポリマー透析液による影響では大きな死細胞を示した。

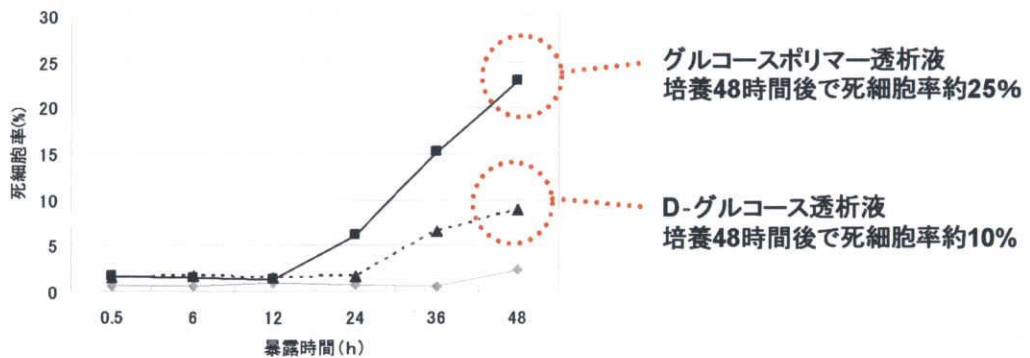


図 5-4A.透析液の影響による死細胞率の変化

このときの細胞死がアポトーシス、ネクローシスのどちらに起因するのかを測定する目的で LDH 試験を行った結果、D-グルコース透析液では LDH 量の増加を、グルコースポリマー透析液では LDH 量の減少を確認した。

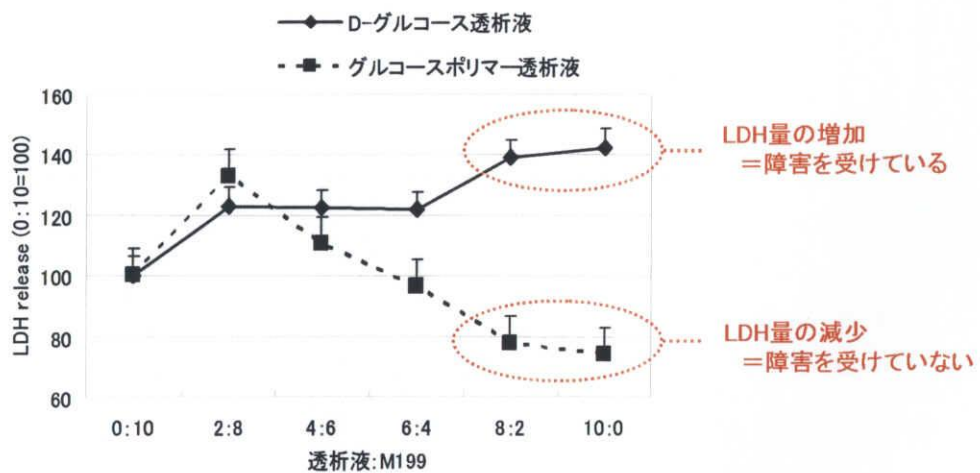


図 5-5A.透析液の影響による LDH 放出量の変化

これらの結果から、D-グルコース透析液の影響ではネクロシスに起因する細胞死が誘導されると考えられる。また、グルコースポリマー透析液の場合は、細胞障害を受けていないにもかかわらず死細胞の割合が増加していることから、グルコースポリマーの影響によってアポトーシスが誘導されていることが示唆される。

アポトーシスへの伝達経路にはミトコンドリアが関与することが知られている。MTT 試験によるミトコンドリアの活性能の上昇が生体にどのような影響を与えるものであるかの詳細は不明だが、本研究結果から、アポトーシス誘導に関連している可能性が考えられる。つまり、過剰なグルコースポリマーの存在がストレスとして働き、細胞内のミトコンドリアにシグナルを伝達する。その結果、ミトコンドリアの活性能が上昇し、アポトーシスを引き起こすのではないかと考えられる。それに対して、D-グルコースの場合は、LDH 放出量の増加が確認されたことから、D-グルコースが過剰に存在することで、細胞膜が障害を受ける。その結果、死細胞の割合が増加することが考えられる。いずれの場合も、細胞に対して障害的な影響を与えており、透析液の生体適合性の低さが証明された。しかし、グルコースポリマーの場合は、細胞膜が直接障害を受けるわけではなく、ミトコンドリアを介したシグナル伝達によってアポトーシスを引き起こす可能性が高いので、この伝達経路を阻害し、なおかつ生体に対して無害な物質を透析液中に加えることで、生体適合性の上昇が期待できるのではないかと考えられる。

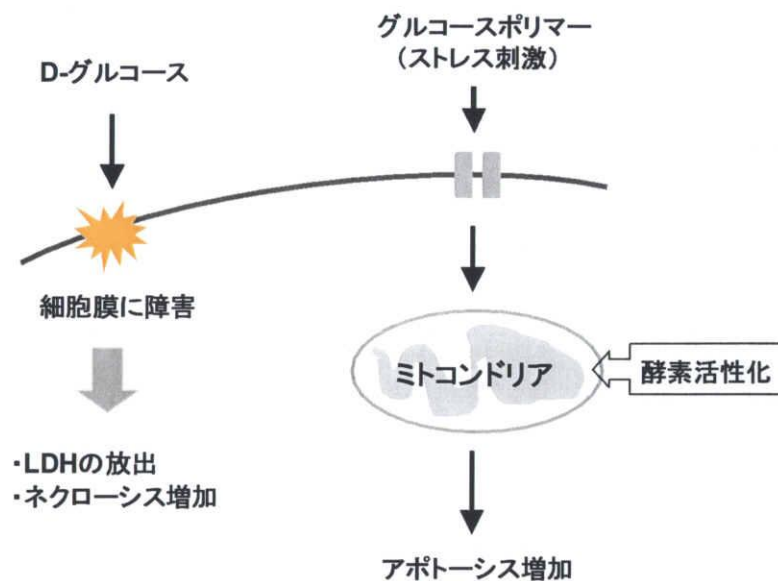


図 5-5A.D-グルコース、グルコースポリマーの細胞への影響

6. 結論

本研究結果から、グルコースポリマーが腹膜中皮細胞に与える影響については、以下のことが確認できた。

1. 細胞活性の上昇
2. 細胞増殖は減少傾向
3. 死細胞率の増加

以上より、グルコースポリマーによる刺激はミトコンドリアに影響してアポトーシスを誘導すると同時に、核内にシグナルを伝達し細胞増殖を抑制することが示唆された。この結果、腹膜中皮細胞の数が減少していき、腹膜障害へと繋がっていく可能性は否定できない。これらの増殖抑制、細胞死誘導経路を阻害できれば(例えば、カスパーゼ-9の活性を阻害するなど)、グルコースポリマー透析液は、より生体適合性の高い透析液として使用できると考えられる。

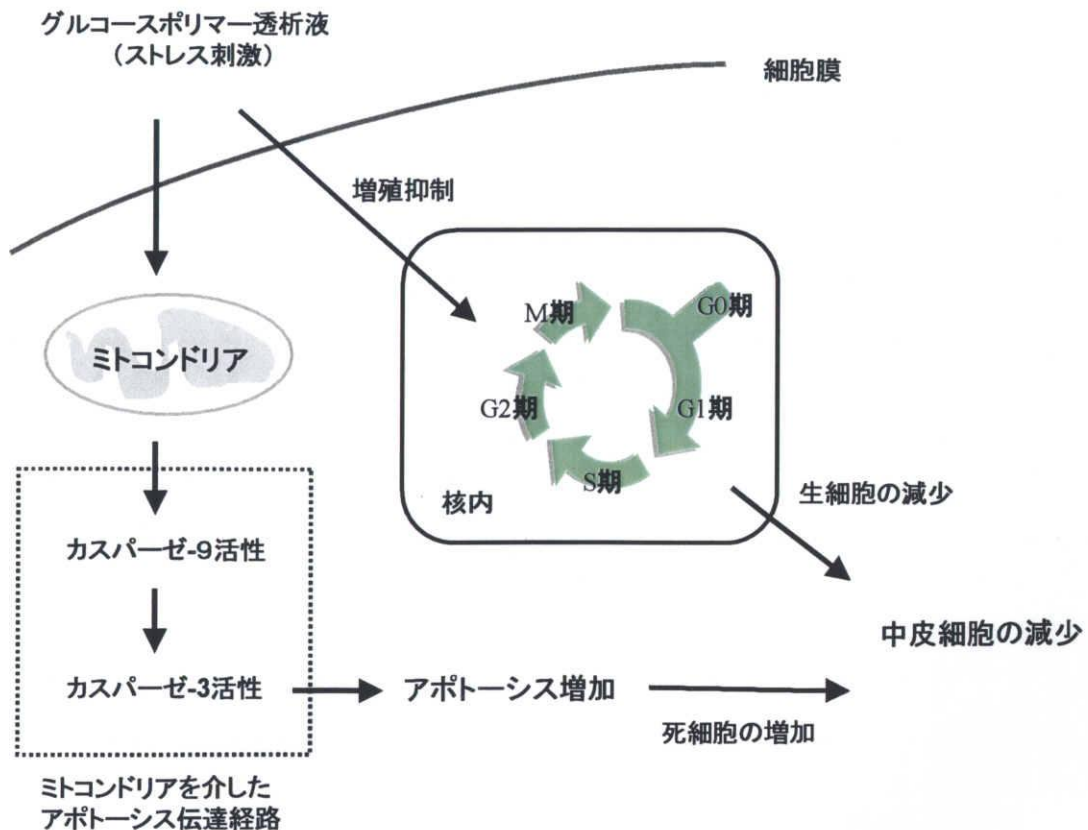


図 6-1A. グルコースポリマーの細胞内への影響

第2部.

間葉系幹細胞の分化・増殖の制御技術の開発

1. 緒言

1-1. 胚性幹細胞と体性幹細胞

幹細胞には大きく分けて、胚性幹細胞(embryonic stem cell:ES 細胞)と体性幹細胞(somatic stem cell)とがある²⁴⁾。胚性幹細胞は、受精卵が分化して胎児に発展するまでの状態である胚の初期段階から採り出されるもので、身体のだのような細胞にも成長できる性質を持っているため多能性幹細胞(pluripotent cell)とも呼ばれている²⁵⁾。このような多分化能は LIF/STAT、Wnt/ β -catenin、BMP/GDF などの転写因子や伝達因子が協調することで維持されている²⁶⁾。(図 1-1B)

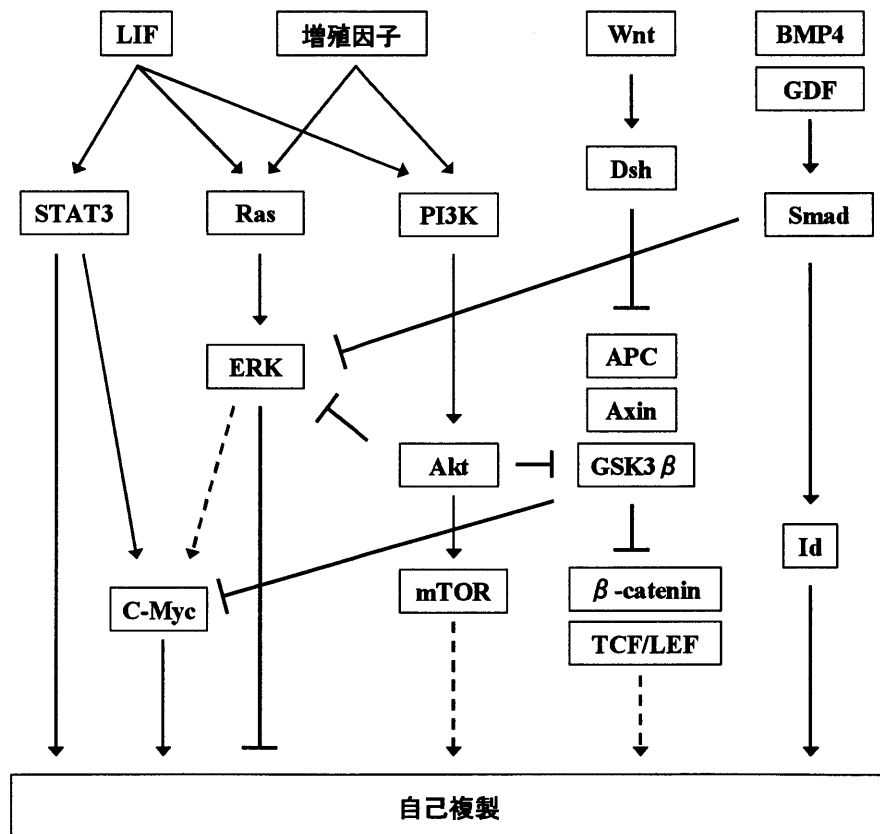


図 1-1B. ES 細胞の自己複製を調節するシグナル伝達経路²⁶⁾

ES 細胞を通常培養しただけでは、無秩序に様々な細胞へと分化してしまうので、ES 細胞を目的細胞へと分化誘導する技術が重要となる。表 1-1B に既報の ES 細胞の分化誘導法を示した。

表 1-1B. ES 細胞の分化制御方法²⁵⁾

分化先	由来	分化誘導方法	文献
神経系細胞	mouse	FGF-2/PDGF	73
神経系細胞	mouse	レチノイン酸	74, 75
神経系細胞	human	無血清, bFGF/EGF	76, 77
血球系細胞	mouse	OP9細胞上で培養	78
血球系細胞	mouse	ST2細胞と共培養, ビタミンD/デキサメタゾン	79
肝細胞	mouse	HNF-3 β プラスミド遺伝子導入	80
心筋細胞	mouse	心筋特異的プロモーター/GFP遺伝子導入	81
膵臓細胞	mouse	FGF-2/ニコチンアミド	82

一方、体性幹細胞は組織幹細胞(tissue stem cell)とも呼ばれ、胚性幹細胞よりは分化能は限定される。体性幹細胞は、比較的未分化な状態の組織に存在する幹細胞なので、胚性幹細胞の子孫ととらえることができる。これまでに骨髄、筋肉、神経、皮膚、肝臓、膵臓、小腸など多くの組織から体性幹細胞が発見されており、それらの性質も、組織によって異なる。体性幹細胞とは、これらの各組織に存在している幹細胞の総称である²⁷⁻³⁰⁾。神経細胞に分化する細胞は神経幹細胞、白血球や赤血球に分化する細胞は造血幹細胞、軟骨・脂肪・骨芽細胞などに分化する細胞は間葉系幹細胞と呼ばれ、図 1-2B のように分類されている²⁵⁾。

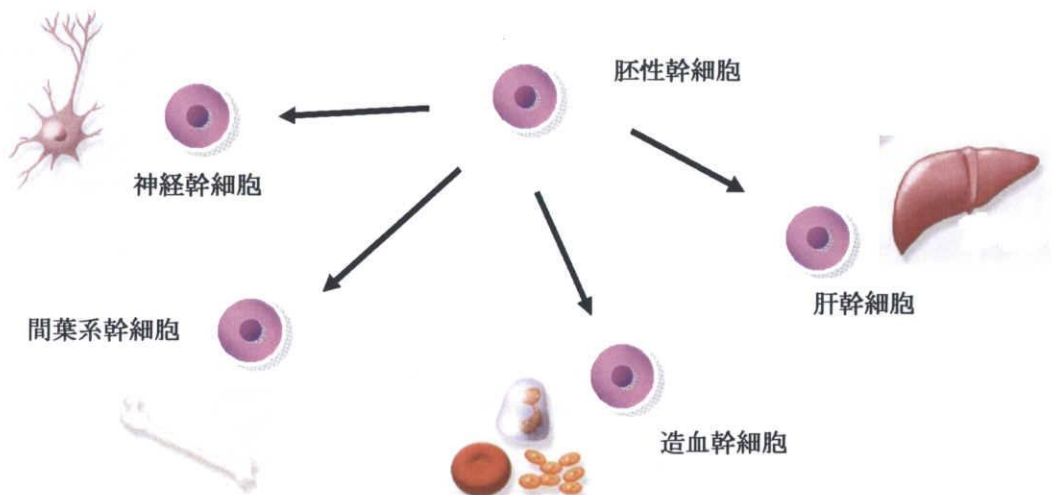


図 1-2B. 胚性幹細胞と体性幹細胞²⁷⁾

1-2. 骨髄幹細胞

図 1-3B に骨の断面と骨髄間質部を示した。このように骨髄間質には間葉系幹細胞、造血幹細胞、中胚葉系幹細胞の他にも、骨芽細胞や脂肪前駆細胞、マクロファージ、樹状細胞などが存在している。例えば、骨髄から取得して培養した繊維芽様細胞から骨、軟骨、脂肪などの細胞分化が観察されたとしても多分化能の間葉系幹細胞が存在することの証明にはならない。間葉系幹細胞が骨髄に存在することを実証するには、単一細胞分離(single cell isolation)、単一細胞標識(single cell marking)、特異的な表面マーカーの解析が必要になる²⁷⁾。

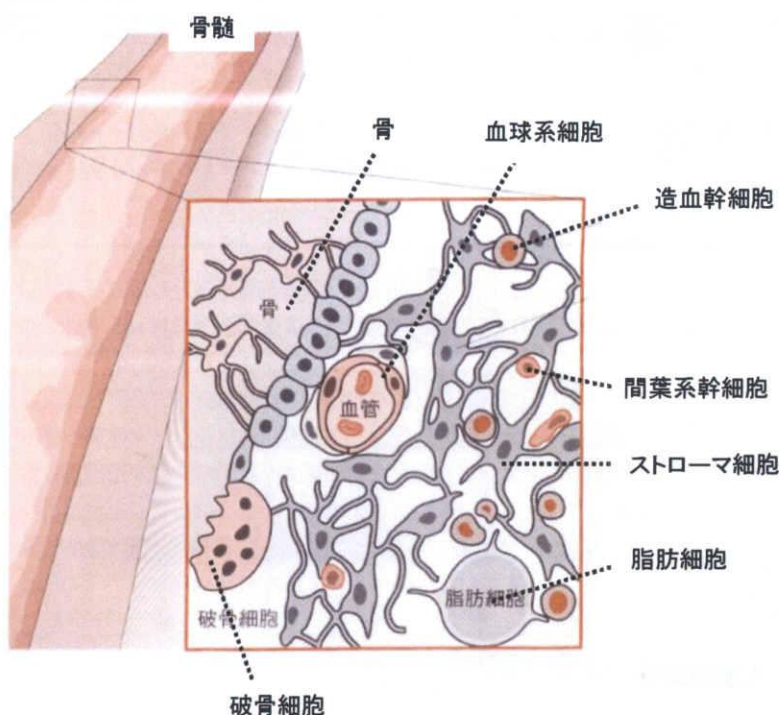


図1-3B. 骨髄間質の構造²⁷⁾

1-2-1. 造血幹細胞 (hematopoietic stem cell)

造血幹細胞は自己複製能を持ち、全ての血球の母細胞である。造血幹細胞は最も研究の進んでいる組織幹細胞であり、この細胞の持つ自己複製能を応用して、骨髄移植・末梢血幹細胞移植・臍帯血移植などの造血幹細胞移植が可能となり、さまざまな難治性疾患に応用されている。造血幹細胞の分化制御に関する研究も進み最近では、組織幹細胞の分化方向はそれほど固定的なものではなく、かなり可塑性があるのではないかと報告が相次いでいる³¹⁾。

造血幹細胞は、最初に骨髄系幹細胞とリンパ球形幹細胞に分かれる。その後、

骨髄系幹細胞は赤血球、血小板、好中球やマクロファージなどに分化し、リンパ球系幹細胞はT細胞やB細胞に分化する。造血細胞の発生と維持にはSCL、c-myb、GATA2などの転写因子が働き、血球の成熟過程ではPax5、PU.5、C/EBPなどが関わっている²⁷⁾。造血細胞と転写因子について図1-4Bにまとめた。

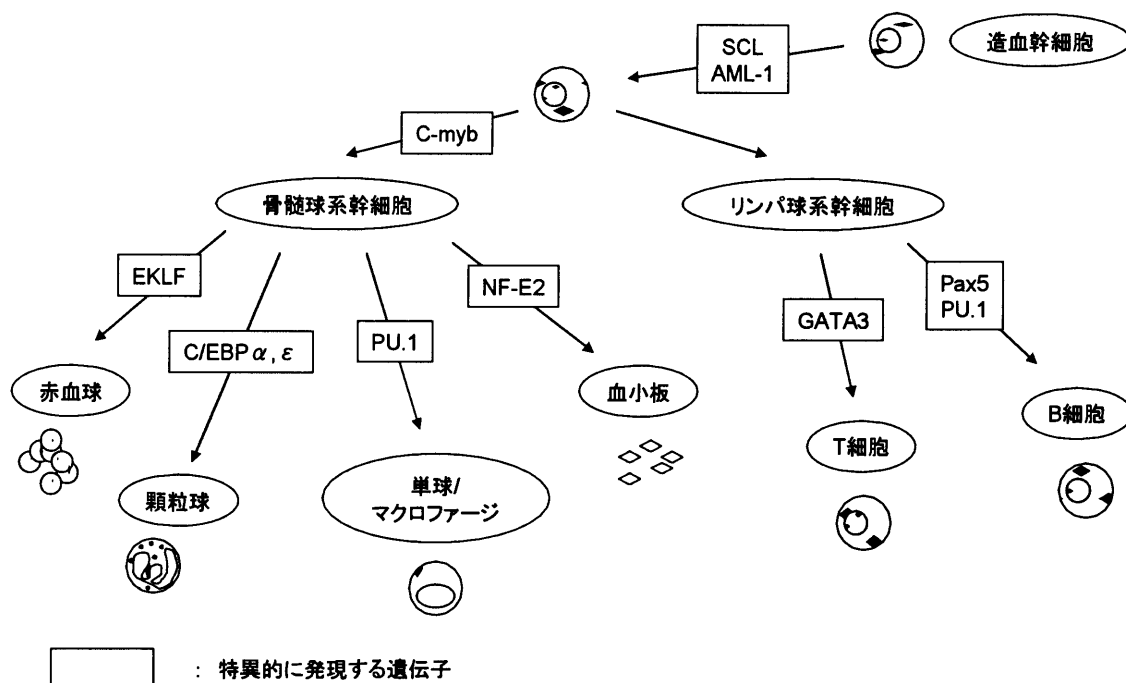


図1-4B. 造血幹細胞の分化と転写因子²⁶⁾

1-2-2. 間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell)

間葉系幹細胞は繊維芽細胞、骨芽、軟骨、脂肪、骨格筋細胞などの間葉系細胞への多分化能を有し、自己複製能を保持している細胞と定義されている。間葉系幹細胞は生体組織においては骨髄間質ならびに真皮・骨格筋・脂肪組織などの結合組織に存在し、生体の結合組織(間葉系組織)の恒常性の維持や修復に機能している²⁷⁾。骨髄中に存在する間葉系幹細胞の割合は、成人では骨髄に含まれる細胞の数十万分の一と考えられており、年齢とともに減少していく^{30,31)}。

間葉系幹細胞に関する研究は、表面マーカー解析(SH2, SH3, CD29, CD44, CD90, CD106などに陽性で、CD14, CD34, CD45などに陰性)、凍結保存・解凍による影響、液性因子や足場材料などの環境因子による分化・増殖制御に関してなど、多くの報告が成されている³³⁾。

1-2-3. 中胚葉系幹細胞 (mesodermal stem cell)

間葉系組織(骨・軟骨・脂肪・骨格筋・靭帯など)に加えて、心筋・平滑筋・血管内皮などの臓側中胚葉系にも分化する中胚葉系幹細胞が成体の骨髄ならびに骨格筋、真皮に存在することが明らかになった²⁷⁾。これらの細胞は通常の間葉系幹細胞よりも小型の形態をもち、CD13,CD49b,CD90 に陽性で,CD34,CD45,CD117 に陰性の表面マーカーのパターンを持つと考えられている。

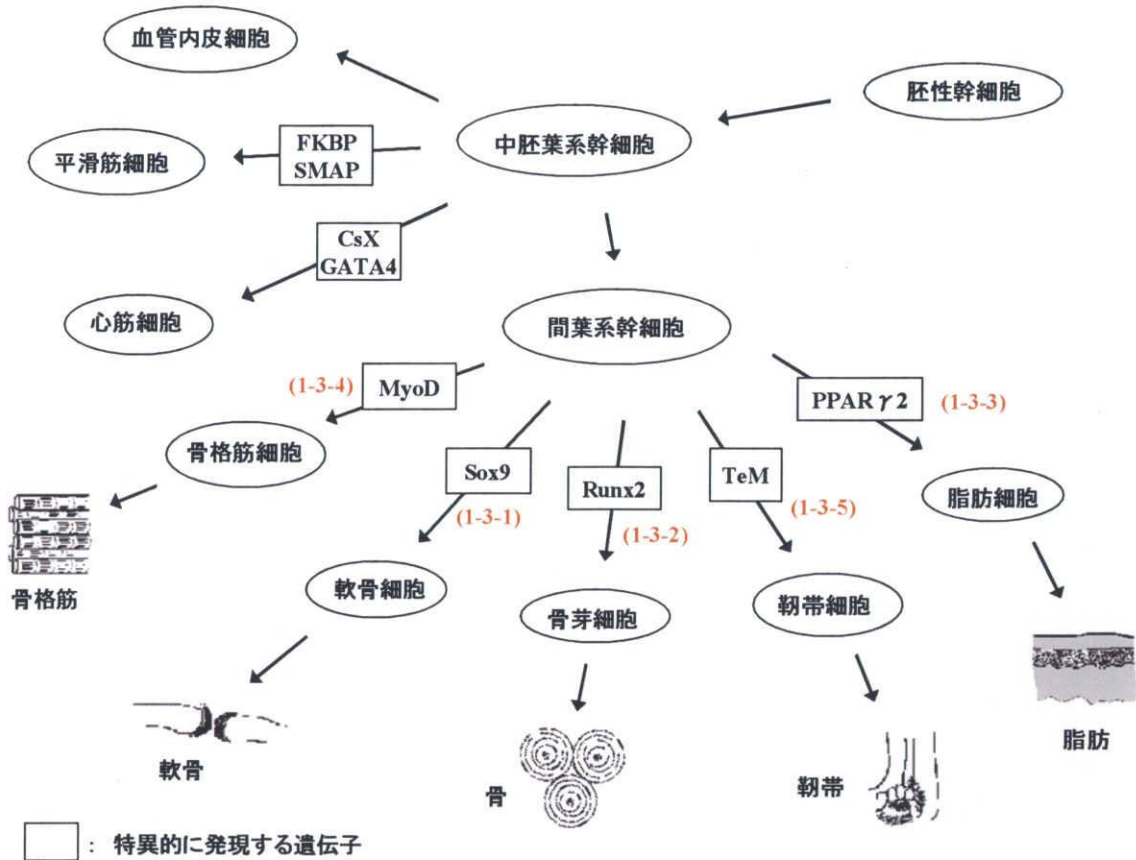


図1-5B. 中胚葉系・間葉系幹細胞の分化と転写因子²⁷⁾

1-3. 間葉系幹細胞の分化

間葉系幹細胞は多種の細胞への分化能を有するが、軟骨細胞・骨芽細胞・脂肪細胞への分化誘導に関しては特に多くの研究報告がされている。表1-2Bに既報の間葉系幹細胞の分化制御法についてまとめた。

表 1-2B. 間葉系幹細胞の分化誘導方法

分化先	由来	分化誘導方法	文献
骨芽細胞	human	血清, デキサメタゾン/ β -リン酸グリセロール /アスコルビン酸	34
骨芽細胞	rat	デキサメタゾン/ビタミンD/BMP-2	35
軟骨細胞	human	ペレット培養, 無血清, TGF- β 3	34
脂肪細胞	human	1-メチル-3-イソブチルキサンチン/デキサメタゾン /インシュリン/インドメタシン	34
骨格筋細胞	mouse	5-アザスチジン	36
神経細胞	rat/human	無血清, β -メルカプトエタノール	37

1-3-1. 軟骨細胞 (chondrocytic cell)

間葉系幹細胞を遠心により細胞塊の状態にし、無血清下において TGF- β 3 で処理することで軟骨に分化する^{25,34,38,39})。このとき、重力分散装置により微重力状態で培養すると、より生体に近い軟骨細胞に分化することが実験的に示された⁴⁰)。また、エラスチンやヒアルロン酸などの足場材料を用いて三次元で培養することで分化を制御できること⁴¹⁻⁴⁵)、静水圧を加えることで転写因子の発現と軟骨特異的細胞外マトリックス(II型コラーゲンやアグリカンなど)の発現量が増加するとの報告もある⁴⁶)。

間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化を誘導するシグナル伝達経路には、①Smad シグナル伝達経路と、②Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路が報告されており、最終的に軟骨細胞に分化するための転写因子としては Sox9 が大きく影響していると考えられている^{47,48})。

①Smad シグナル伝達経路^{49, 50})

Smad は、セリン/スレオニンキナーゼ型受容体からのシグナルを核内に伝達する主要な分子群のことで、そのリガンドは TGF- β スーパーファミリーである。Smad の特徴は、細胞膜上のセリン/スレオニンキナーゼ型受容体により直接リン酸化され、さらに核内で転写因子として機能する点である。この受容体には I 型と II 型があり、リガンド(軟骨細胞への分化では TGF- β 3)がこの二つの受容体の両方に結合しヘテロ複合体を形成する。その後、リン酸化された Smad は転写共因子である p300 や CBP と DNA 上で複合体を形成することで、遺伝子(軟骨細胞への分化では Sox9)の転写活性を引き起こす。

Smad は哺乳類には 8 種類存在しており、受容体からのリン酸化を受ける R-Smad、R-Smad と結合し核内で転写因子として働く Co-Smad、抑制因子として働く I-Smad の 3 種類に分類されている。Smad の構造は MH1、リンカー、MH2 の 3 つのドメインから成っており、MH1 ドメインは DNA 結合部位である。MH2 ドメインは I 型受容

体との結合部位をもち、受容体によってリン酸化される SSXS モチーフが存在している。

間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化の場合、受容体からのリン酸化を受けた Smad2/3 (R-Smad) が Smad4 (Co-Smad) と結合することで核内に移行し、軟骨細胞への分化に関連する転写因子である Sox9 の転写を活性化する。

また、軟骨細胞への分化に伴い、II・IX型コラーゲンやアグリカンという軟骨特異的なプロテオグリカンの発現、I 型コラーゲンの減少といった特徴が見られる。

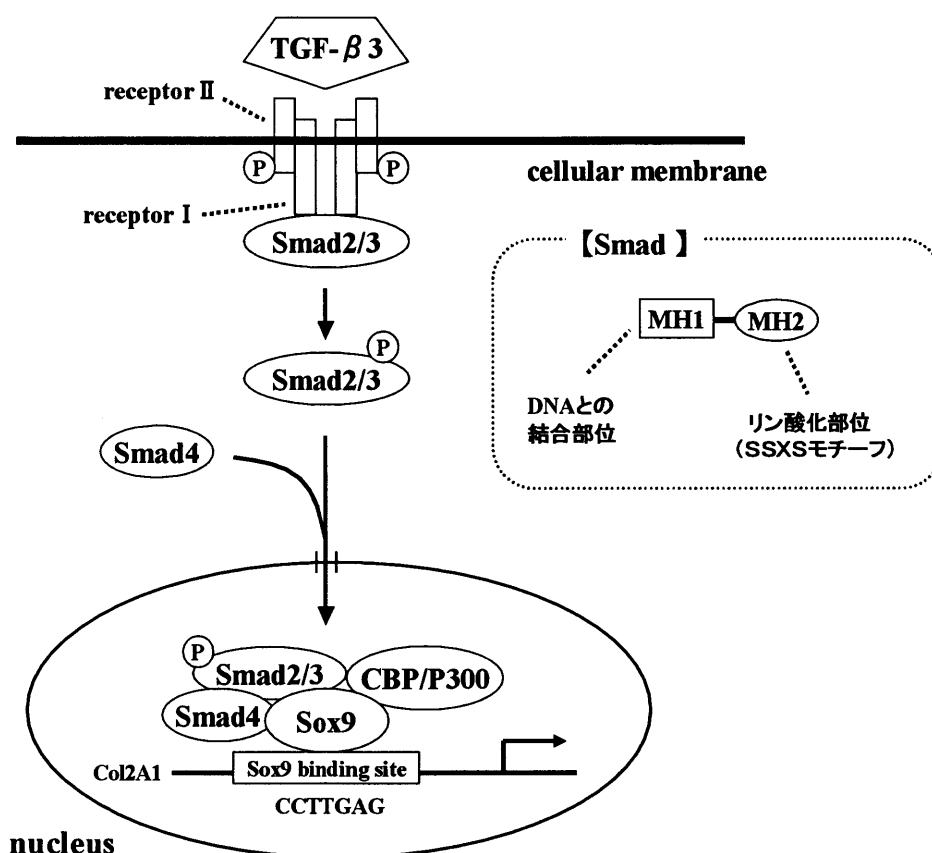


図1-6B. 間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化機構-Smad 経路⁴⁷⁾

②Wnt シグナル伝達経路^{49,50)}

Wnt の関与するシグナル伝達経路として、1)β カテニンを介した canonical 経路、2)PCP 経路(Wnt/JNK 経路)、3)Wnt/Ca²⁺経路の 3 種類が知られているが、canonical 経路が軟骨細胞分化に関与していると考えられる。

β カテニンを介した canonical 経路とは、Wnt のシグナルが β カテニンを介して核に伝達され、標的遺伝子の転写活性化が起こる経路のことである。つまり、Wnt が

受容体である Fz (Frizzled) に結合することによりシグナルが細胞内に伝達されると、Dsh (Dishevelled) を介して β カテニンのリン酸化が抑制される。その結果、 β カテニンは安定化して蓄積し、核に移行して TCF/LEF ファミリーの転写因子と複合体を形成する。 β カテニン-TCF/LEF 複合体によりさまざまな標的遺伝子の転写活性が起きる。^{71,72)} Wnt が作用していない状態では、 β -カテニンは APC、Axin、GSK-3 β 、CKI 空なる複合体によって N 末端領域がリン酸化され、ユビキチン化を受けてプロテアソームによって分解される。また、Wnt シグナル経路は、 β カテニンの分解以外にもさまざまな制御を受けている。細胞外では、ERP、WIF、Cerberus のように Wnt に直接結合して機能を阻害する分泌性のインヒビターが負に制御している。DKK は LRP に結合し LRP と Wnt および Fz との相互作用を阻害する。

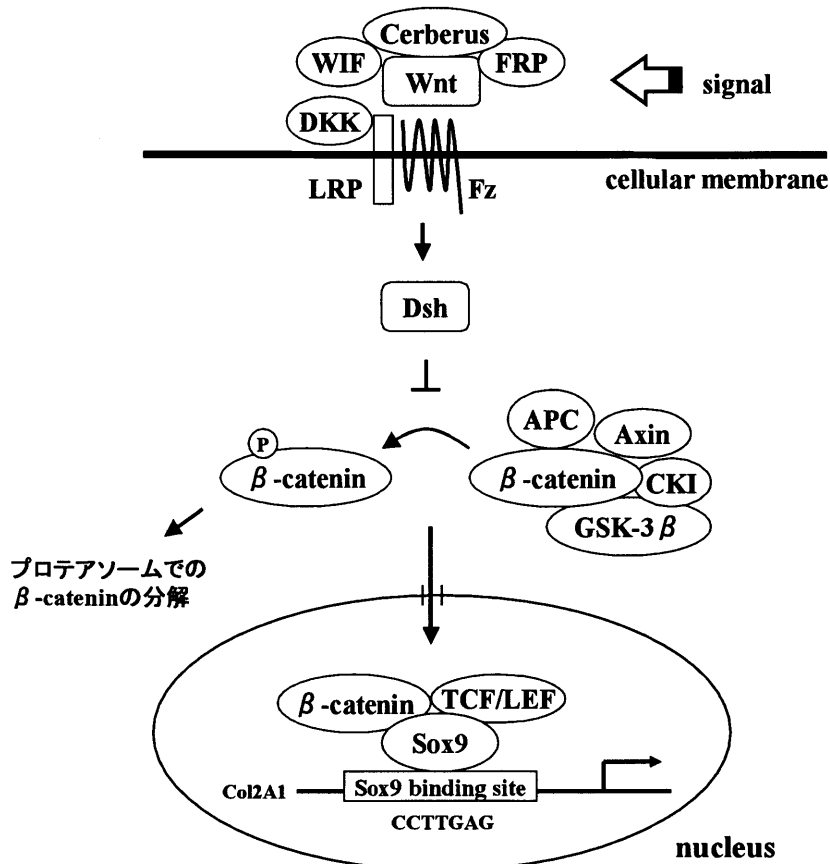


図 1-7B. 間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化機構-Wnt 経路⁴⁸⁾

1-3-2. 骨芽細胞 (osteoblastic cell)

間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化シグナル伝達経路として、①Smad シグナル伝達経路と②MAPK シグナル伝達経路が知られており、分化を決定付ける転写

因子には Runx2、Osterix(Osx)を活性化すると考えられている^{51,52)}。

培地中にデキサメタゾン、ビタミンD、BMP-2(bone morphogenetic protein-2)を加えて間葉系幹細胞を培養すると骨芽細胞に分化誘導される²⁵⁾。また、デキサメタゾン、β-リン酸グリセロール、アスコルビン酸、10%の血清でも有効である²⁷⁾。このとき、静止磁場をかけることにより分化を促進し、無重力条件では分化が抑制されるなど、環境変化による分化・増殖制御の研究も報告されている^{53,54)}。足場による分化制御では、I型コラーゲンやBMP-2、nHAPにて分化の促進が報告されている^{43,44,57)}。

また骨芽細胞から分化が進み骨細胞になるにつれて、アルカリフォスファターゼ(AIP)、骨シアロタンパク(BSP)、オステオカルシン(OC)、I型コラーゲンを発現し、細胞周辺へのカルシウム沈着が生じる。

①Smad シグナル伝達経路^{49,50)}

間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化は、受容体からのリン酸化を受けた Smad1/5 (R-Smad)が Smad4(Co-Smad)と結合することで核内に移行し、Dlx5 を活性化することで促進される。逆に、TGF-β1 刺激による Msx2 の活性化では、骨芽細胞への分化は抑制される。

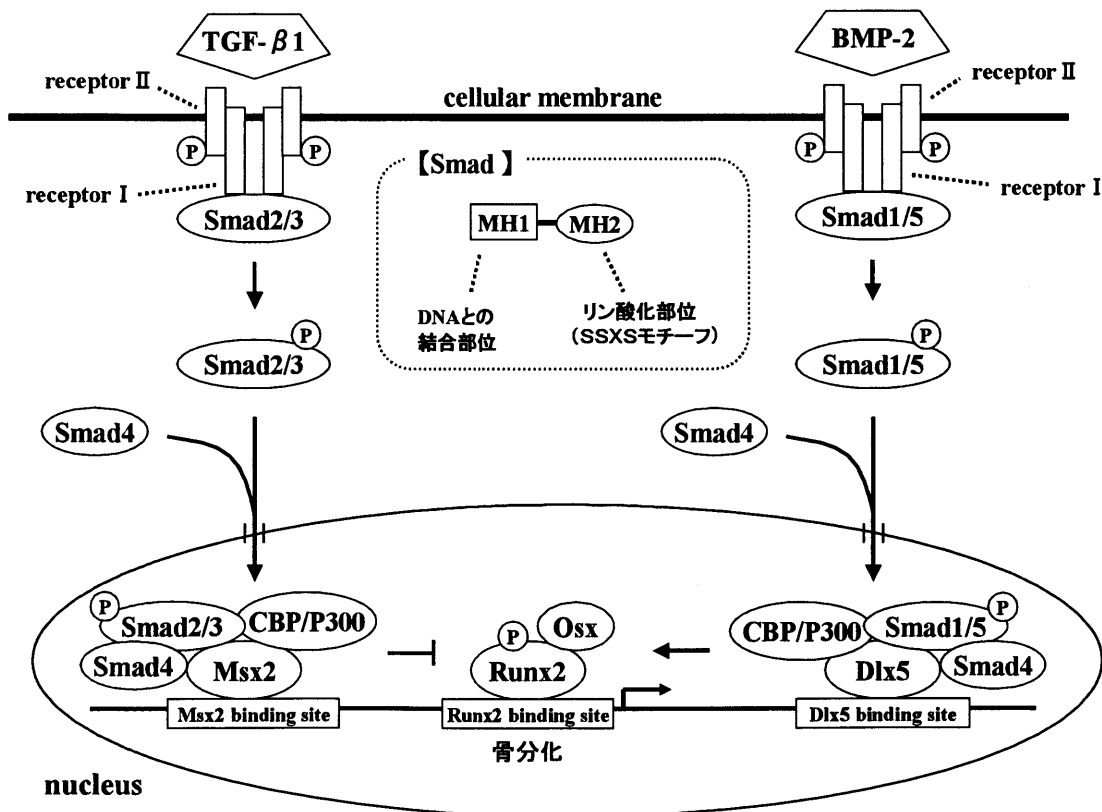


図 1-8B. 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化機構-Smad 経路⁵¹⁾

②MAPK シグナル伝達経路^{49,50)}

MAPK シグナル経路は、主に3種類が知られている。①増殖因子や細胞分裂促進因子によって誘導される ERK を活性化する経路、②物理的ストレス(γ線、紫外線、高浸透圧、酸化ストレスなど)によって誘導される JNK を活性化する経路、③同じくストレス刺激によって p38 を活性化する経路。骨細胞分化の制御にはERK活性化経路が関わっていると考えられている⁵²⁾。

骨細胞分化に関連した MAPK 活性化には、インテグリンを介した経路と、ホルモン(デキサメタゾンなど)などの刺激による Gタンパクを介した PKC 活性化の経路が知られている。

まず、Gタンパク経路に関しては、Gタンパクを介して活性化された PLC によって、PIP2 が IP3 と DAG に加水分解される。産生された DAG が PKC を活性化し、MAPK カスケードへとシグナルが伝達される結果、骨細胞への分化が促進される。もう一方は、ECMによる刺激や、srcの活性化から、インテグリンの裏打ちタンパクである FAK を活性化し、Sos、Ras と続き、MAPK カスケードに繋がる経路である。これらの経路が相互的に活性化されることで、骨細胞への分化に関する転写因子である Runx2 を活性化し骨細胞への分化が誘導される。

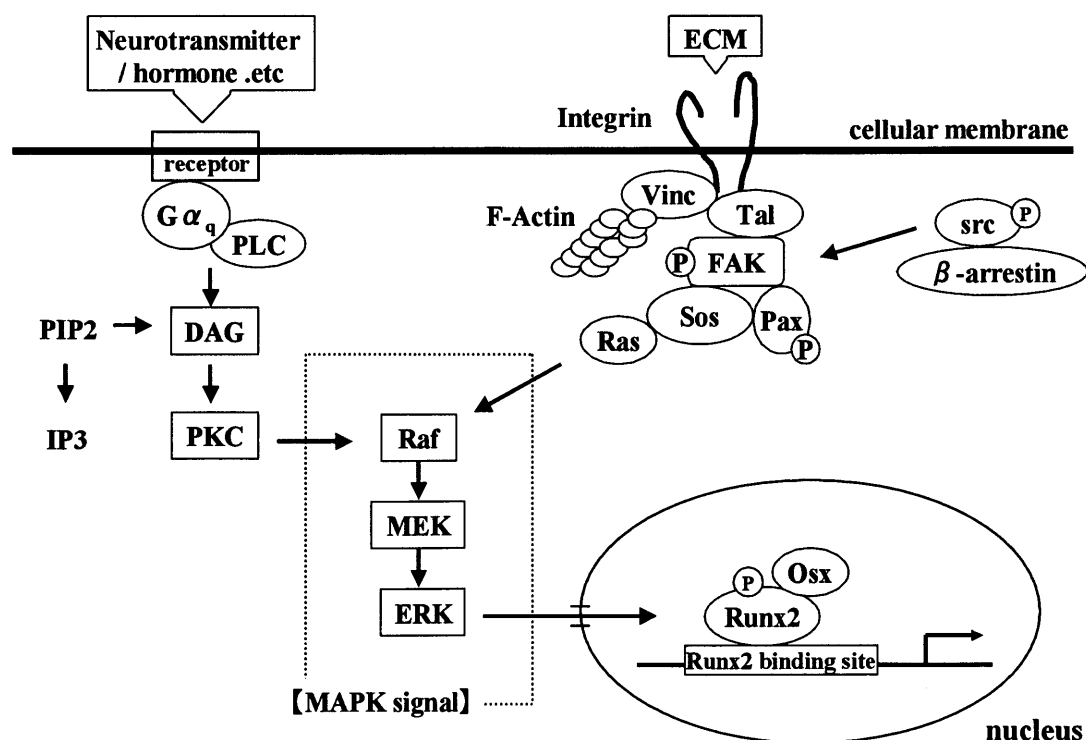


図 1-9B. 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化機構-MAPK 経路⁵²⁾

1-3-3. 脂肪細胞 (adipose cell)

間葉系幹細胞を 1-methyl-3-isobutylxanthine、インドメタシン、インシュリン、デキサメタゾン存在下で培養すると95%以上の細胞が脂肪細胞に分化する^{25,27)}。

間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化誘導経路として、①Smad シグナル伝達経路が知られており、脂肪細胞の分化を決定付ける転写因子には PPAR γ 2、C/EBP が影響していると考えられている⁵⁸⁾。また、脂肪細胞への分化抑制には、②NF- κ B 経路の関与が報告されている⁵⁹⁾。

①Smad シグナル伝達経路^{49,50)}(分化促進)

間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化は、受容体からのリン酸化を受けた Smad2/3 (R-Smad) が Smad4(Co-Smad)と結合することで核内に移行し、PPAR γ 、RXR、C/EBP と結合し、脂肪細胞への分化を誘導する。

②NF- κ B シグナル伝達経路^{49,50)}(分化抑制)

NF- κ B は通常自身の抑制因子である I κ B と複合体を形成して細胞質に存在している。しかし、種々の細胞外刺激により抑制因子から開放され、核に移行することで核内の遺伝子発現を誘導する。受容体からのシグナルが IKK まで伝達されると IKK ファミリー (IKK $\alpha/\beta/\gamma$) の複合体が活性化されて I κ B の N 末端の 2 つのセリンをリン酸化する。そのリン酸化を目印として I κ B がポリユビキチン化されプロテアソームにより分解される。残された NF- κ B は核内に移行し標的遺伝子の発現を誘導する。

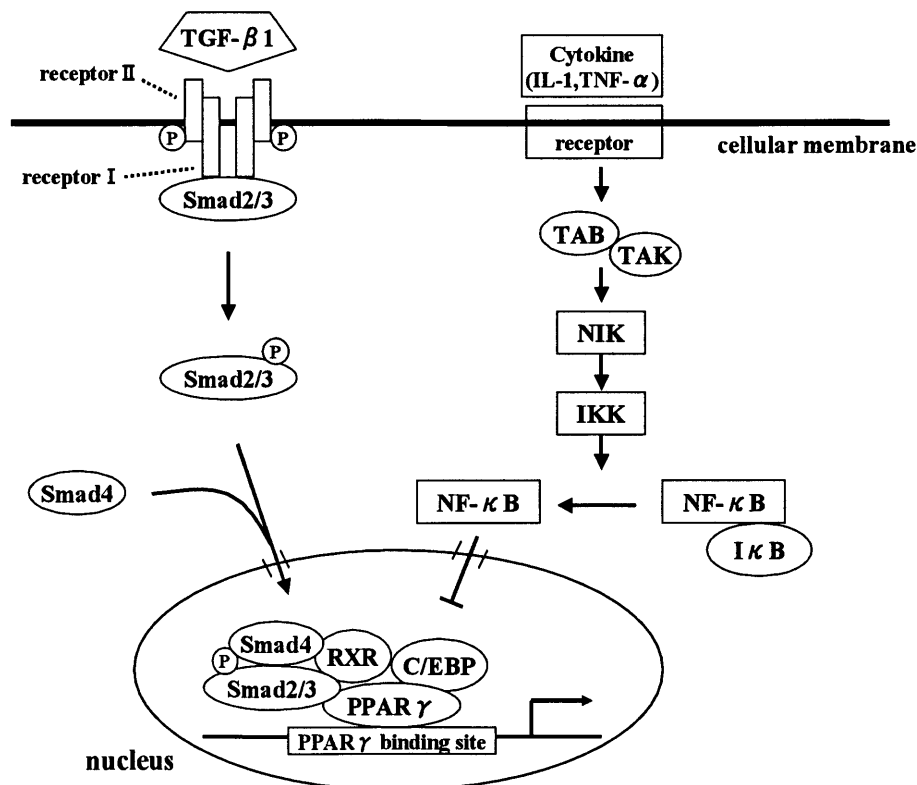


表1-10B. 間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化機構^{58,59)}

1-3-4. 骨格筋細胞 (skeletal muscle cell)

間葉系幹細胞を脱メチル化剤である 5-アザシチジンやアンフォテリシンで処理すると、骨格筋細胞に分化する^{25,27)}。

間葉系幹細胞から骨格筋細胞への分化シグナル伝達経路として、PI3K 伝達経路を介した Akt の活性化反応が知られており⁶⁰⁾、骨格筋細胞の分化を決定付ける転写因子には MyoD が影響していると考えられている^{26,50)}。

PI3K-Akt 経路は、細胞の生存、増殖、運動、寿命などのさまざまな現象に関与することが知られている。Akt は N 末端側から PH ドメイン、キナーゼドメイン(KD)、HM ドメインを有している。PI3K は、増殖因子やインテグリンを介した細胞接着などの種々の刺激により細胞膜上にリクルートされ、活性化される。すると PI3K は細胞膜中のリン脂質である PI(4,5)P₃ をリン酸化して、PI(3,4,5)P₃ を産生する。産生された PI(3,4,5)P₃ と Akt の PH ドメインが結合し、Akt のキナーゼである PDK によって KD ドメイン、もしくは HM ドメインがリン酸化されることで活性化される。活性化 Akt から核内へシグナルが伝達され、骨格筋への分化が誘導されると考えられる。また、Akt はグリコーゲンの合成やグルコース取り込みにも関与しており、これらは骨格筋自身のエネルギー源となる⁵⁰⁾。

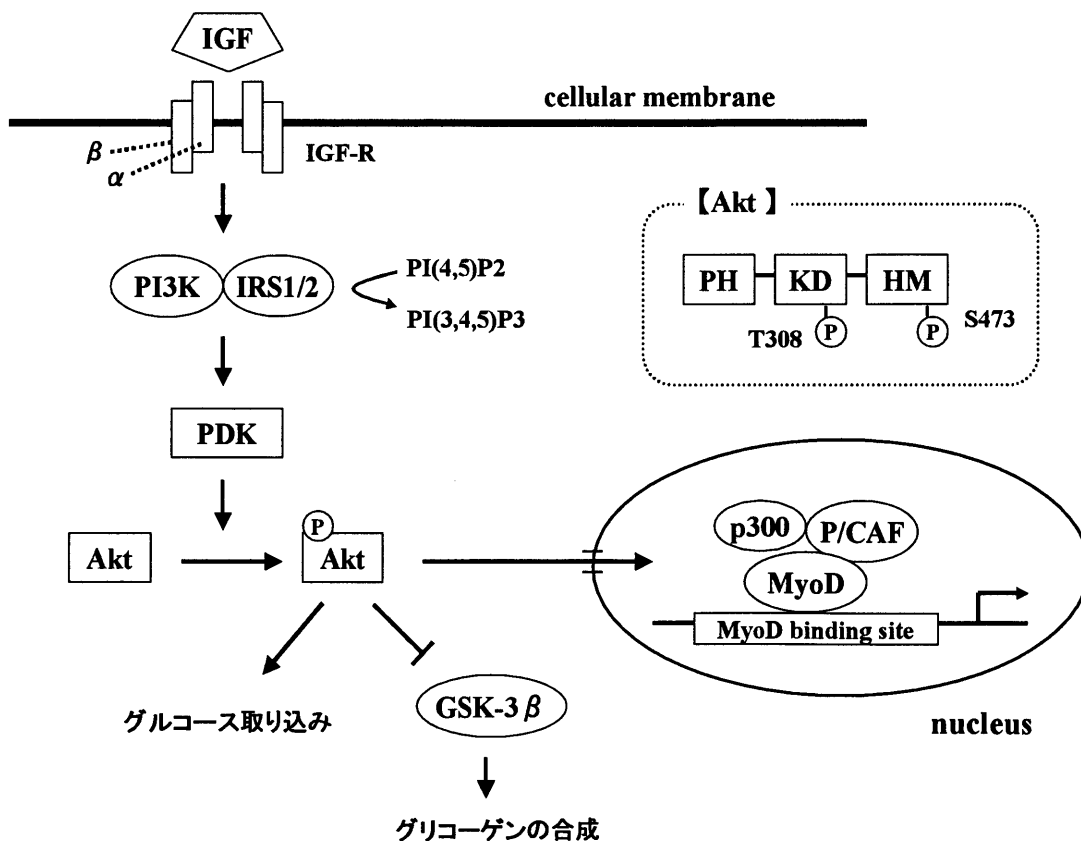


図 1-11B. 間葉系幹細胞から骨格筋細胞への分化機構⁶⁰⁾

1-3-5. 靱帯細胞 (ligament cell)

間葉系幹細胞から靱帯細胞に分化させる生理的な外的因子はまだ同定されていないが、ヒアルロン酸を基礎とした靱帯細胞足場上で培養することで靱帯細胞に特徴的なマトリックスタンパク (I, III型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなど) の発現を確認したとの報告がある⁶¹⁾。

靱帯の組織形成の分子機構に関して、ほとんど解析がなされてこなかった大きな原因として、靱帯細胞を特徴付ける分子マーカーが同定されていないことが挙げられる。しかし、近年靱帯に特異的に発現する膜貫通型遺伝子として TeM が発見されたことで、靱帯の分化形質発現の指標となることが期待されている。

1-4. 特殊細胞培養法

細胞を生体外で二次元的に培養する場合、細胞は単層様に増殖する。このとき細胞は接着因子の影響を受けるが、ECM の機能は関与しない。本来生体内では、細胞は周辺をその細胞に特異的なECMで三次元的に埋められており、これらの影響も受けて増殖や分化の制御が成されていると考えられる。そのため、より生体内に類似した環境下での細胞培養が必要となる。表 1-3B に既報の間葉系幹細胞の特殊培養による分化制御に関する報告をまとめた。

表 1-3B. 間葉系幹細胞の分化制御方法

由来	環境因子	分化先	文献
human	PLGA-collagen合成網目状足場	軟骨	41
human	多孔性水溶足場	軟骨	42
human	ナノファイバー足場	軟骨・脂肪・骨	43
human	I型collagen足場	軟骨・骨	44
human/mouse	エラスチン足場	軟骨	45
human	静水圧	軟骨	46
sheep	HTAFF 11足場	靱帯	61
human	BMP-2/nHAP足場	骨	62

1-4-1. 三次元細胞培養

近年の生命科学の発展により、種々の幹細胞が発見され、生体外で組織再生させる可能性が示されてきた。一般的に臓器や組織の実質部分を構成する上皮系細胞は、培養表面に接着して増殖し、二次元の細胞シートを形成する。これに対し

て、肝臓や腎臓のような生体内の臓器は複雑な三次元構造を有するため、移植医療の代替として考える場合には、細胞を二次元で培養するだけでなく、生体内に類似した三次元構造を生体外で再構築する必要がある。したがって、近年の組織工学においては、個々の細胞から三次元構造を再構築する手法の開発が大きな課題となっている。ES 細胞や骨髄由来幹細胞などのような幹細胞／前駆細胞においても同様で、生体外での三次元環境下で組織を再構築する研究が進んでいる。

ECM分子は、生体組織の立体的構造を支えているだけではなく、遊走、増殖、分化等の重要な細胞機能に影響を及ぼすシグナル系に関与していることが知られている。様々なECMの特徴は、各組織における機能的、構造的特性となって現れ、In vitro細胞培養における三次元マトリックスとして物理的な支持体の役割を果たす。

1-4-2. 微小重力条件細胞培養

宇宙ステーションに長期間滞在した宇宙飛行士が地球に帰還すると、極端な筋力低下や骨粗鬆症から、自力で立つことさえ容易ではなくなる。この原因として、無重力環境下において筋肉や骨のもととなる筋芽細胞や骨芽細胞の分化が抑制されたということが考えられる。間葉系幹細胞を未分化のまま培養させることで、免疫拒絶反応が軽減されるという知見もあり、重力を調整した条件下での幹細胞培養での分化・増殖制御が注目を集めている。

表 1-4B. 微小重力に対する細胞応答

細胞	由来	重力の影響	文献
白血球培養細胞	human	微小重力下では増殖および分化の抑制	63,64
白血球培養細胞	human	微小重力下では増殖抑制、過重力下では促進	65,66,67
上皮癌腫細胞	human	微小重力下ではc-fos、s-junの発現が抑制/過重力下では増大	68
T細胞/Tリンパ球/単球細胞	human	PKC量と重力の大きさの関連性	69
骨芽細胞	mouse	微小重力と細胞内シグナルとの関連性	70
骨芽細胞	human	微小重力下では骨細胞への分化が抑制	54

また、生体外で細胞培養を行う場合、重力の影響を受けた細胞は、シャーレの底に沈んでしまうため、厳密な三次元培養は難しく二次元的な培養になってしまう。特に軟骨細胞などは二次元培養では、繊維芽状細胞に脱分化してしまう。そのため、人工生体材料を用いた三次元培養や、攪拌培養などが行われているが、細胞が高密度に凝集すると培養液の組織内部への浸透が阻害されたり、攪拌による細

胞へのストレスで細胞障害を受けたりしてしまうおそれがある。微小重力環境下では細胞が底に沈むことなく、培養液中を浮いた状態での培養が可能なので三次元的な集合体を形成することができる。この手法により、従来の重力下での培養よりも強度の強い軟骨細胞の培養に成功したという報告もある⁴⁰⁾。

現在、重力感受と応答の具体的なメカニズムは不明である。そこで、重力刺激を一種の細胞への物理的なストレスと仮定し、重力応答に対する細胞内シグナル伝達経路を4つの視点から考察した。

1. PKCシグナル経路

微小重力環境下では、PKCのシグナル伝達経路が影響を受け、結果としてインターロイキンの生産阻害し、細胞の増殖・分化を抑制することが報告されている⁶⁷⁾。また、ヒトT細胞、リンパ球細胞、単球細胞を用いた細胞あたりのPKC量や局在に及ぼす微小重力の影響を測定した結果、PKC量と局在は重力に依存して変化することが明らかになった⁶⁹⁾。さらに、細胞内での移動や活性化物質との結合性と重力の関連性に関する報告もされており⁷¹⁾、これらの研究報告から、細胞内シグナル伝達で重要な役割を担っているPKCが、重力変化に敏感に応答していることが示唆される。

2. MAPキナーゼシグナル経路(ERK経路)

環境からの様々なストレス(ずり応力、物理的・化学的刺激など)に応答してMAPKカスケードが活性化されることが知られている⁷²⁾。また、物理的刺激、特に膜伸張刺激では、SAチャンネルが開きCa²⁺の細胞内流入が促進されることでSrcが活性化されることと、PKAおよびPKC活性化に関連してGタンパク群によるシグナル伝達系が重力応答に関連していると考えられることから、これら2つの経路からのMAPKカスケード活性化と物理的刺激との相関性が示唆される。

3. 細胞内骨格

細胞内のシグナル伝達に介在すると考えられている細胞内骨格はアクチンマイクロフィラメントである。微小重力環境下ではF-アクチンの量が増加することが報告されている⁷¹⁾。このことから、アクチンフィラメント系が重力感受シグナル伝達に関与することが示唆される。

4. 細胞内カルシウムイオン量

物理的刺激によって、SAチャンネルが開き、Ca²⁺の細胞内流入が促進されることによってSrcが活性化される。それに続いてFAK、Paxのリン酸化が起こり、F-アクチンとインテグリンの再構成を促し細胞形態の変化をもたらすことが明らかにされている^{72, 93)}。また、骨芽細胞では物理的刺激によってイオンチャンネルを通して細胞内カルシウムイオンの流入があることや、微小重力環境下において細胞内カルシウムイオン量が上昇することが報告されている⁷²⁾。これらの見解から、細胞内のカルシウムイオン量の変化が重力応答に関連する可能性も考えられる。

以上の結果から考えられる重力応答シグナル伝達経路の概略図を以下に示した。

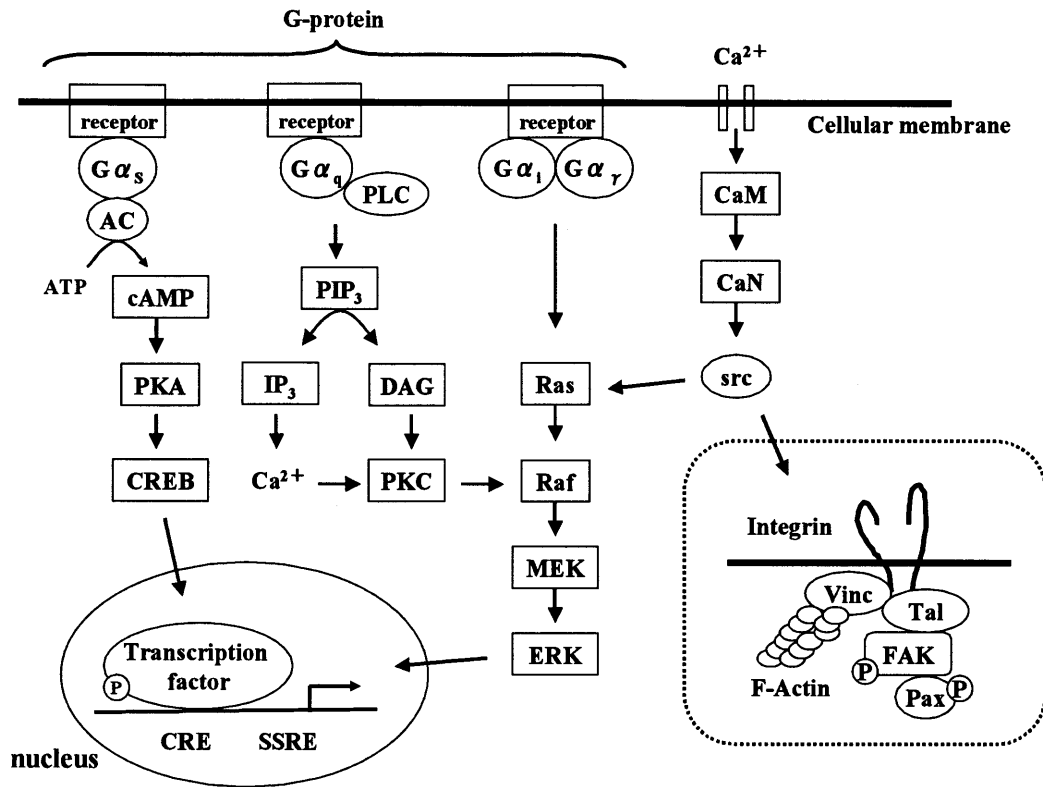


図 1-12. 重力応答に関するシグナル伝達経路

1-5. 細胞外マトリックス (ECM)

細胞外マトリックスとは、細胞の外側にある構造的なものの総称で、主成分は、コラーゲン、エラスチンなどの繊維性蛋白質、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンとプロテオグリカン、それにフィブロネクチン、ラミニンなどの細胞接着性蛋白質である。細胞外マトリックスは、脊椎動物の身体の構造要素の主体で、結合組織の主成分なので、皮膚や骨に多く含まれ、脳や脊髄には少ない。従来は、組織の充填材として物理的構造を保つだけと思われていたが、最近では、細胞の増殖・移動・形状・代謝・分化などの細胞活性を細胞の外側から制御する因子群として重要視されている。エラスチンとコラーゲンの生体組織中での分布について図 1-13 にまとめた。

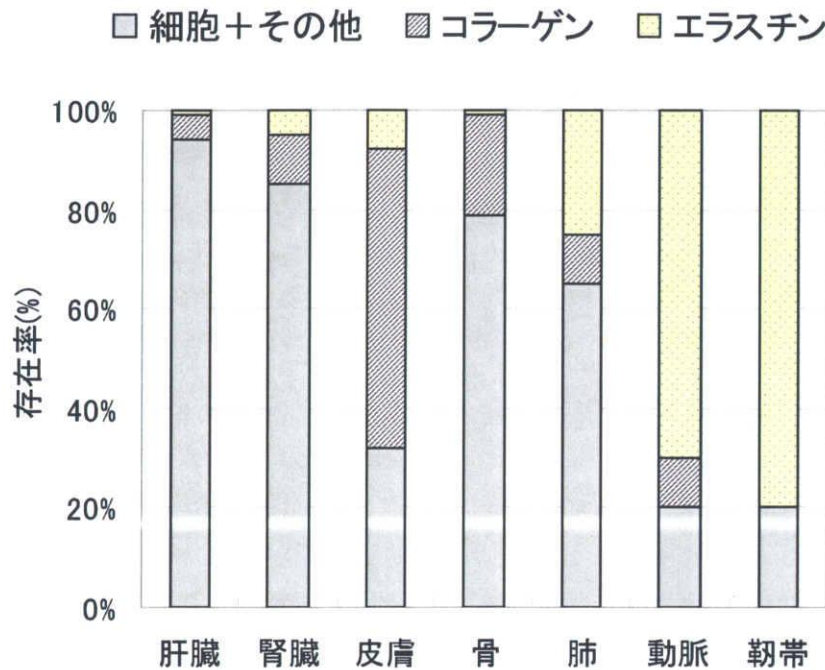


図 1-13B. 細胞外マトリックスの分布

1-5-1. エラスチン(Elastin)

エラスチンは分子量が約 67 KDa の細胞外マトリックスの一つであり、組織から酸、アルカリ、アルコール等で処理後に残る不溶性タンパク質と定義される。組織の伸縮性・弾性を生み出す繊維状タンパク質で、大動脈・靭帯・肺・皮膚・結合組織に発現している。弾力繊維とも呼ばれている。特に、動脈の中膜に多く含まれ、平滑筋との相互作用が注目されている。エラスチンは、一次構造に疎水性側鎖を含むアミノ酸が約 92%を占めており、エラスチン凝集体の収縮・弛緩により、立体構造が容易に復元できる⁸⁵⁾。

エラスチンは前駆体タンパク質である水溶性のトロポエラスチンとして合成され、その後分子中に含まれるリシン側鎖に銅イオンとリシルオキターゼが共に働き、生体内架橋反応を経て、不溶性エラスチンとして形成される。架橋構造は、トロポエラスチン中の 4 つのリシン側鎖から導かれた 4 級ピリジニウム環を含むデスモン、イソデスモンと呼ばれる特徴的なもので、複数のポリペプチド鎖を形成し、弾性に富んでいる。エラスチンに存在する繰り返し配列である VAVAPG 配列は細胞結合性を示し、これによってエラスチンは他の細胞外マトリックスとは異なったリガンドと接着し、機能制御に関わっている⁸⁶⁾。

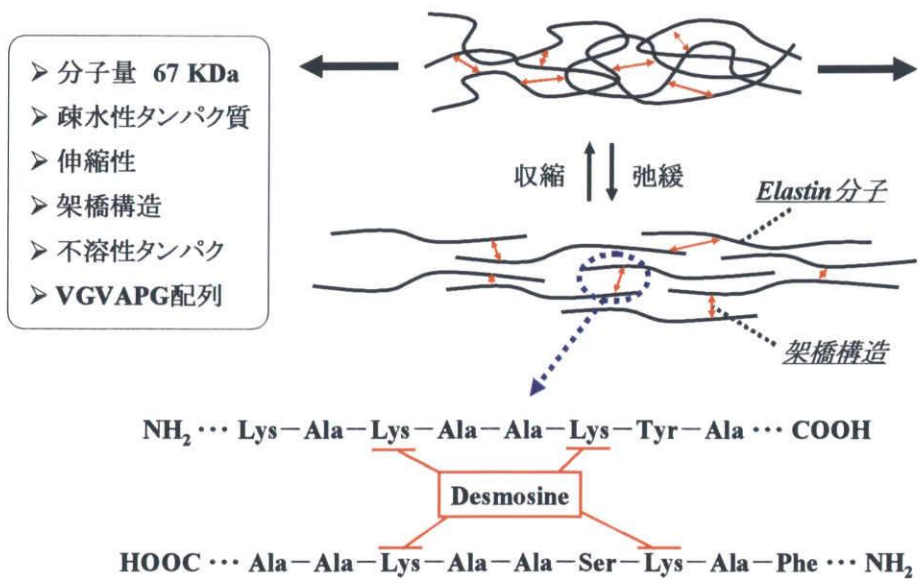


図 1-14B. エラスチンの構造⁶²⁾

1-5-2. コラーゲン(Collagen)

コラーゲンは体タンパク質のうち最も量が多く、総タンパク質量の3分の1にのぼる。非常にたくさんのグリシンを含み、プロリン含量も高い。コラーゲン分子は分子量約10万のポリペプチド鎖3本がより合わせって三重螺旋構造(triple helix)をとったもので、分子量は約30万になる。コラーゲンのアミノ酸組成を調べると、グリシンが約3分の1を占めるが、これはコラーゲン分子が-Gly-X-Y-の繰り返し構造を多数持つポリペプチドからできていることによる。アミノ酸配列が異なり、別々の遺伝子の産物と考えられるコラーゲン分子が20種近く知られており、組織特異的に分布している。例えば、皮膚・腱・骨などにはI型コラーゲンが多く、軟骨はほとんどがII型コラーゲンである⁸⁵⁾。

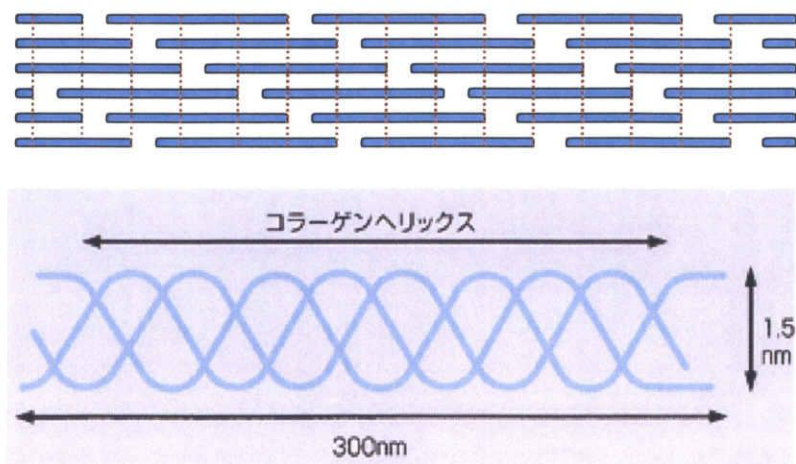


図 1-15B. コラーゲンの螺旋構造⁶⁰⁾

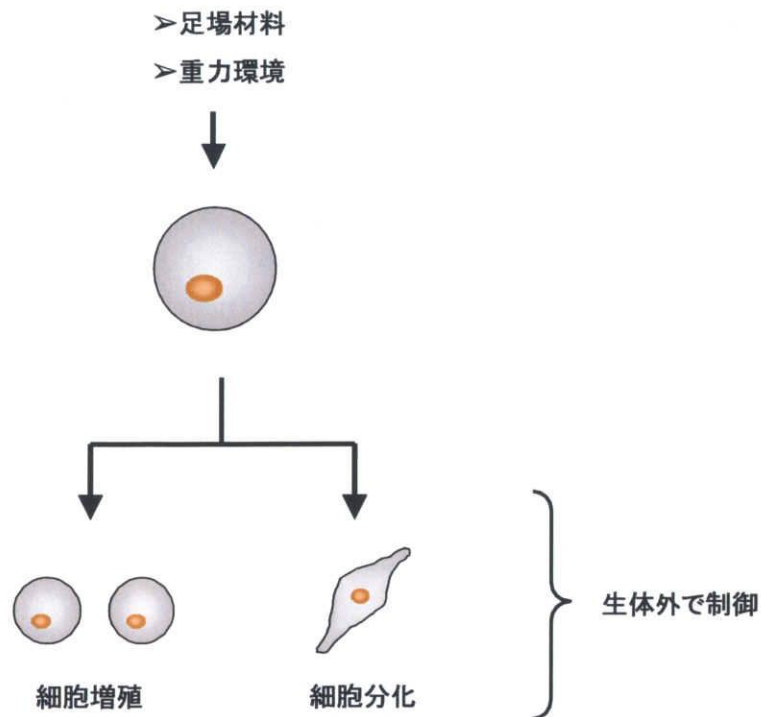
2. 目的

化学的・物理的因子によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の分化・増殖制御技術の開発を目的とした。

本研究では、足場材料として、細胞外マトリックスであるコラーゲンとエラスチン、また環境因子として重力を制御した培養システムに注目した。これらの因子を複合して間葉系幹細胞の分化と増殖をコントロールすることを目指す。

具体的には、生体外実験において

- 細胞表面抗原
- 細胞の形状
- 細胞特異的酵素 の測定を行い、間葉系幹細胞の分化・増殖を観察した。



3. 方法

本研究で用いた間葉系幹細胞は広島大学から提供していただいた、ヒト骨髄由来(30歳/男性/継代3代目)のものである。

細胞の培養には、

- ①未分化維持用培地には3 ng/μl bFGF+10%FBS/DMEMを使用し、
- ②骨細胞分化誘導用培地には100nM デキサメタゾン+10 mMβ-リン酸グリセロール+0.05 mM アスコルビン酸+3 ng/μl bFGF+10%FBS/DMEMを使用した。

細胞培養条件は、37°C/5%CO₂ インキュベート、培地交換は3日置き、細胞の播種数は5000 cells/cm²とした。

3-1. 間葉系幹細胞同定(flow cytometry 解析)

間葉系幹細胞は多分化能を有するため、継代を重ねることで徐々にその増殖能、形質、分化能などが変化していく可能性がある。そこで、継代何代目までの細胞が同一条件として研究に用いることができるかを確認するために、間葉系幹細胞に特徴的な細胞表面抗原であるCD29、CD44、CD14、CD34、CD45をフローサイトメトリーによって測定した。

(※抗原の詳細、使用器具・試薬、操作法の詳細は Appendix9-8 を参照)

3-2. 間葉系幹細胞の骨細胞分化誘導実験

間葉系幹細胞の分化誘導において、最も研究が進んでいる細胞の一つが骨細胞であり、分化誘導法や分化機構など、多くのことが解明されている。そこで、間葉系幹細胞を骨細胞に分化させ、エラスチンやI型コラーゲンといったECMの影響による分化制御を試みた。

まず、通常の細胞培養シャーレに間葉系幹細胞を単層培養し、骨細胞分化誘導用培地を用いて骨細胞に分化させた。これに対して、エラスチンやI型コラーゲンを細胞培養シャーレにコーティングしたときの間葉系幹細胞の分化能の変化を測定した。間葉系幹細胞が骨細胞に分化すると、骨細胞特異的にアルカリフォスファターゼ(AIP)という酵素が活性化される。これを骨細胞分化の指標として、酵素染色法により測定した。

(※酵素染色の原理、使用機器・試薬の詳細は Appendix9-10 を参照)

3-3. ゲルコート上細胞培養実験

ゲル培養には包埋培養とコート上培養の 2 種類がある。包埋培養はゲル内に細胞を包埋させる方法で、ゲルは細胞にとって細胞外マトリックスとして機能し、細胞は三次元的に増殖する。コート上培養は培養シャーレにゲルをコートし、その上で細胞を培養する方法で、細胞は単層様(二次元的)に増殖する。このとき、ゲルは細胞接着因子として働く。本研究では、ゲル・コラーゲン上で間葉系幹細胞を培養し、細胞接着因子として骨細胞分化に与える影響について酵素染色法を用いて評価した。(※ゲル・コラーゲン上細胞培養の詳細は Appendix9-13 を参照)

4. 結果

4-1. 間葉系幹細胞の同定結果(flow cytometry 解析)

間葉系幹細胞の表面抗原(CD29、CD44、CD14、CD34、CD45)の発現をフローサイトメリーによって測定した結果を示した。継代 2~6 代目での表面抗原の変化を測定した。4 代目まではほぼ同一の発現量を示したが、5 代目以降で CD29 と CD44 の発現量が減少した。

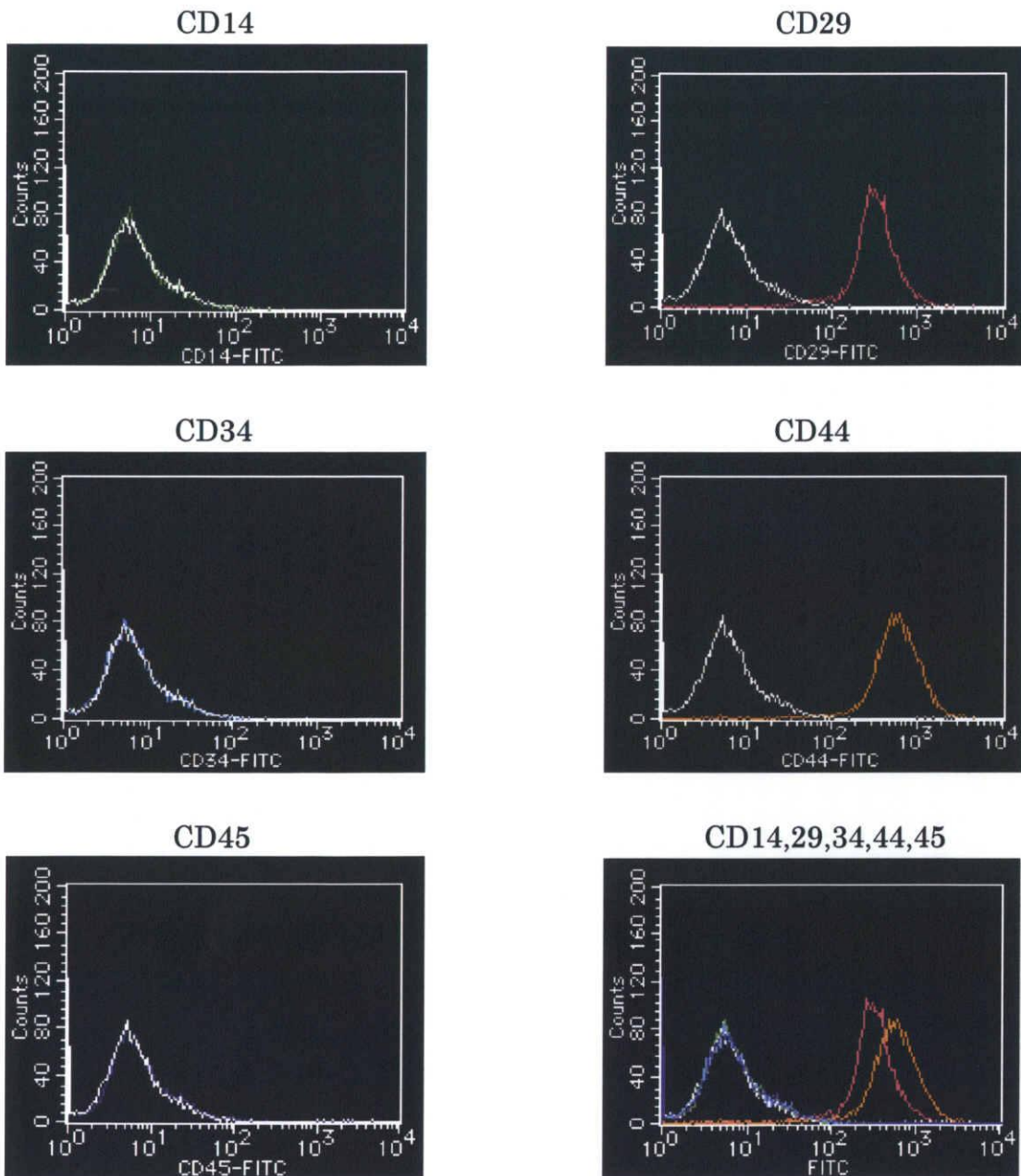


図 4-1B. 間葉系幹細胞の表現抗原測定結果-継代 2 代目-

<継代3代目>

間葉系幹細胞の継代3代目での表面抗原を示した。

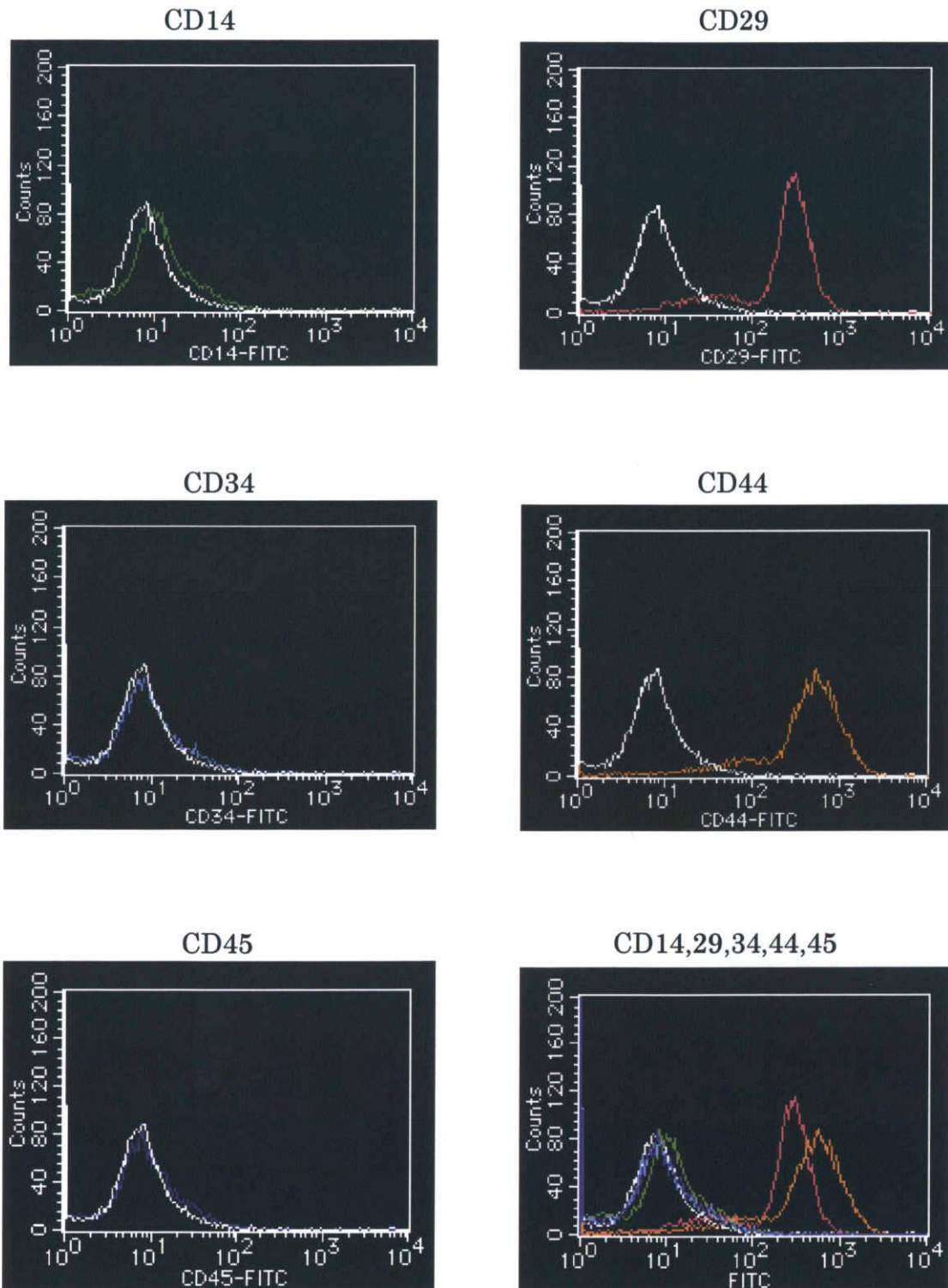


図 4-2B. 間葉系幹細胞の表現抗原測定結果—継代3代目—

<継代4代目>

間葉系幹細胞の継代4代目での表面抗原を示した。

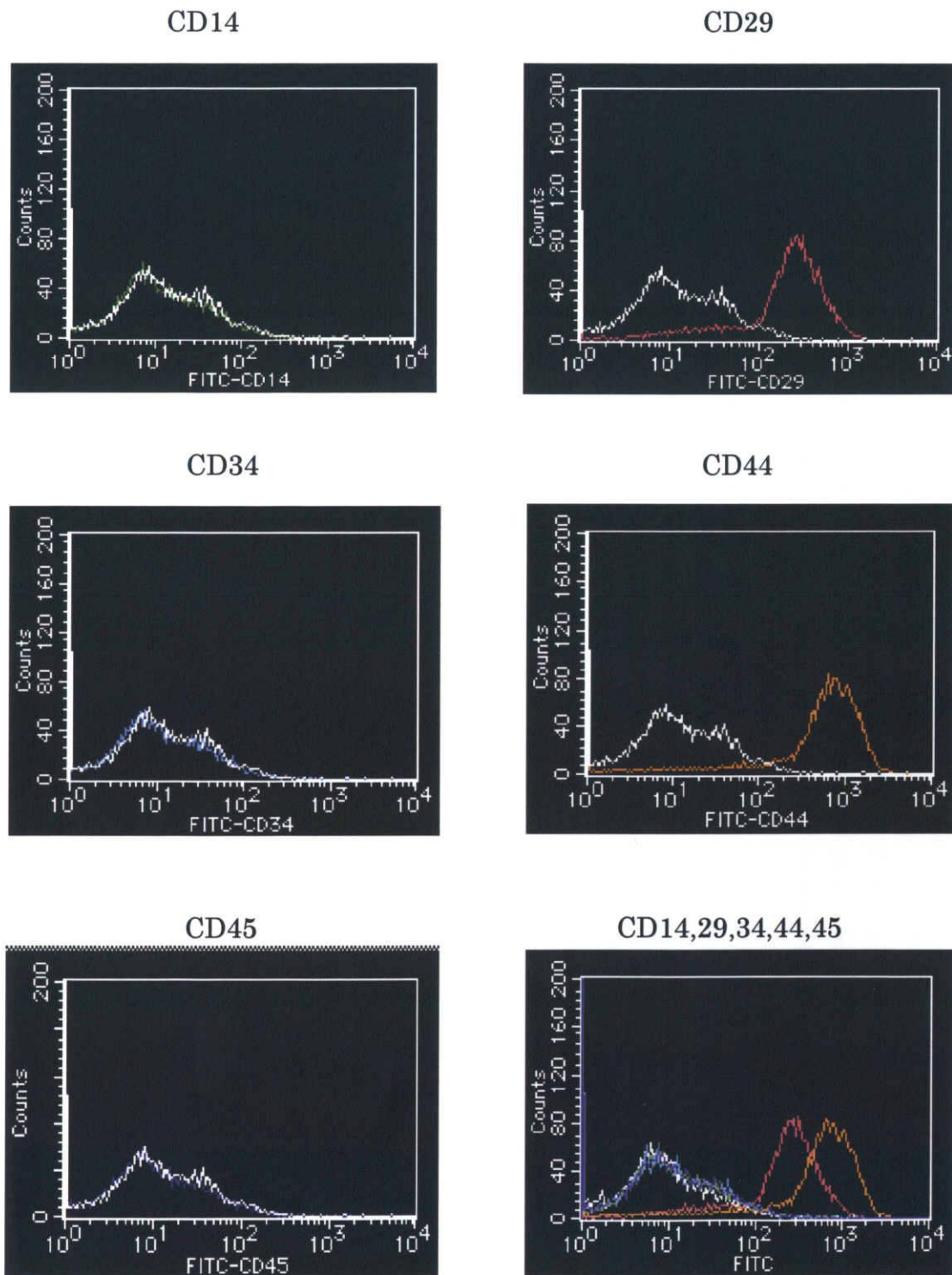


図 4-3B. 間葉系幹細胞の表現抗原測定結果—継代4代目—

<継代5代目>

間葉系幹細胞の継代5代目での表面抗原を示した。

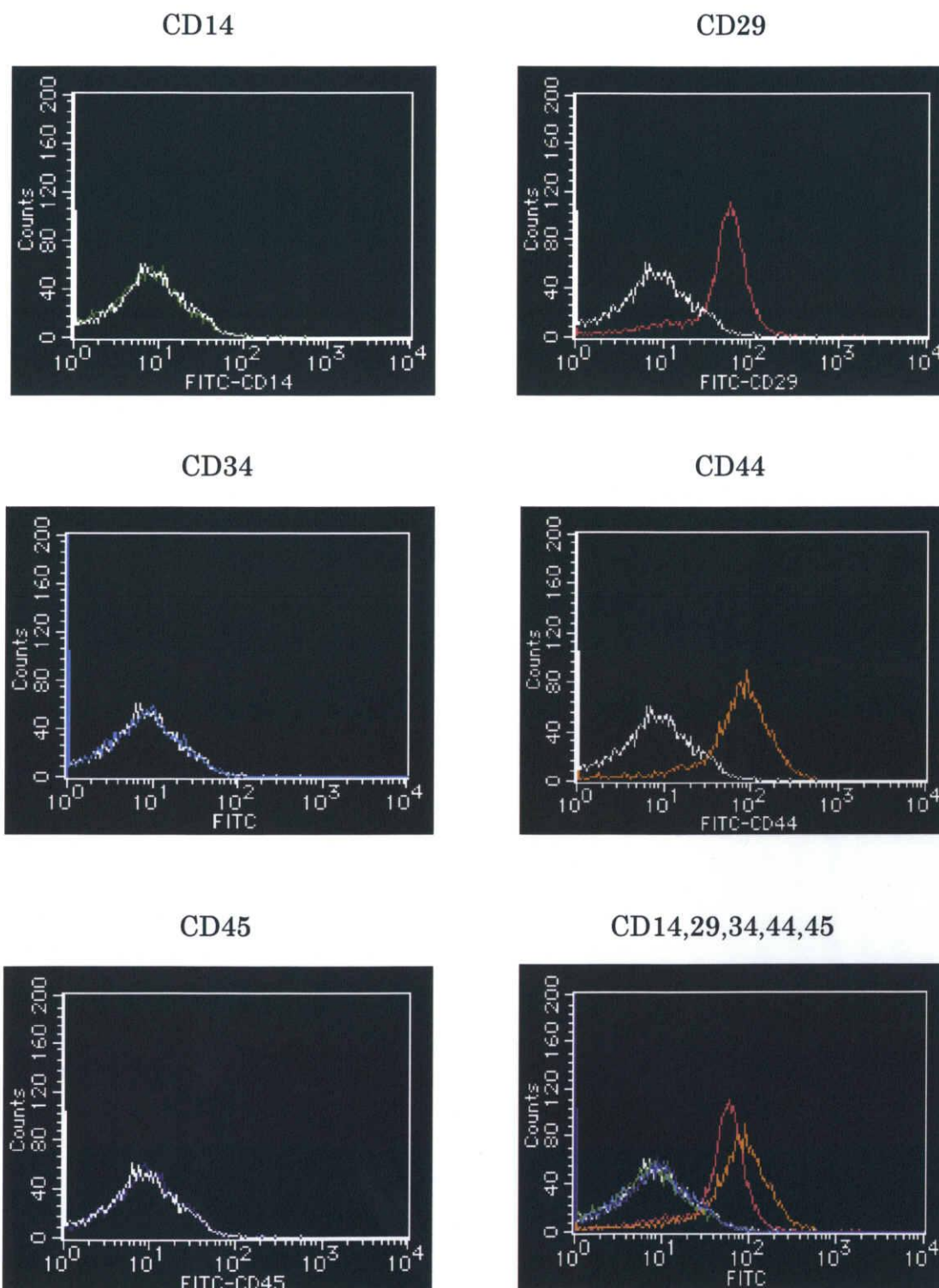


図 4-4B. 間葉系幹細胞の表現抗原測定結果—継代5代目—

<継代6代目>

間葉系幹細胞の継代6代目での表面抗原を示した。

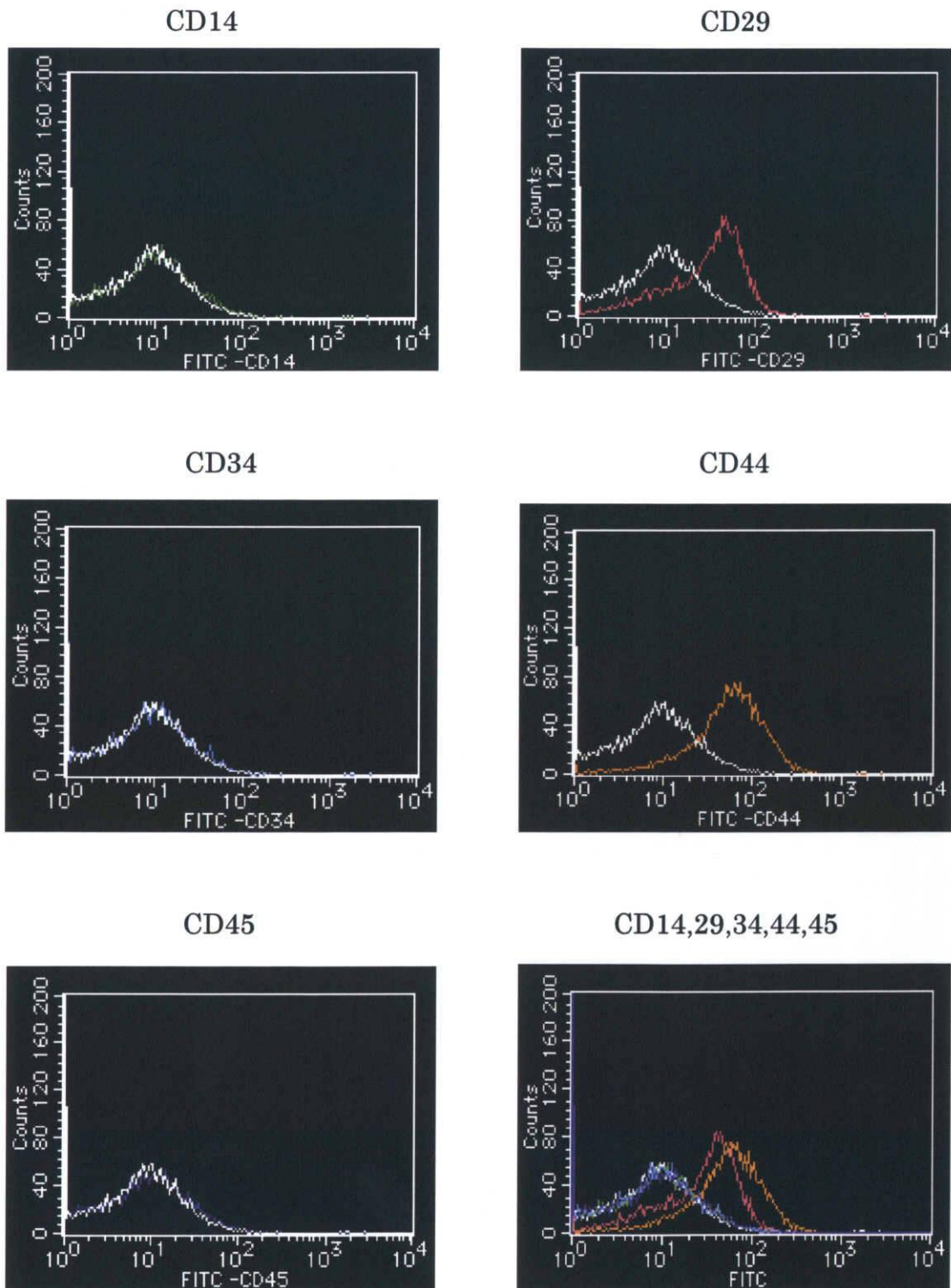


図 4-5B. 間葉系幹細胞の表現抗原測定結果—継代6代目—

4-2. 間葉系幹細胞の骨細胞分化誘導実験結果

細胞足場として、水、エラスチン、I型コラーゲンを使用したときの AIP 活性を酵素染色法によって評価した結果を示した。測定は、培養 3、7、11、14、18、20 日後に行った。未分化維持用培地で培養したときは、AIP の発現は見られなかった。

<未分化培養>

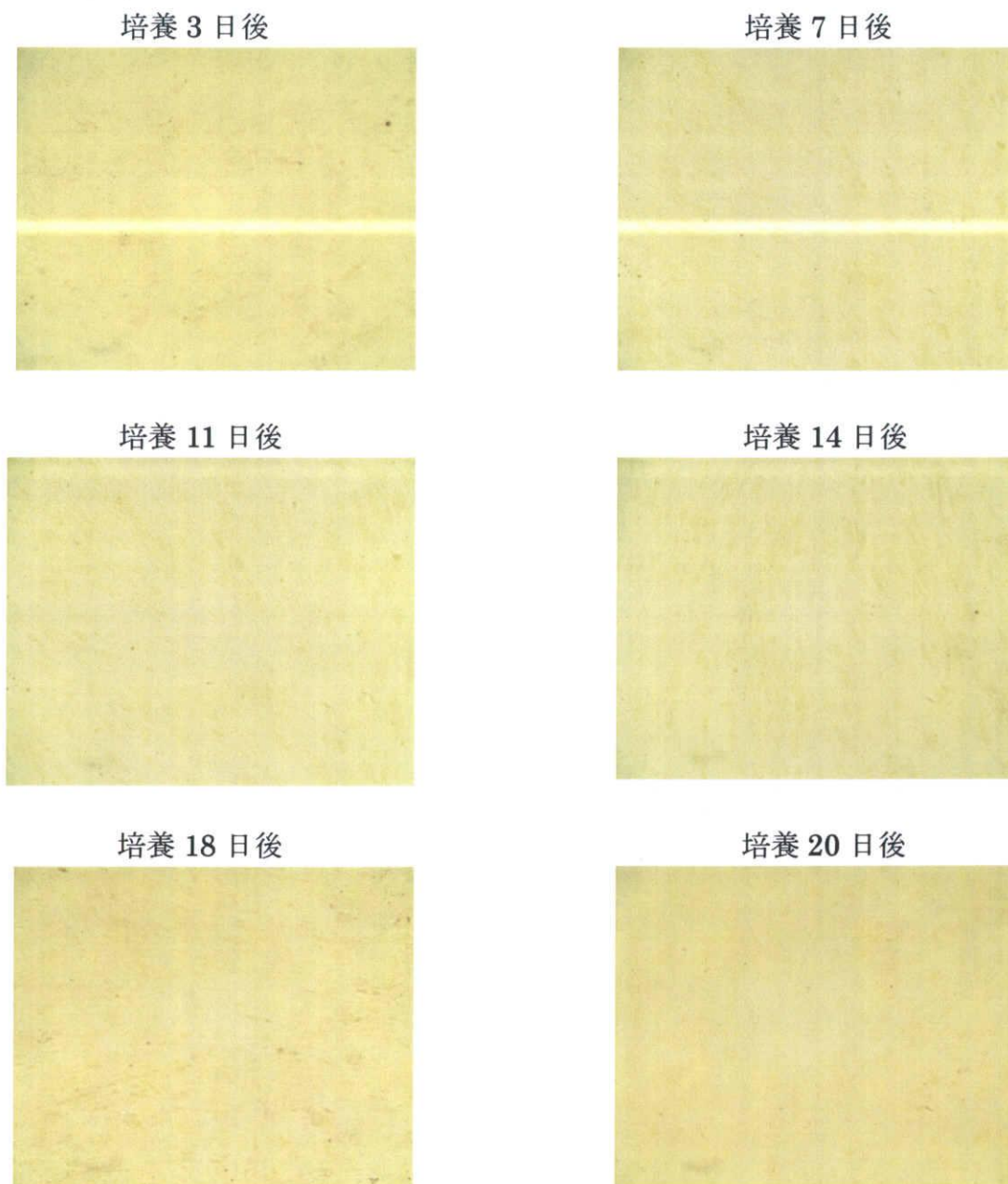


図 3-6B. 未分化維持用培地での AIP 活性測定結果

<骨細胞分化培養-水->

水コート上で骨細胞分化誘導用培地を用いて培養したときの AIP 活性を測定した結果を示した。培養日数に比例して、AIP 量の上昇が確認された。

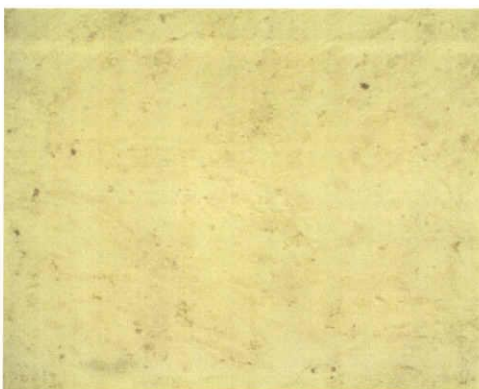
培養 3 日後



培養 7 日後



培養 11 日後



培養 14 日後



培養 18 日後



培養 20 日後

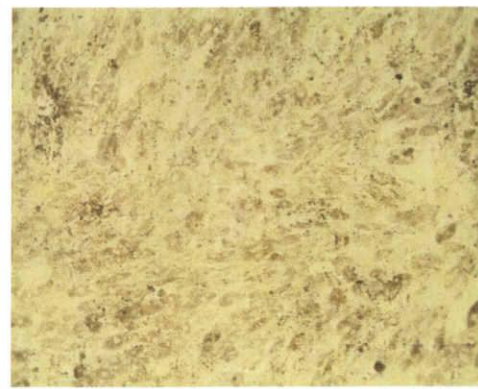


図 3-7B. 骨細胞分化誘導用培地での AIP 活性測定結果

<骨細胞分化培養- I 型コラーゲン->

I 型コラーゲン上で骨細胞分化誘導用培地を用いて培養したときの AIP 活性を測定した結果を示した。培養日数に比例して、AIP 量の上昇が確認された。

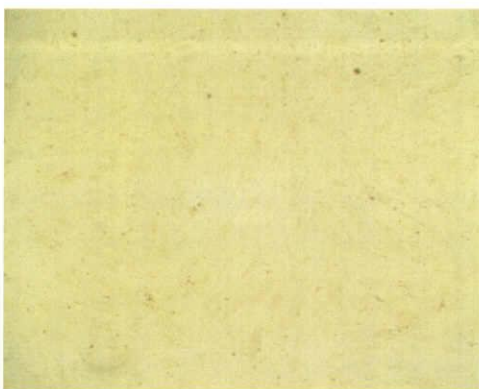
培養 3 日後



培養 7 日後



培養 11 日後



培養 14 日後



培養 18 日後



培養 20 日後

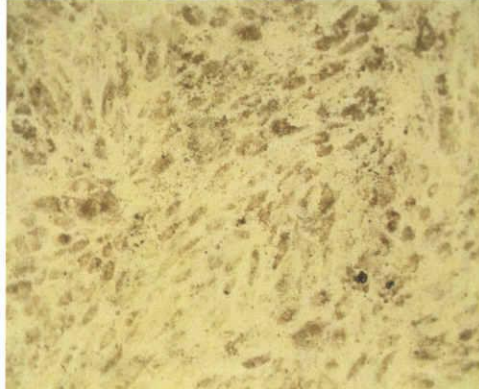


図 3-8B. 骨細胞分化誘導用培地 + I 型コラーゲン足場での AIP 活性測定結果

<骨細胞」分化培養-エラスチン>

エラスチン上で骨細胞分化誘導用培地を用いて培養したときの AIP 活性を測定した結果を示した。培養日数に比例して、AIP 量の上昇が確認されたが、その発現量は水コートと比べると若干低かった。

培養 3 日後



培養 7 日後



培養 11 日後



培養 14 日後



培養 18 日後



培養 20 日後



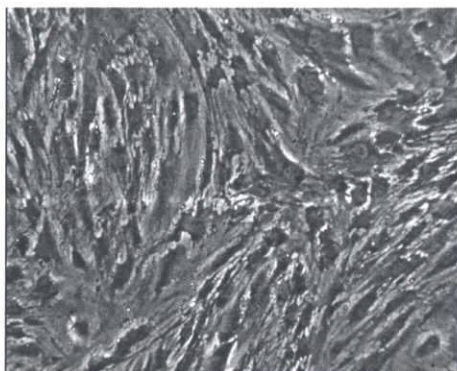
図 3-9B. 骨細胞分化誘導用培地+エラスチン足場での AIP 活性測定結果

<顕微鏡観察結果>

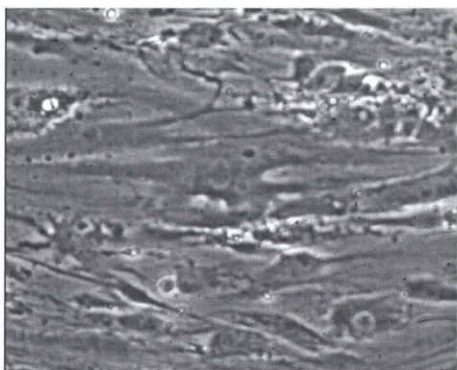
間葉系幹細胞を、未分化維持用培地を用いて培養したときは、特に変化は確認されなかった。骨細胞分化誘導用培地で培養した場合は、14 日後から白い沈殿(石灰化)が確認された。

《未分化維持》

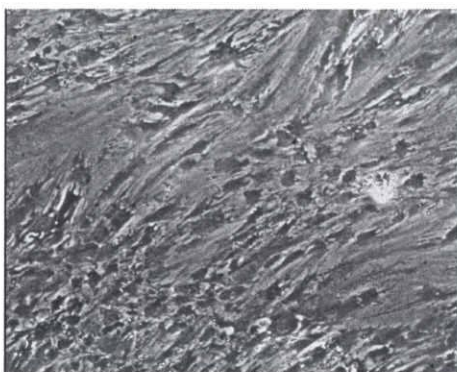
培養 7 日後



培養 14 日後

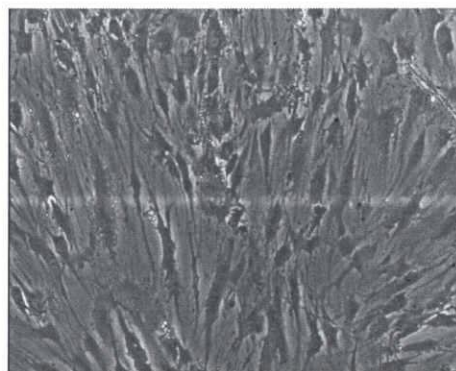


培養 21 日後

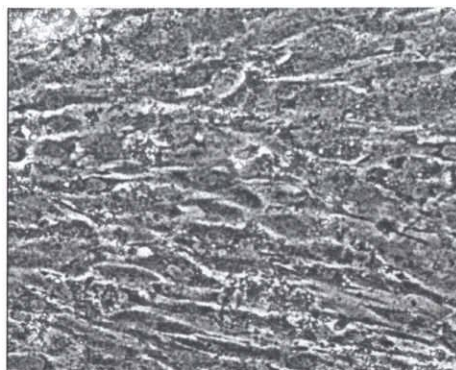


《分化誘導》

培養 7 日後



培養 14 日後



培養 21 日後



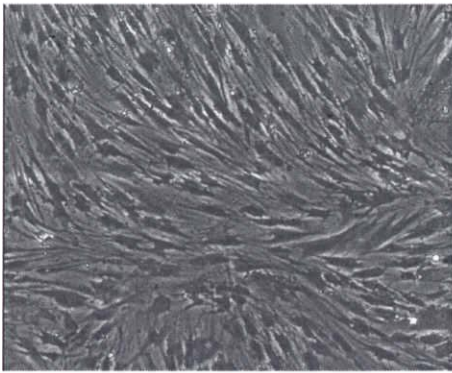
図 3-10B. 間葉系幹細胞の顕微鏡観察結果(未分化・骨細胞分化)

<顕微鏡観察>

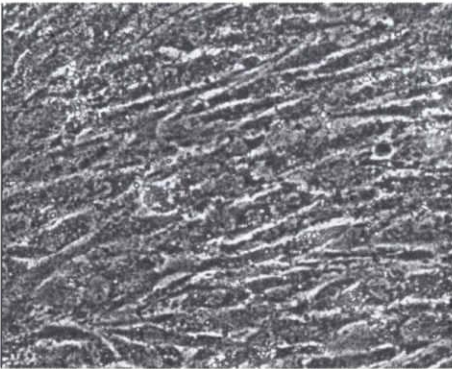
I型コラーゲンやエラスチンで影響を与えた場合は、14日後から白い沈殿(石灰化)が確認された。

《I型コラーゲン》

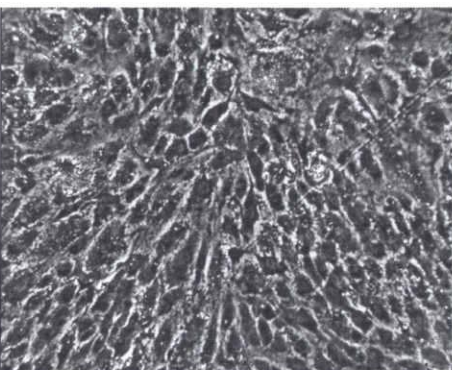
培養7日後



培養14日後



培養21日後

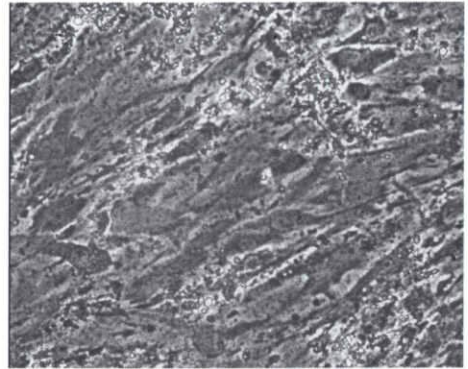


《エラスチン》

培養7日後



培養14日後



培養21日後

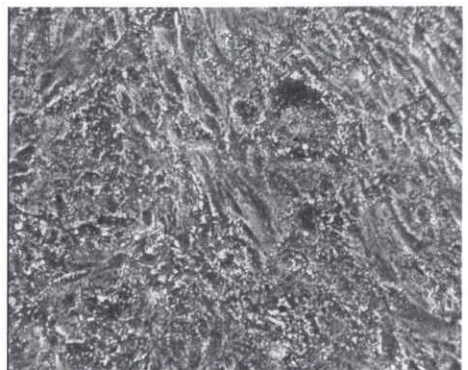


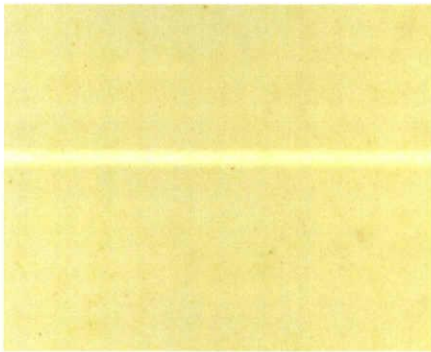
図 3-11B. 間葉系幹細胞の顕微鏡観察結果(I型コラーゲン・エラスチン)

4-3. ゲルコート上細胞培養実験結果

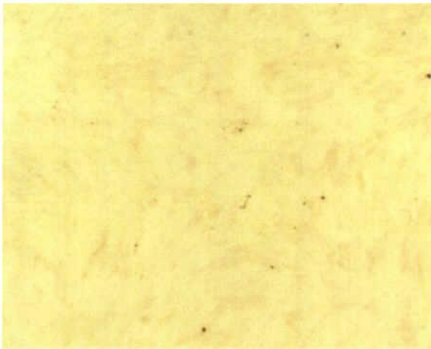
I型コラーゲン・ゲル上で細胞を培養したときの AIP 活性測定結果を以下に示した。測定は、培養 6、12、18 日後に行ったが、通常の骨細胞分化誘導培養に比べて、コラーゲン・ゲル上で培養した場合は高い AIP 活性が確認できた。

《通常培養》

培養 6 日後



培養 12 日後

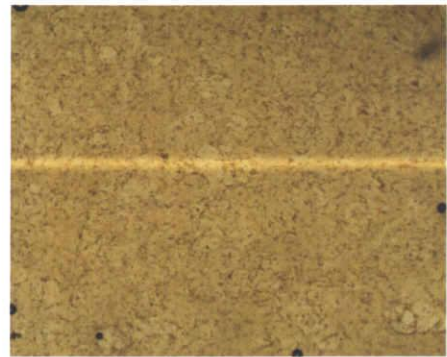


培養 18 日後



《コラーゲン・ゲル上培養》

培養 6 日後



培養 12 日後



培養 18 日後



図 3-12B. コラーゲン・ゲル上培養での AIP 活性測定結果

5. 考察

1. 間葉系幹細胞の同定

間葉系幹細胞の同定には表面抗原 CD14, CD29, CD34, CD44, CD45 の測定を行った。CD14 は骨髄単球系細胞、マクロファージ、B リンパ球、好中球などに、CD29 はインテグリン $\beta 1$ 鎖に、CD34 は胚性幹細胞や造血幹細胞に、CD44 は血小板・肝細胞・心筋など以外のほとんどの細胞に、CD45 は全ての白血球にそれぞれ発現している抗原である。間葉系幹細胞はこれらの抗原に対して、CD14,34,45 に陰性、CD29,44 に陽性の性質を示すことが知られており、これを間葉系幹細胞の指標とした。

測定の結果、継代2代目～4代目までは表面抗原の発現傾向に大きな差は見られなかったが、5代目から陽性発現抗原である CD29 と CD44 の発現量が弱くなっていった。CD14、CD34、CD45 の陰性発現抗原に関しては全く変化しなかった。

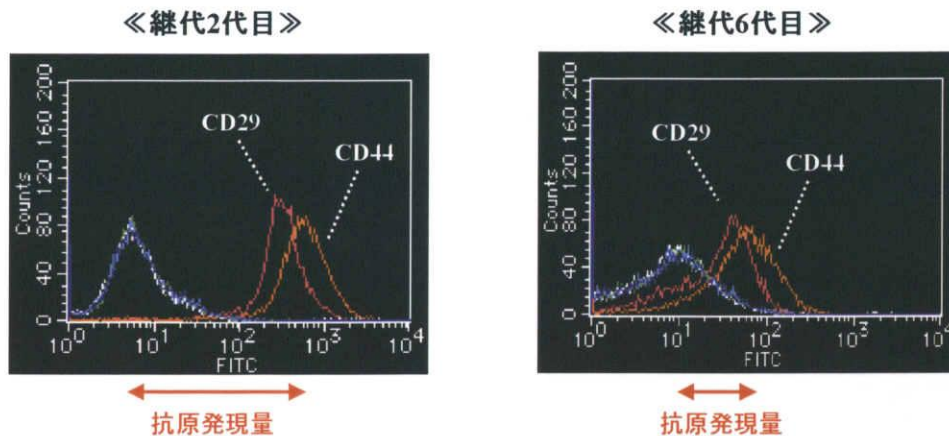


図 5-1B. 間葉系幹細胞の表面抗原の変化

このように、陽性・陰性の発現傾向には変化はなかったが発現量の減少が確認されたことから、間葉系幹細胞を単層培養 (3ng/ μ l bFGF + 10%FBS/DMEM 培地) を使用し、37°C / 5%CO₂ インキュベーター、播種数 5000cells/cm² 条件) した場合、継代 4 代目までは同一条件として研究に用いることができると考えられる。

細胞の分化には、培養密度や培地の種類、継代回数なども影響してくると考えられる。今回の結果のように CD 抗原の発現量だけが変化したことについては、培養が生体外での単層培養であったことが影響している可能性がある。本来の生体内での細胞培養と生体外での二次元的な培養では大きく条件が異なるため、本来の器官や組織の発現が三次元的に構築されるとすると、生体外の培養条件では、その一部分しか再現できていないことが予測される。今後は、より生体内に近い三次

元的な培養法を開発し、それと比較しながらの研究が必要とされる。

2. 間葉系幹細胞の骨細胞分化誘導実験

通常の細胞培養シャーレに間葉系幹細胞を単層培養し、培地中に 100nM デキサメタゾン、10mM β -リン酸グリセロール、0.05mM アスコルビン酸、10%の血清(FBS)を加えることで骨芽細胞を経て骨細胞に分化する。このとき骨細胞に特異的な特徴として、AIP 活性化、オステオカルシンの発現、細胞の石灰化、転写因子 Runx2 の発現などが観測されることが知られている。今回は、骨細胞への分化指標として、AIP の活性化を測定した。

間葉系幹細胞を未分化維持用培地(3ng/ μ l bFGF + 10%FBS/DMEM)により約 3 週間培養した結果、AIP の発現は確認できなかった。それに対して、骨細胞分化誘導用培地(100nM デキサメタゾン + 10mM β -リン酸グリセロール + 0.05mM アスコルビン酸 + 3ng/ μ l bFGF + 10%FBS/DMEM)で約 3 週間培養した場合は、培養 12 日後から徐々に AIP が発現し、培養日数が進むにつれてその発現量の増加が確認された。また、培養 14 日後前後から細胞周辺に白い沈殿物が確認された。詳細は不明だが、骨細胞特有の石灰化(カルシウムの沈殿)ではないかと考えられる。これらの結果から、本研究の培養条件においては、約 2 週間で間葉系幹細胞が骨細胞に分化することが示唆された。

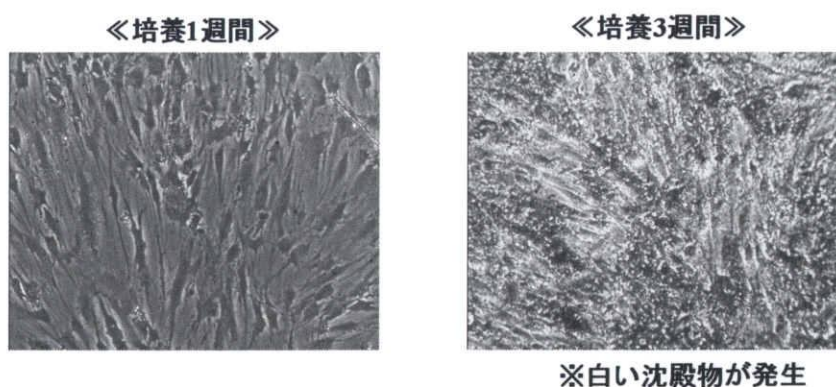


図 5-2B. 培養日数による間葉系幹細胞の変化

次に、細胞培養シャーレに 0.1mg/ml の I 型コラーゲン、0.1mg/ml のエラスチンをそれぞれコーティングし、その上で間葉系幹細胞を培養したときの分化・増殖変化の違いを確認した。細胞培養には骨細胞分化誘導用培地を用いて、コーティング以外の培養条件は上記の場合と同様にして行った。測定の結果、I 型コラーゲンコートの場合は、12 日後から AIP の発現が見られ、その後は培養日数に従い発現量は増加した。エラスチンコートでは、培養 11 日後から AIP の発現が見られ、そ

の後も発現量は増加したが、エラスチンコートやコートなしでの骨細胞分化誘導培養と比較すると、その発現量が少量であったから、骨細胞分化が抑制されていることが示唆された。

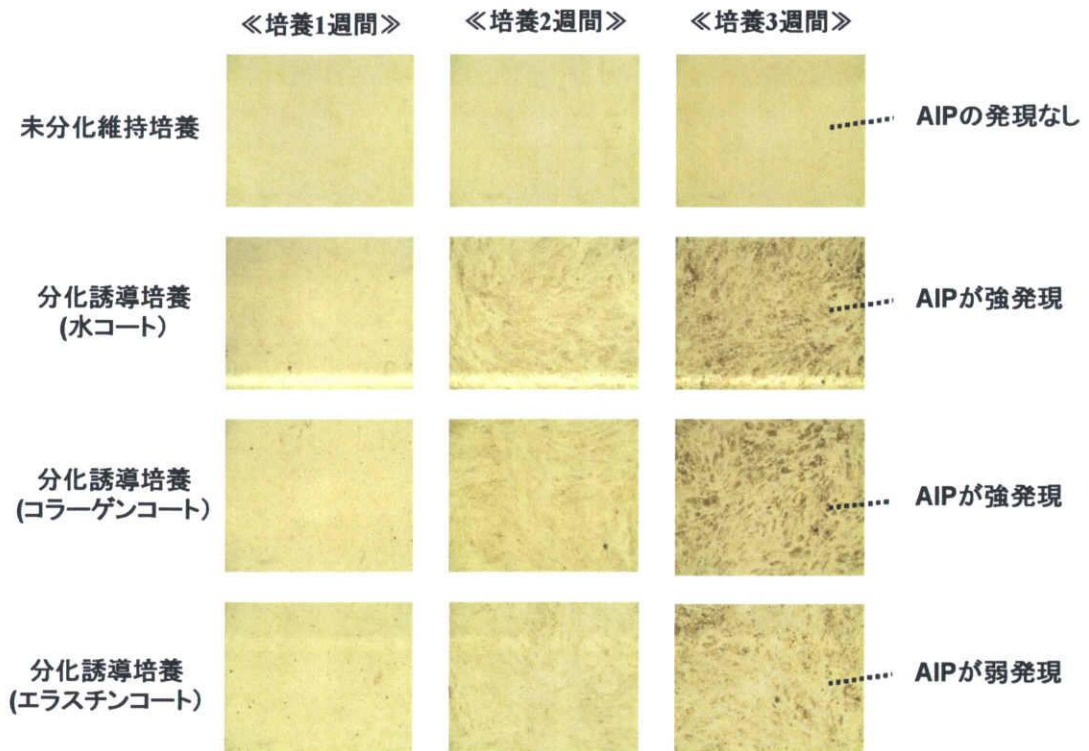


図 5-3B. AIP の発現量の変化

間葉系幹細胞からの骨細胞分化に影響するシグナル伝達経路として、cAMPの上昇からの PKA 活性化経路と、G タンパクやインテグリンを介した MAP キナーゼ活性化経路などが報告されている。エラスチンやコラーゲンからの影響がどのような経路をたどって細胞内に伝達されるかの詳細は明らかではないが、エラスチンからの伝達に関して、G タンパクを刺激して cAMPの増加を抑制するという報告がある⁸⁷⁾。このことから、エラスチン刺激により、骨細胞分化の経路の一つと考えられる cAMPからのシグナル伝達を阻害し、結果として骨細胞分化を抑制したのではないかと考えられる。しかし、完全に分化が抑制されたわけではないことから、骨細胞分化が cAMP経路だけではなく MAP キナーゼ伝達経路などと複合的に働いていることが予測される。I 型コラーゲンにおいては、インテグリンを介した MAP キナーゼの活性化が知られており、骨細胞分化誘導への影響が示唆される。

今後、cAMP経路、MAP キナーゼ経路に注目して、これらの経路の阻害剤を用いた間葉系幹細胞から骨細胞への分化シグナル伝達経路の確定が必要とされる。

3. ゲルコート上細胞培養実験

コラーゲン・ゲル上培養では、細胞はコラーゲンを細胞接着因子として利用して単層様に増殖する。本実験は、I型コラーゲンから細胞接着因子(インテグリン)を介した、間葉系幹細胞の骨細胞分化を確認する目的で行った。骨細胞分化誘導用培地を使用し、コラーゲン・ゲル上で間葉系幹細胞を培養した場合、6日後にはAIP発現が確認された。

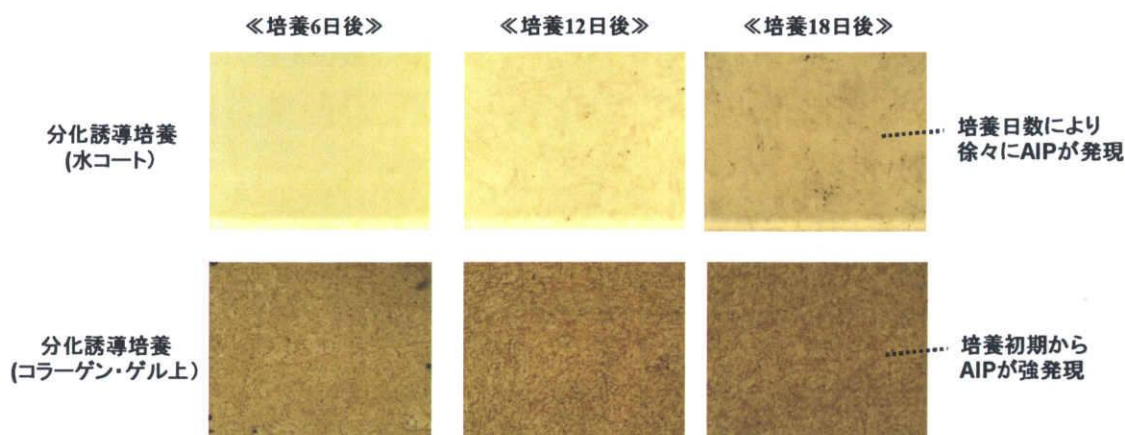


図 5-4B. コラーゲン・ゲル上での間葉系幹細胞培養

このことから、間葉系幹細胞に接着因子としてI型コラーゲンが作用した場合、間葉系幹細胞の骨細胞への分化が促進されることが示唆された。このとき、分化誘導のシグナル伝達経路にはインテグリンが関与することが考えられる。インテグリンを介したECMからの刺激の伝達には、FAK、Sosを經由し、Srcからrasを活性化させる経路が知られている。その後、raf、MEK、ERKとMAPキナーゼのカスケードを活性化していく。このMAPキナーゼ経路の活性化が骨細胞分化誘導に関与していることが報告されており、この経路の活性化因子の一つとして、I型コラーゲンが関与するのではないかと考えられる。また、骨細胞分化の抑制経路として、GタンパクからのcAMP経路の阻害が報告されている。つまり、エラスチンの影響によって骨細胞分化誘導の経路として知られているcAMP活性経路を阻害することで骨細胞への分化を抑制したのではないかと考えられる。

本研究から、間葉系幹細胞の骨細胞への分化に関して、エラスチンとI型コラーゲンの影響が確認された。今後、分化制御に関する詳細な機構を解明するために、MAPキナーゼ・cAMP活性経路の阻害剤や、三次元培養時の細胞の挙動の変化を測定することが必要となる。

図 5-5B に骨細胞分化制御の機構についてまとめた。

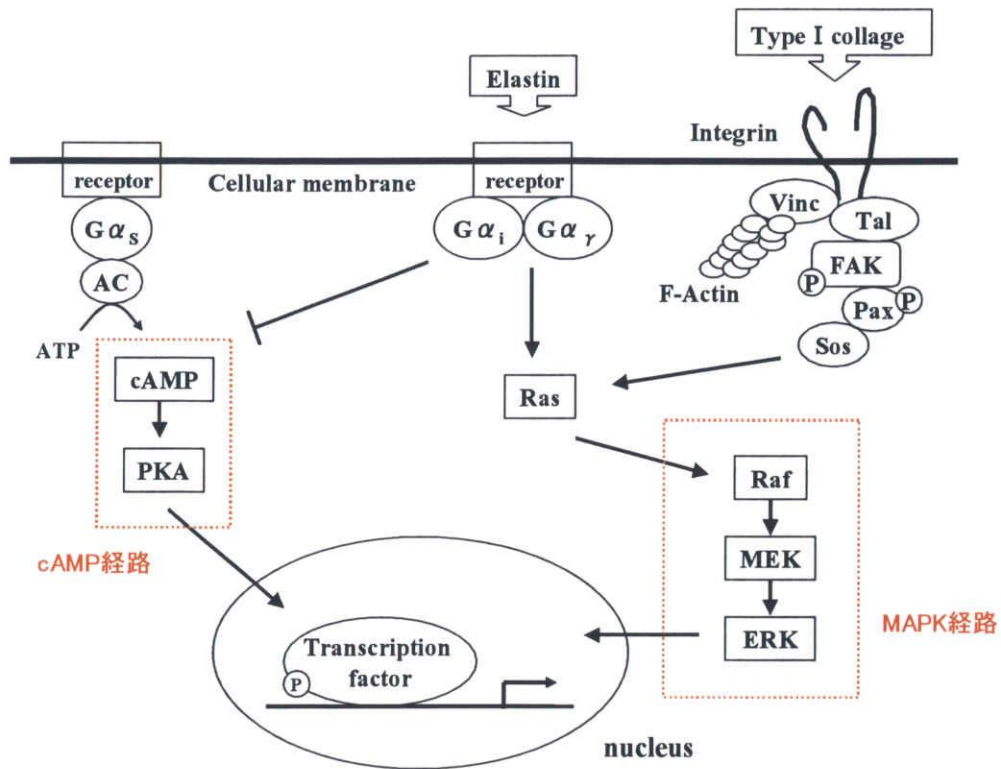


図 5-5B. 骨細胞分化制御に関するシグナル伝達機構

6. 結論

間葉系幹細胞の骨細胞分化制御について以上のことが確認できた。

1. エラスチンにより分化制御
2. I型コラーゲンにより分化促進

この結果から、骨細胞への分化にはインテグリンを介した ECM からの刺激が関与することが示唆された。

この分化制御機構の詳細を確認するために、シグナル伝達の阻害因子を用いた研究を行っていくと同時に、骨細胞分化の制御に大きく関与することが報告されている微小重力環境下での骨細胞分化制御研究を行っていく。

7. 参考文献

第1部. グルコースポリマー透析液の生体適合性研究

- 1) Fresenius Medical Care: 末期腎不全患者に関する世界的展望(2003)
- 2) 飯田 喜俊: EBM 血液浄化療法 / 金芳堂(2000)。
- 3) 飯田 喜俊: 臨床透析ハンドブック第3版(2002)
- 4) 日本透析医学会 (<http://www.dotoseki.net/kannren.htm#wagakuni>)
- 5) 鈴木 洋通: 一目でわかる透析療法(1999)
- 6) 国立循環器病センター (<http://www.ncvc.go.jp/cvinfo/Sick/sick5.html>)
- 7) Rippe B ,*et al* : Computer simulations of ultrafiltration profiles for an icodextrin-based peritoneal fluid in CAPD. *Kidney int*, 2000; 57:2546-2556
- 8) Rippe B ,*et al* : Computer simulations of peritoneal fluid transport in CAPD. *Kidney Int*, 1991; 40:315-325
- 9) Wang T ,*et al* : Peritoneal fluid and solute transport with different polyglucose formulations. *Perit Dial Int*, 1998; 18:193-203
- 10) Frampton JE ,*et al* : Icodextrin: A review of its use in peritoneal dialysis. *Drugs*, 2003; 63:2079-2105
- 11) Ho-Dac-Pannekeet MM ,*et al* : Peritoneal transport characteristics with glucose polymer based dialysate. *Kidney Int*, 1996; 50:979-986
- 12) Konings CJAM ,*et al* : Effect of icodextrin on volume status, blood pressure and echocardiographic parameter: A randomized study. *Kidney Int*, 2003; 63:1556-1563
- 13) Ronald A ,*et al* : Quantitation of dextran 70 in peritoneal dialysate from patients administered 7.5% polyglucose. *J Chromatogr B*, 1998; 23:115-120
- 14) Waart DR ,*et al* : Icodextrin Degradation Products in Spent Dialysate of CAPD Patients and the Rat, and its Relation with Dialysate Osmolality. *Perit Dial Int*, 2001; 21:269-274
- 15) Wilkie M: Icodextrin – what about the fractions. *Perit Dial Int*, 2005; 25:161-162
- 16) Gotloib L ,*et al* : Mesothelial dysplastic changes and lipid peroxidation induced by 7.5% icodextrin. *Nephron*, 2002; 92:142-155
- 17) Gotloib L ,*et al* : Acute oxidative stress induces peritoneal hyperpermeability, mesothelial loss, and fibrosis. *J Lab Clin Med*, 2004; 143:31-40
- 18) Erixon M ,*et al* : PD fluids contain high concentrations of cytotoxic GDPs directly after sterilization. *Perit Dial Int*, 2000; 24:392-398
- 19) Tomo T ,*et al* : Evaluation of several saccharides as osmotic agent for peritoneal dialysate. *Perit Dial Int*, 2000; 20:727-733

- 20) Sakurai T ,*et al* : Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein.*FEBS lett*, 1988; 236:406-410
- 21) Gotloib L ,*et al*: High glucose induces a hypertrophic, senescent mesothelial cell phenotype after long in vivo exposure.*Nephron*, 1999; 82:164-173
- 22) Moberly JB ,*et al*: Pharmacokinetics of icodextrin in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int*, 2002; 62:23-33
- 23) Mujais S: Profiling of peritoneal ultrafiltration. *Kidney Int*, 2002; 62(81):17-22

第2部.間葉系幹細胞の間葉系幹細胞の分化・増殖制御技術の開発

- 24) 岡野 栄之: ES細胞を制御する最新テクニック／羊土社(2005)
- 25) 朝比奈 欣治: 絵とき再生医学入門／羊土社(2004)
- 26) 上野 直人: 発生・再生イラストマップ／羊土社(2005)
- 27) 横田 崇: 再生医学がわかる／羊土社(2002)
- 28) 室田 誠逸: 再生医学・再生医療／東京化学同人(2002)
- 29) 浅島 誠: 再生医学と生命科学－生殖工学・幹細胞工学・組織工学／共立出版(2000)
- 30) Jonathan Slack: エッセンシャル発生生物学／羊土社(2002)
- 31) Jeong-Soo Park ,*et al*: Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells.*Mech Aging Dev*, 2005; 126:551-559
- 32) Melissa A ,*et al*: Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells following In Vitro Expansion.*Stem Cells*, 2004; 22:675-682
- 33) Bruder SP ,*et al*: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.*J Cell Biochem*, 1997; 64:278-294
- 34) Pittenger MF ,*et al*: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.*Science*, 1999; 284:143-7.
- 35) Rickard DJ,*et al*: Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol*. 1994 ; 161:218-28.
- 36) Makino S,*et al*: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999; 103:697-705.
- 37) Woodbury D,*et al*: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000; 61:364-70.

- 38) Lisignoli G ,*et al*: Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold. *Biomaterials*,2005; 28:5677-86
- 39) Lisignoli G ,*et al* : Chondrogenic differentiation of murine and human mesenchymal stromal cells in a hyaluronic acid scaffold: differences in gene expression and cell morphology. *J Biomed Mater*,2006; 77:497-506
- 40) Yoshimi O ,*et al*: Cartilaginous Tissue Formation From Bone Marrow Cells Using Wall Vessel(RWV) Bioreactor. *Biotechnol Bioeng*,2006; 95:1003-1008
- 41) Chen G ,*et al*: Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in a cobweb-like biodegradable scaffold. *Biochem Biophys Res Commun*,2004;(322):50-55
- 42) Wang Y,*et al* : In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2005(26);7082-7094
- 43) Li WJ ,*et al*: Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterial*,2005; 26:5158-66
- 44) Yoneno K ,*et al*: Multidifferentiation potential of mesenchymal stem cells in three-dimensional collagen gel cultures. *J Biomed Mater Res A*,2005; 75:733-4
- 45) Betre H ,*et al*: Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials*,2006;(27):91-9.
- 46) Miyanishi K ,*et al*: Effects of Hydrostatic Pressure and Transforming Growth Factor-beta3 on Adult Human Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis. *In Vitro Tissue Eng*,2006
- 47) Furumatsu T ,*et al*: Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *J Biol Chem*,2005; 280:8343-50
- 48) Yano F ,*et al*: The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*,2005; 333:1300-8
- 49) 山本 雅:シグナル伝達イラストマップ／羊土社(2004)
- 50) 山本 雅:シグナル伝達研究 2005-’06／羊土社(2005)
- 51) Ryoo HM ,*et al*: Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*,2006; 366:51-7

- 52) Radio NM ,*et al* : Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res*, 2006; 40:332-42.
- 53) L Yuge ,*et al*: Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts. *Bioghem Bioph Res Co*, 2003; 311:32-38
- 54) L Yuge ,*et al*: Cell differentiation and p38^{MAPK} cascade are inhibited in human osteoblasts cultered in a three-dimensional clinostat. *In Vitro Cell. Dev. Biol*, 2003; 39:89-97
- 57) Li C ,*et al*: Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006; 27:3115-24
- 58) Yingjian Li, *et al*: Hepatocyte Growth Factor Is a Downstream Effector that Mediates the Antifibrotic Action of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Agonists. *Cell Biology*, 2006; 17:54-65
- 59) Suzawa M ,*et al*: Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nat Cell Biol*. 2003; 5(3):224-30.
- 60) Wilson E. M ,*et al*: Control of MyoD function during initiation of muscle differentiation by an autocrine signaling pathway activated by insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem*; 281: 29962-71
- 61) Cristino S ,*et al* : Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11-based prototype ligament scaffold. *J Biomed Mater Res A*, 2005;(73):275-83.
- 62) Li C ,*et al*: Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006; 27:3115-24
- 63) Cogoli A ,*et al*: Cell sensitivity to gravity. *Science*. 1984; 225(4658):228-30.
- 64) Pippia PA ,*et al*: ctivation signals of T lymphocytes in microgravity. *J Biotechnol*. 1996; 47:215-22.
- 65) Cogoli A ,*et al*: Effect of hypogravity on human lymphocyte activation. *Aviat Space Environ Med*. 1980; 51:29-34.
- 66) Lorenzi G ,*et al*: Effects of hypergravity on "whole-blood" cultures of human lymphocytes. *Aviat Space Environ Med*. 1986; 57:1131-5.
- 67) Limouse ,*et al* : MInhibition of phorbol ester-induced cell activation in microgravity. *Exp Cell Res*. 1991; 197:82-6.
- 68) de Groot RP ,*et al*: Microgravity decreases c-fos induction and serum response element activity. *J Cell Sci*. 1990; 97:33-8.

- 69) Schmitt DA, *et al*: The distribution of protein kinase C in human leukocytes is altered in microgravity. *FASEB J.* 1996; 10:1627-34.
- 70) Sato A, *et al*: Effects of microgravity on c-fos gene expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Adv Space Res.* 1999; 24:807-13.
- 71) Hatton JP, *et al*: The kinetics of translocation and cellular quantity of protein kinase C in human leukocytes are modified during spaceflight. *FASEB J.* 1999; 13:S23-33.
- 72) <http://idb.exst.jaxa.jp/jdata/02481/200310J02481050/200310J02481050.htm#2>.
3. 1 血管内皮細胞等を利用した重力感受・応答機構の解明
- 73) Brustle O, *et al*: Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, 1999; 285:754-6.
- 74) McDonald JW, *et al*: Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med.* 1999; 5:1410-2.
- 75) Goodell MA, *et al*: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med.* 1996; 183:1797-806.
- 76) Zhang SC, *et al*: In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2001; 19:1129-33.
- 77) Kawasaki H, *et al*: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron.* 2000; 28:31-40.
- 78) Nakano T, *et al*: Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science.* 1994; 265:1098-101.
- 79) Yamane T, *et al*: Development of osteoclasts from embryonic stem cells through a pathway that is c-fms but not c-kit dependent. *Blood.* 1997; 90:3516-23.
- 80) Ishizaka S, *et al*: Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. *FASEB J.* 2002; 16:1444-6
- 81) Kolossov E, *et al*: Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. *J Cell Biol.* 1998; 143:2045-56.
- 82) Lumelsky N, *et al*: Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 2001; 292:1389-94
- 85) 林 典夫: シンプル生化学 / 南江堂 (2003)
- 86) Bruce Alberts: THE CELL 細胞の分子生物学第3版 / Newton Press (1995)
- 87) Benjamin S, *et al*: Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: versus signal. *Trends Cell Biol.* 2004; 13:51-56

Appendix

- 88) 許 南浩:細胞培養なるほど Q&A/羊土砂(2004)
- 89) 中山 敬一:細胞周期がわかる/羊土社(2001)
- 90) 中山 敬一:細胞周期の最前線-明らかになるその制御機構/羊土社(2005)
- 91) 三浦 祐士:染色法のすべて/医歯薬出版(1988)
- 92) 坂口 孝司:試薬の調整法/廣川書店(1992)
- 93) 坂倉 照好:細胞接着のしくみと疾患/羊土社(1998)
- 94) 豊島 久真男:新細胞工学実験プロトコール(1991)
- 95) 中内 啓光:フローサイトメトリー自由自在/秀潤社(1999)
- 96) 中内 啓光:新版フローサイトメトリー自由自在/秀潤社(2004)
- 97) 大熊 勝治:フローサイトメトリー(1994)
- 98) 太田和雄:フローサイトメトリー -手技と実際- (1984)
- 99) Gel filtration -theory and practice-/Pharmacia Fine Chemicals

8. 謝辞

本修士論文を作成するにあたり、研究全般に加え日々の生活においても適切な助言および懇切なご指導を賜りました三重大学工学部 分子素材工学科 堀内 孝教授、宮本 啓一 助教授に対して、心より感謝いたします。また、本研究を進めていく上で実験方法、機器操作法等のご指導を賜りました、北海道大学 医学部 岩淵 和祥 助教授、三重大学 医学部 島田 康人 先生、遺伝子実験施設 近田 登美子 さん、チツソ株式会社 竹林 貴史 さん、ベクトン・ディッキンソン株式会社 大家 吉泰 さん、本研究に使用した間葉系幹細胞を提供して下さった広島大学 加藤 幸夫 先生に深く感謝いたします。

本研究に際して、共同で実験を行った那須 章仁君、研究室での生活をサポートして下さった村上 節子 さん、奥田 和子 さんをはじめ生体材料化学研究室の皆様方に深く感謝いたします。

最後に、三重大学大学院において共に研究に励んだ、門園 英樹 君、柴田 昌和 君、長尾 達郎 君、中野 雄介 君、坂野 真利 君に深く感謝すると共に、今後も変わらぬ付き合いができることを強く望みたいと思います。

平成 19 年 3 月
前田 尚悟

9. Appendix

9-1. 各種溶液の調整

1. 培地の調整

<使用機器・器具>

- ・pH/ION METER (D-53/HORIBA)
- ・吸引ポンプ (BR-21B/日機装)
- ・10 ml シリンジ (SS-10SZ/TERUMO®)
- ・注射針 (NN-2432R/TERUMO®)
- ・MILLEX®GP (SLGP033RS/MILLIPORE)
- ・STERICUP™ (SCGVU05RE/MILLIPORE)
- ・ウォーターバス (BT-15/Yamato)
- ・5 ml アシストチューブ (70335218019/アシスト)
- ・30 ml アシストチューブ (71314271019/アシスト)

<使用試薬>

- ・Medium 199 (M2154/SIGMA)
- ・F-12[Dulbecco's Modified Eagle's Mixture F-12 HAM](D6421/SIGMA、500ml)
- ・DMEM[Dulbecco's Modified Eagle's Medium] (D6046/SIGMA、500 ml)
- ・FBS[Fetal Bovine Serum] (KQM25242/MyClone、500 ml)
- ・PBS[Phosphate Buffered Saline] (D8537/SIGMA、500 ml)
- ・TRYPsin-EDTA SOLUTION (10x) (T4174/SIGMA、100 ml)
- ・bFGF[FGF basic] (HKW266081/R&D systems、25 µg)
- ・DTT[Dithiothreitol] (1261627/Invitrogen、500 µl)
- ・PS[Penicillin Streptomycin] (P0781/SIGMA)
- ・ITS[Insulin Transferin Selenate] (13146-5ML/SIGMA、5 ml)
- ・LG[L-Glutamine] (G7513/SIGMA)
- ・HC[Hydrocortisone] (H-0888/SIGMA)
- ・2mol/L NaOH aq (196-05635/WAKO、500 ml)
- ・5mol/L HCl aq (081-05435/WAKO、500 ml)

<操作>

- 中皮細胞培養用培地:M199
- 繊維芽細胞培養用培地:F-12

○間葉系幹細胞培養用培地:DMEM

①ITS、LGそれぞれ5 mlを15 mlチューブにまとめて、HCとITSを50 μ lずつ加えた。

②0.22 μ m フィルターにて滅菌後、培地に加えた。

※細胞培養時は、10 %FBS を加えた。

間葉系幹細胞を培養時は、10% FBS と 3 ng/ml 濃度のbFGF を加えた。

<pHの調整>

培地のpHが正常値(pH7.35~pH7.40)でない場合、pHの調整を行った。

①酸性側の場合はNaOH aq(1N)を、塩基性側の場合はHCl aq(1N)を添加した。

②添加後、培地全体を0.22 μ l フィルターにかけた。

<FBSの不活化・分注・保存>

① -20℃にて凍結保存されているFBSを37℃のウォーターバスに浸し、振り混ぜながら溶かした。

② 完全に溶かし終わったら、数回振り混ぜた。

③ 55~56℃のウォーターバスで30分間加熱した。(非働化)

④ STERICUP™にてフィルター滅菌し、30 mlチューブに20~25 mlずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌操作で行った。

⑤ -20℃の冷凍庫にて保存した。

※血清の非働化について⁸⁸⁾

血清は血液を凝固させてその上澄みをとったもので、様々な細胞増殖促進物質、細胞障害保護因子、栄養因子などがふくまれる。血清に含まれる補体成分が活性化されると、細胞に障害を与えることがあるため、血清を56℃で30分間加熱して補体成分を不活性化させる。

<各 supplement の保存>

・ITS[Insulin Transferin Selenate]

液体状ITSを分注し、4℃で保存した。

・HC[Hydrocortisone]

HCの粉末2 mgを量り取り、無水EtOHとDEPC処理水をそれぞれ1 mlずつ加えて溶解させたものをMILLEX®GPにて濾過、分注した。

・PS[Penicillin Streptomycin]

5 mlずつ分注し、-20℃で保存した。

・LG[L-Glutamine]

5 ml ずつ分注し、4°Cで保存した。

・bFGF[FGF basic]

2.475 ml の 0.1% BSA/PBS 溶液に 0.1M DTT を 25 μ l と bFGF を 25 μ g 加えた後、チューブに分注し、-20 ~ -70°Cで保存した。

2. TRYPSIN-EDTA SOLUTION の分注、保存

①納品後、凍結(-20°C以下)で保存した。

②5 ml アシストチューブに 4 ml ずつ分注し、-20°Cにて保存した。

3. DEPC 処理水の作成

① Milli-Q 水を密閉できるガラスビン(500 ml メディウムビン)に入れた。

② 500 ml の Milli-Q 水に対し DEPC を 500 μ l(0.1%)加え、蓋をきっちり締めてよく振り混ぜた。

※DEPC は発癌性があるため、この作業は全てドラフト内で行った。

③ そのまま 37°Cのオープン内に入れ、2 時間加温した。加温の途中で何回か振り混ぜた。(DEPC が均一に広がり、全体の RNase が失活する)

④ ビンの蓋を十分緩めて、121°C/40 分(1 本あたり 500 ml の場合) 高圧蒸気滅菌にかけた。

4. 滅菌水の作成

① 脱イオン水を密閉できるガラスビン(赤蓋の 1L メディウムビン)に入れた。

② 蓋をきっちり締めた後、滅菌テープで封印し 121°C/40 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

9-2. 初代培養(primary culture)

生体から細胞や組織を分離して体外で培養して、最初の継代を行うまでのものを初代培養いう。初代培養の注意点として、元の組織や臓器が多種類の細胞で構成されているため、得られる細胞集団は均一ではないということが挙げられる⁸⁸⁾。本研究で使用したヒト腹膜中皮細胞(HPMC)は、予め本学医学部倫理委員会にて採取についての承認を受けた大網組織に由来し、初代培養によって中皮細胞と繊維芽細胞が採取できる。

<使用機器・器具>

- ・ CO₂ インキュベーター (10-0212 / 池本理科工業)
- ・ FORCED CONVECTION OVEN (DRS620DA / ADVANTEC)
- ・ KUBOTA 2010 (RD3132 / 株式会社久保田製作所)
- ・ 攪拌遠心機 (2790001 / LABINCO)
- ・ ウォーターバス (BT-15 / Yamato)
- ・ Vortex (S-100 / TAITEC)
- ・ 25 cm² 培養フラスコ (MS-21050 / 住友ベークライト株式会社)
- ・ 15 ml チューブ (MS-56150 / 住友ベークライト株式会社)
- ・ 50 ml チューブ (MS-56500 / 住友ベークライト株式会社)
- ・ 10 ml ピペット (MS-66100 / 住友ベークライト株式会社)

<使用試薬>

- ・ Medium 199 (M2154 / SIGMA, 500 ml)
- ・ FBS [Fetal Bovine Serum] (KQM25242 / MyClone, 500 ml)
- ・ PBS [Phosphate Buffered Saline] (D8537 / SIGMA, 500 ml)
- ・ TRYPSIN-EDTA SOLUTION (10x) (T4174 / SIGMA, 100 ml)

<準備>

- ① 50 ml チューブを、予想される組織の切片の数分用意し、各切片を区別するためにチューブに系列番号を記入する。さらに一連の採取操作を3回繰り返すため、それらを3セット分用意し、セットごとに採取操作番号を記入した。
- ② 10% trypsin/PBS 溶液を必要量作製し、20 ml ずつ各チューブに入れた。
- ③ 25 cm² 培養フラスコを、10% FCS/M199 溶液を 5 ml ずつ入れ、37.0°C/5.0%CO₂ にてプレインキュベートした。
- ④ 50%FBS/M199 溶液を必要量作製した。

<操作>

- ① 滅菌済手術用器具一式の中身(滅菌糸以外)を蓋の上に出し、空いた金属トレイに PBS 溶液を 500 ml 入れた。
- ② すぐさま組織を PBS 溶液中に浸し、切断箇所を滅菌糸で固く縛り、縛った箇所の間を滅菌済ハサミにて切断し、細胞を切り分けた。
- ③ 予め用意した 10% trypsin/PBS 溶液 20 ml 中に、切断した組織の切片を浸し、攪拌遠心機を用いて回転させながら 37°C/20 分インキュベートした。
- ④ ③の操作を3回繰り返した。

※全3回の採取操作後、組織の切片は塩素系漂白剤に1時間程度浸してから処分した。

- ⑤ ③の後、組織の切片を取り出した後のチューブは、750 rpm で5分遠心分離を行った。
- ⑥ 上澄み液を除去した後、50%FBS/M199 溶液を2 ml 加え Vortex で攪拌し、再び750 rpm で5分遠心分離を行った。
- ⑦ 上澄み液を除去した後、10% FBS/M199 溶液を1 ml 加え十分なピペッティングを行い、プレインキュベートしたおいた 25 cm² 培養フラスコにそれぞれ播種した。

9-3. 継代培養(Passage culture)

細胞培養を開始すると、一般的には以下の4つの期間から成る増殖曲線をたどって増殖する。

- ①遅滞期(lag phase): 播種直後の新しい環境への適応のため増殖しない状態
- ②対数増殖期(logarithmic growth phase): 細胞が活発に増殖する状態
- ③定常期(stationary phase): 接着阻止が起こり、増殖が停止した状態
- ④死滅期(death phase): 死に始めた状態

遅滞期、対数増殖期では細胞数が少なく、定常期に入ると接着阻止のストレスにより良好な培養状態の維持が困難であるため、対数増殖期後期に継代培養を行うのが最も適している⁸⁸⁾。

<使用機器・器具>

- ・ CO₂ インキュベーター (10-0212/池本理科工業)
- ・ KUBOTA 2010 (RD3132/株式会社久保田製作所)
- ・ MICROTUBE MIXER (EM-36N/TAITEC)
- ・ ウォーターバス (BT-15/Yamato)
- ・ Vortex (S-100/TAITEC)
- ・ 吸引ポンプ (BR-21B/日機装)
- ・ オリンパス倒立型顕微鏡 (CK2/OLYMPUS)
- ・ 75 cm² 培養フラスコ (MS-21250/住友ベークライト株式会社)
- ・ φ35 mm シャーレ (MS-80240/住友ベークライト株式会社)
- ・ 6 穴プレート (MS-80240/住友ベークライト株式会社)
- ・ 24 穴プレート (MS-80240/住友ベークライト株式会社)
- ・ 96 穴プレート (MS-80240/住友ベークライト株式会社)
- ・ 8 穴チャンバー (nunc/177445)

- ・ 15 ml チューブ (MS-56150/住友ベークライト株式会社)
- ・ 50 ml チューブ (MS-56500/住友ベークライト株式会社)
- ・ 10 ml ピペット (MS-66100/住友ベークライト株式会社)
- ・ セルスクレーパー (住友ベークライト株式会社/MS-93170)
- ・ Counting chamber (03-202-1/Erma)

<使用試薬>

- ・Medium 199 (M2154/SIGMA、500 ml)
- ・DMEM[Dulbecco's Modified Eagle's Medium] (D6046/SIGMA、500 ml)
- ・FBS[Fetal Bovine Serum] (KQM25242/MyClone、500 ml)
- ・PBS[Phosphate Buffered Saline] (D8537/SIGMA、500 ml)
- ・TRYPsin-EDTA SOLUTION (10x) (T4174/SIGMA、100 ml)
- ・bFGF[FGF basic] (HKW266081/R&D systems、25 µg)
- ・DTT[Dithiothreitol] (1261627/Invitrogen、500 µl)

<準備>

- ① 10%FBS/培地溶液を作製し、所定量(継代先に応じた所定量は以下の通り)を継代先の容器に入れ 37°C/5.0%CO₂ にてプレインキュベートした。
(※培地の調整に関しては Appendix9-1 を参照)

表 9-1. 継代先に応じた培養溶液の必要量

継代先	培養溶液必要量
25 cm ² フラスコ	5 ml
75 cm ² フラスコ	15 ml
6 穴プレート・φ35 mm シヤーレ	2 ml/well
24 穴プレート	500 µl/well
96 穴プレート	100 µl/well
8 穴チャンバー	300 µ/well

- ② 10%trypsin/PBS 溶液を必要量(25 cm² フラスコに対して 5 ml、75 cm² フラスコに対して 10 ml) 作製した。

<操作>

- ① 細胞が sub-confluent になったフラスコの培地を吸引し、PBS 溶液によって細胞を洗浄した。

- ② 洗浄後 PBS 溶液を吸引し、10%trypsin/PBS 溶液を所定量入れて、37.0°C/5.0%CO₂にて5分間インキュベートした。
- ③ 位相差顕微鏡を用いて細胞の剥離を確認後、FBS を所定量(25 cm²フラスコに対して1 ml、75 cm²フラスコに対して2 ml)添加した。
※細胞剥離が十分でない場合は、セルスクレーパーを用いた。
- ④ フラスコ内の細胞懸濁液を15 ml チューブに移し、750 rpm にて5分間遠心分離を行った。
- ⑤ 上澄み液を抜き取った後、Cell Pellet に10%FBS/培地溶液を所定量(25 cm²フラスコに対して1 ml、75 cm²フラスコに対して3 ml)入れ、十分なピペッティングを行った。
- ⑥ 培地溶液をプレインキュベートしておいた容器に、細胞懸濁液を所定量播種した。(中皮細胞:5,000~10,000 cells/cm²、間葉系幹細胞:5,000 cells/cm²)

9-4. 細胞の凍結・解凍方法

培養細胞の凍結保存は、カビなどによるコンタミの防止や細胞株の保存のために必要不可欠の操作といえる。細胞を-80°Cで凍結した細胞は長期間の保存が可能となる。

<使用機器・器具>

- ・2 ml クライオ(アシスト)チューブ(72.693 S/アシスト)
- ・エルマ血球計算盤(Erma)

<使用試薬>

- ・Medium 199(M2154/SIGMA、500 ml)
- ・DMEM[Dulbecco's Modified Eagle's Medium](D6046/SIGMA、500 ml)
- ・FBS[Fetal Bovine Serum](KQM25242/MyClone、500 ml)
- ・PBS[Phosphate Buffered Saline](D8537/SIGMA、500 ml)
- ・TRYPsin-EDTA SOLUTION (10x)(T4174/SIGMA、100 ml)
- ・セルバンカー(637-0221/WAKO)

<操作>

1. 細胞の凍結方法

- ① 培養液を吸引後、PBS 溶液 5 ml/25 cm²フラスコ(10 ml/75 cm²フラスコ)を添加し、若干振動を加えて洗浄した。

- ② 洗浄液を吸引後、10%trypsin/培地溶液を加え、37°Cで5分間インキュベートした。
- ③ 位相差顕微鏡を用いて細胞の剥離を確認後、FBS を所定量(25 cm² フラスコに対して 1 ml、75 cm² フラスコに対して 2 ml) 添加した。
※細胞の剥離が十分でない場合は、セルスクレーパーを用いた。
- ④ フラスコ内の細胞懸濁液を 15 ml チューブに移し、50(xg)/5 分にて遠心分離を行った。
- ⑤ 上澄み液を除去後、10%FBS/培地溶液を 5 ml 加えて 50(xg)/5 分にて遠心分離を行った。
- ⑥ 上澄み液を除去後、Cell Pellet に細胞凍結保存液を 1 ml 加えた。
- ⑦ 細胞数($5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ cells/ml が目安)を測定し、クライオチューブに分注した後、-80°C(ディープフリーザー)で凍結させた。

2. 凍結細胞の解凍方法

- ① 細胞培養用フラスコに 10%FBS/培地溶液を 5 ml 加えて、37°C/5%CO₂ インキュベータ内でプレインキュベートした。
- ② -80°Cで凍結保存しておいたクライオチューブのキャップを無菌下で 1/4 程度開けて、内部の減圧をし、再度閉めた。
※開栓前にチューブ表面をエタノール滅菌した。
- ③ チューブの底から 3/4 を限度に 37°C恒温槽中に浸し、緩やかに揺らしながら解凍した。
※氷片がわずかに残った状態で取り出し、過度の加温は避けた。
- ④ チューブ表面をエタノール滅菌後、無菌下で細胞懸濁液を 15 ml 遠沈管に入れ、さらに培地を 10 ml を加えた。
- ⑤ 50 G(750 rpm、5 分間、原則 4°C)で遠心分離後、上澄み液をアスピレーションした。
- ⑥ 培地 1 ml を加えて十分なピペッティング後、プレインキュベートしておいた細胞培養用フラスコに細胞懸濁液を加えた。

9-5. MTT 試験

【原理】

MTT 法とは、細胞の活性を測定する簡便な方法のひとつである。

MTT[3-(4,5-dimethylthiazo-2,5-diphenyltetrazoliumbromide);C₁₈H₁₆N₅SBr (分子量 414.3)]等のテトラゾリウム塩はミトコンドリアの酸化的リン酸化反応である TCA 回路の脱水素酵素(コハク酸脱水素酵素)の基質となる。ミトコンドリアは、真核細胞の細

胞質中に見られる小器官であり、酸化リン酸化反応によるエネルギー産出の場として重要な役割を担っている。細胞が活発であれば細胞がより多く分裂するために酵素活性が高く、MTT を多く分解する。このことは、代謝が活発な生細胞の定量に特に有用であり、テトラゾリウム塩を細胞で処理することによって、その細胞の活性 (viability) が測れる。特に、MTT は分解されると青紫色のホルマザンに変化するので、吸光度を測定すれば生存細胞数や細胞への毒性傷害効果を定量することができる⁹⁴⁾。細胞数はほぼ一定の条件下では、MTT 法によって得られた値は、細胞活性を示すものと考えられる。

<使用機器・器具>

- ・ CO₂ インキュベーター (10-0212 / 池本理化工業株式会社)
- ・ 浸透機 (MICROTUBE MIXER) (TAITEC)
- ・ Microplate Reader Model 550 (BIO-RAD)
- ・ 96 穴プレート (MS-8096F / SUMILON)
- ・ 吸引ポンプ (BR-21B / 日機装)
- ・ エルマ血球計算盤 (Erma)

<使用試薬>

- ・ Cell Proliferation Kit I (MTT) (1465007 / Roche) : の冷蔵 (-20°C) 保存
 - 1 液 (MTT labeling reagent)
 - 2 液 (Solubilization buffer)

<準備>

1. グルコースポリマー透析液

- ① M199 培地、グルコースポリマー透析液を 50 ml 遠沈管にとった。
- ② それぞれの溶液の pH を 7.4 に合わせた後、0.22 μm フィルターで濾過滅菌を行った。(※ pH の調整法の詳細は Appendix 9-1 を参照)
- ③ それぞれの溶液を以下のように調整し、サンプル溶液を作成した。

透析液:M199 培地	透析液 (ml)	M199 培地 (ml)
10:0	4.0	0
8:2	3.2	0.8
6:4	2.4	1.6
4:6	1.6	2.4
2:8	0.8	3.2
0:10	0	4.0

2. D-グルコース透析液

- ① D-グルコース透析液は2液に別れており、それぞれの液を362:638の割合で混合した溶液を、0.22 μm フィルターで濾過滅菌を行った。(pHは7.4に調整される)
- ② 以下、グルコースポリマー透析液の場合と同様にサンプル溶液を調整した。

<操作>

- 1) 96穴プレートへの播種
 - ① 10%FBS/M199を100 $\mu\text{l/well}$ 添加してプレインキュベートした。
 - ② 細胞懸濁液(細胞密度 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml)を10 $\mu\text{l/well}$ 播種した。
 - ③ 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で培養した。
- 2) growth arrest
 - ① sub-confluent 後、96穴プレートの培地を吸引し、0.1%FBS/M199を100 μl 添加した。
 - ② 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で24時間培養した。
- 3) 試験
 - ① 細胞を24時間 growth arrest した96穴プレートの培地を吸引し、PBS溶液で洗浄後、各試料溶液(D-グルコース/グルコースポリマー透析液)を100 $\mu\text{l/well}$ ずつ曝露した。
 - ② 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で、0.5、3、6時間培養した。
 - ③ 培養終了後、サンプル溶液を吸引し、PBS溶液で洗浄後、10%FCS/M199を100 $\mu\text{l/well}$ 添加した。
 - ④ MTT 1液(MTT labeling reagent)を10 $\mu\text{l/well}$ 添加した。
 - ⑤ 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で4時間培養した。
 - ⑥ MTT 2(Solubilization buffer)液を100 $\mu\text{l/well}$ 添加し、10分間静置した。
 - ⑦ 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で overnight 静置した。
 - ⑧ Microplate Readerを用いて、測定波長550 nm、参考波長655 nmの吸光度を測定した。

9-6. BrdU 試験(細胞増殖解析)

【原理】

チミジン類似体であるBrdUは、S期細胞のDNAに特異的に取り込まれる。した

がってこの BrdU を定量化できれば、放射性物質を使用することなく S 期細胞が DNA 合成を行っているかを判定できる。BrdU が取り込まれなかった部分の DNA を消化はヌクレアーゼ処理により行い、その後 anti-BrdU-POD 抗体で BrdU を認識させる。そして、水溶性の色素前駆体である ABTS を加えると、結合した標識抗体である peroxidase がそれを分解し、緑色に可視化する。

<使用装置・器具>

- ・CO₂ インキュベーター(池本理化工業株式会社)
- ・ボルテックス(TAITEC)
- ・遠心機(KUBOTA2010)(KUBOTA)
- ・Microplate Reader Model 550(BIO-RAD)
- ・吸引ポンプ(BR-21B/日機装)
- ・エルマ血球計算盤(Erma)
- ・96 穴プレート(MS-8096F/住友ベークライト株式会社)

<使用試薬>

- ・BrdU Labeling & Detection Kit III (1444611/ロシュ)
- ・Medium 199(M2154/SIGMA)
- ・FBS(10437-028/Invitrogen Corporation)
- ・PBS[Phosphate Buffered Saline](D8537/SIGMA)

<準備>

1. 使用試薬の調整

- ①BrdU ラベリング試薬を使用直前に PBS 溶液で 1:90 の割合で希釈した。(96 穴プレート1枚につき、12 μ l の BrdU ラベリング試薬を 1.068 ml で希釈)
- ②濃縮洗浄緩衝液を再蒸留水で 1:10 の割合で希釈し、洗浄緩衝液を調整した。(96 穴プレート1枚につき、6 ml の濃縮洗浄緩衝液を 54 ml の再蒸留水で希釈した。):冷蔵(-4 $^{\circ}$ C)保存した。
- ③再蒸留水で希釈した 50%(w/v)グリセリン 1.3 ml をヌクレアーゼストック液とし、-20 $^{\circ}$ C で保存した。
- ④ヌクレアーゼストック液を、使用直前に、インキュベーション緩衝液で 1:100 の割合で希釈した。(96 穴プレート1枚につき、100 μ l のヌクレアーゼストック液を 9.9 ml のインキュベーション緩衝液で希釈)
- ⑤anti-BrdU-POD 抗体を 1.25 ml の再蒸留水で希釈(最終濃度 20 U/ml)し、anti-BrdU-POD 抗体ストック液を調整した。
- ⑥anti-BrdU-POD 抗体ストック液を、使用直前に、10 mg/ml の BSA 入りの洗浄

緩衝液で 1:100 の割合で希釈し、anti-BrdU-POD 抗体使用液を調整した。
(96 穴プレート1枚につき、100 μ l の anti-BrdU-POD 抗体ストック液を 9.9 ml の BSA-洗浄緩衝液で希釈)

- ⑦ 基質緩衝液に ABTS の粉末を入れ、室温で透明になるまで攪拌し、Peroxidase 基質を調整した。遮光・冷蔵(−4℃)保存。
- ⑧ 固定液を調整した。96 穴プレート1枚につき、100%エタノール 7 ml を 2.33 ml の再蒸留水で希釈し、25%の塩酸を 670 μ l 加え、冷凍(−20℃)保存した。

2. サンプルの調整(グルコースポリマー透析液)

M199 培地、グルコースポリマー透析液をそれぞれ 50 ml 遠沈管にとり、溶液の pH を 7.4 に合わせた後、0.22 μ m フィルターで濾過滅菌を行った。

(※pH の調整法の詳細は Appendix9-1 を参照)

<操作>

- ① 96 穴プレートに細胞を播種し、37℃、5%CO₂ インキュベーター内でコンフルエントになるまで培養した。
- ② 培養液を吸引後、0.1%FBS/M199 溶液で、48 時間 growth-arrest した。
- ③ 新しいプレートに 0:10、2:8、4:6、6:4、8:2、10:0 の割合になるように、グルコースポリマー透析液:M199 の溶液を 50 μ l ずつ調整した。
- ④ ②のプレートの溶液を吸引後、③のプレートの検体を移し、30 分間、3時間、6時間 37℃、5%CO₂ でインキュベートした。
- ⑤ 各ウェルに 10 μ l の BrdU ラベリング溶液を加え、37℃、5%CO₂ インキュベーター内で2時間培養した。
- ⑥ ラベリング溶液含有培地を吸引し、10%FBS/M199 溶液で2回洗浄した。
- ⑦ 培地を吸引後、予め冷やしておいた固定液を各ウェルに 200 μ l ずつ加え、−20℃で 30 分間細胞を固定した。
- ⑧ 固定液を吸引後、10%FBS/M199 溶液で3回洗浄した。
- ⑨ 培地を吸引後、各ウェルに 100 μ l のヌクレアーゼ使用液を加え、37℃で 30 分間インキュベートした。
- ⑩ ヌクレアーゼ使用液を吸引後、10%FBS/M199 溶液で3回洗浄した。
- ⑪ 洗浄液を吸引し、anti-BrdU-POD 抗体使用液を 100 μ l ずつ加え、37℃で 30 分間インキュベートした後、抗体を除き洗浄緩衝液で3回洗浄した。
- ⑫ 洗浄緩衝液を吸引し、100 μ l の peroxidase 基質を加え、室温で positive サンプルが緑色を呈するまで 37℃、5%CO₂ インキュベートした。
- ⑬ 490 nm をリファレンスにして、405 nm でのサンプルの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

9-7. LDH 試験(細胞障害性解析)

【原理】

LDH (lactate dehydrogenase: 乳酸脱水素酵素) は全ての哺乳類細胞に含まれる細胞質酵素である。通常 LDH は細胞膜を透過しないが、細胞膜がダメージを受けると、細胞膜の透過性が変化し、細胞外へ LDH が漏出する。細胞外、つまり培養液上澄みへの LDH の漏出は、細胞死や細胞膜ダメージと相関関係がある。よって、LDH 活性の測定が、細胞毒性試験として用いられる。LDH の作用により乳酸がピルビン酸に酸化されるのと同時に、補酵素 NAD^+ は NADH に還元される。サンプル中の LDH 活性に比例して生成される NADH はジアホラーゼの酵素作用でニトロブルーテトラゾリウムを還元して青紫色のジホルマザンを生成する。この呈色液の $560\text{nm} (\pm 10\text{nm})$ の吸光度を測定し、どのくらい LDH が漏出しているか、つまり、どのくらい細胞が障害を受けているかを測定する。

測定可能な項目は、生理活性物質や細胞性免疫による細胞障害、補体依存性・抗体依存性細胞障害となる。

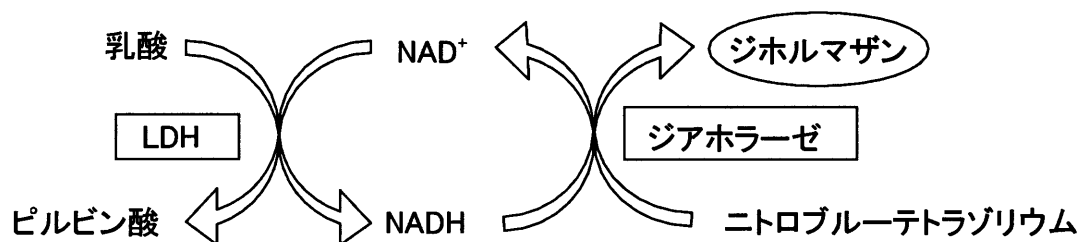


図 9-1. LDH 試験測定原理—ジホルマザン生成機構

<使用装置・器具>

- ・ CO_2 インキュベーター (10-0212 / 池本理化工業株式会社)
- ・恒温槽 (BT-15 / Yamato)
- ・ボルテックス (S-100 / TAITEC)
- ・96 穴用遠心機 (マイクロプレート用ローター) (遺伝子研究施設)
- ・Microplate Reader Model 550 (BIO-RAD)
- ・吸引ポンプ (BR-21B / 日機装)
- ・96 穴プレート (MS-8096F / 住友ベークライト株式会社)

<使用試薬>

- ・LDH-細胞毒性テストキット (299-50601 / WAKO、10 テスト)
 - ▶ 発色試薬 (ニトロブルーテトラゾリウム 3.7 mg/vial、ジアホラーゼ、NAD)
 - ▶ 緩衝液 (DL-乳酸リチウム 50 mg/ml)

- ▶反応停止液(塩酸 1 mol/L)
- ・細胞培養用培地(M199:中皮細胞)
- ・FBS[Fetal Bovine Serum](KQM25242/MyClone、500 ml)
- ・PBS[Phosphate Buffered Saline](D8537/SIGMA、500 ml)
- ・TritonX-100 (T8787/SIGMA、50 ml)

<準備>

- ①発色試薬 1 バイアルに緩衝液 5 ml を加えて溶解した。
※発色試薬1バイアルで 96 穴プレート1枚分
- ②反応停止液を PBS 溶液で2倍希釈した。

<操作>

1) 細胞プレートの作製

- ①細胞を 15 ml 遠心管にとり、1000 rpm で5分間遠心分離した。
- ②上澄みを除き、10%FBS/培地溶液を加えて細胞懸濁液を作り、1000 rpm で5分間遠心分離した。
- ③上澄みを除き、 1×10^5 cells/ml になるように 10%FBS/培地溶液で細胞懸濁液を作り、96 穴プレートの各ウェルに 50 μ l ずつ分注した(5000 cells/well)。
- ④一晩、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で保温した。
- ⑤培養液を吸引後、PBS 溶液にて洗浄した。

2) 検体プレートの作製

- ①0:10、2:8、4:6、6:4、8:2、10:0 の割合になるようにグルコースポリマー透析液:M199 溶液を 100 μ l ずつ調整した。
※positive controlとして 0.2%TritonX-100/M199 溶液を、negative controlとして PBS 溶液を使用した。

3) 検体処理

- ①細胞プレートの PBS 溶液を吸引後、8連マイクロピペッターを用いて、検体プレートから細胞プレートへ 100 μ l ずつ分注した。
- ②実験系によって適切な時間(15 分間)、37°C、5%CO₂ インキュベートした。
- ③軽くプレートを攪拌し、1000 rpm で3分間遠心分離した。
- ④検体処理したプレートの各ウェルから上澄みだけを 50 μ l とり、新しい 96 穴プレート(反応プレート)に移した。 ※細胞を吸い込まないように注意

4) 発色開始・停止

- ①反応プレートに調整した発色液を 50 μ l 分注し、室温で 45 分間静置した。
※反応時間を変えることで、検出感度を調整可能
- ②2倍希釈した反応停止液を 100 μ l 分注し、発色反応を停止した。

③反応停止後 90 分以内に、マイクロプレートリーダーで、560 nm (±10 nm) の吸光度を測定した。 ※吸光度が 1.4 以下になるように調整

9-8. flow cytometry 解析

【原理】

フローサイトメトリー(flow cytometry)とは、細胞を整流(シース液と呼ばれる)中に流し込み、整然と列を成して流れている状態にしたところにレーザーを当てることで細胞から発生する前方散乱光、側方散乱光、蛍光を測定する。この光の強さを電気信号に置き換えて定量化し、細胞一つ一つの情報をサンプリングすると共に、その情報をもとに細胞を生きのまま回収することができる。前方散乱光はレーザー光軸に対して前方で検出され、細胞の表面積に比例し、側方散乱光はレーザー光軸に対して 90 度の角度で検出され、細胞の顆粒や構造の状態に比例する。また、細胞に標識した蛍光色素はレーザー光を吸収し分子振動や熱を放出することで吸収した光より長い波長を持つ蛍光を発する。

そのプロセスは水流系(測定対象とする試料一つずつを一系列に並べる)、光学系(試料にレーザーを当てて、発生した散乱光と蛍光を測定する)、電気系(発生した光を検知し、電気的信号に置き換える)、分取系(目的とする試料を回収する)の4つに分類できる^{95,96)}。

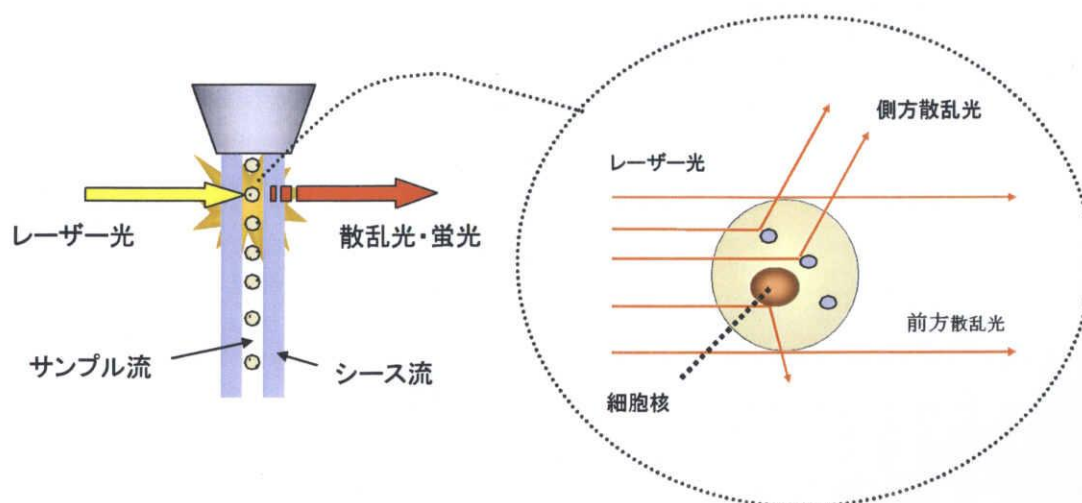


図 9-2. フローサイトメトリー原理図⁹⁶⁾

《細胞周期解析》

【原理】

細胞は増殖する過程において、細胞周期に従って増殖しており、それと共に細胞内の核に存在する染色体も増加する。染色体は二重螺旋 DNA より構成されており細胞の DNA 量測定によって、その細胞が細胞周期のどの状態にあるかを推測可能となる。フローサイトメーターでは、ヨウ化プロピジウム等の DNA に特異的に結合する蛍光色素で細胞を染色し、測定された蛍光量より DNA 量を推測する。^{89,90)}



細胞周期	DNA 量	細胞の状態
G0 期	2C	細胞休止状態
G1 期	2C	細胞増殖開始
S 期	2C~4C	DNA 合成期
G2 期	4C	細胞分裂直前
M 期	2C	細胞分裂

図 9-3. 細胞周期モデル⁸⁹⁾

生体におけるほとんどの細胞は細胞周期のある点で止まっている。この点は G1 中後期にあり、制御点と呼ばれる。これらの細胞は G0 期に存在しており細胞周期には入っていない休止状態である。この制御点を越えた細胞は S 期、G2 期、M 期と進み、細胞分裂する。

<使用機器・器具>

- ・パスツール
- ・ピペット
- ・15ml 遠沈管(373687、NUNC)
- ・セルスクレーパー(MS-93170、SUMILON)
- ・セル・ストレーナー(352235、FALCON)

<使用試薬>

- ・trypsin-EDTA(T4174、SIGMA、100 ml)
- ・FCS[fetal calf serum] (181024、Roche、50 ml)
- ・PBS[Phosphate Buffered Saline](D-8537、SIGMA、500 ml)
- ・tritonX-100(X100RS-CG、SIGMA)

- PI[propidium iodide] (P4170、SIGMA、10 mg)
- RNase[ribonuclease] (109142、Boehringer、25 mg)

<準備>

1. 25cm²フラスコ内に細胞を培養し、sub-confluent 後 48 時間の growth arrest を行った。
2. 培養液を吸引後、PBS 溶液 5 ml を添加し、若干の振動を加えて洗浄した。
3. 洗浄液を吸引し、25 cm²フラスコにサンプル溶液(グルコースポリマー透析液、D-グルコース透析液、分画溶液 1~5)をそれぞれ 5 ml ずつ添加し、37°C/5%CO₂にて 24 時間曝露した。
(※分画溶液 1~5 の詳細は Appendix9-9 を参照)

<操作>

1. 培養液を吸引後、25 cm²フラスコ内の細胞を 5 ml の PBS 溶液で洗浄した。
2. 洗浄液を吸引後、10%trypsin/PBS 溶液 5 ml を加えて CO₂ インキュベート内にて 5 分間静置した。
3. 顕微鏡で細胞が剥がれたことを確認後、FBS を 1 ml 加えた。
※細胞の薄利が十分でない場合はセルスクレーパーを使用
4. 細胞懸濁液を 15 ml 遠沈管にいれ、750 rpm で5分間遠心分離した。
5. 上澄み液を吸引後、2%FBS/PBS 溶液 5 ml を加え、750 rpm で 5 分間遠心分離した。(洗浄)
6. 上澄み液を吸引後、0.2%tritonX-100/PBS 溶液 500 μl を加えてピペッティング後、5 mg/ml の RNase 溶液を 5 μl 添加し、室温にて 10 分間反応させた。
7. 100 μg/ml の PI 溶液を 500 μl 添加後、-4°C / 遮光条件で 10 分間反応させ、全液をセル・ストレーナーに移し即座に測定した。

※・PI の調整

1. 1 mg/ml の濃度になるように PBS 溶液に溶解させた。
2. 褐色瓶にて 4°C で保存した。(保障期限:1 年)

•RNase の調整

1. 5 mg/ml の濃度になるように PBS 溶液に溶解した。
2. 一回沸騰させ、冷ましてから小分けした。
3. -20°C で保存し、使用の度に解凍を行った。(※冷凍・解凍を繰り返さない)

《アポトーシス解析》

【原理】

細胞死は、ネクローシス(壊死)とアポトーシスに大別される。ネクローシスは、圧迫や火傷など物理的要因による細胞破壊などにみられ、このときまず細胞膜が破壊され、細胞外液が細胞内に侵入して細胞膨張が起こり、さらに細胞内容が流出して周囲に炎症を引き起こす。これに対してアポトーシスでは、細胞膜破壊やこれに伴う細胞内容の流出は見られず、細胞はむしろ縮小し、染色体は凝縮し、核と細胞の断片化が起こり、アポトーシス小体(apoptotic body)が観察される。断片化された細胞はマクロファージなどにより貪食されるため周囲に炎症反応は少ない。すなわち、ネクローシスは事故死であり、一方アポトーシスは、その過程がすでに遺伝子情報の中にプログラムされていて、状況に応じて作動される。アポトーシスが起こるときの特徴として、ミトコンドリアの膜電位の変化、DNAの断片化、細胞膜構造変化(ホスファチジルセリンの局在化など)、カスパーゼの活性などがある。

アポトーシスの主な経路として、細胞膜外の細胞死伝達リガンドからカスパーゼ8を活性化してカスパーゼ3が活性化する経路と、ミトコンドリアを経由してカスパーゼ9を活性化し、カスパーゼ3に達する経路の2種が存在している⁴⁹⁾。

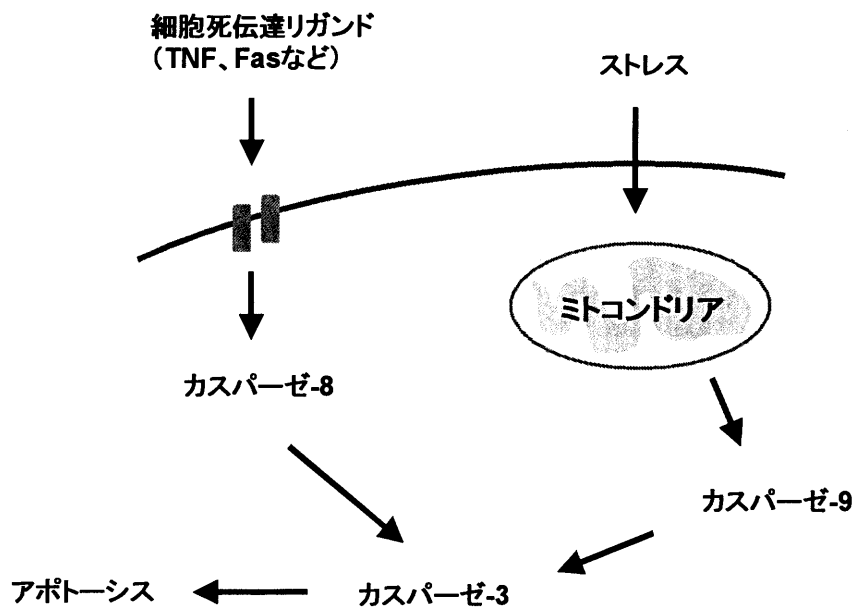


図 9-4. アポトーシスの伝達経路⁴⁹⁾

<使用機器・器具>

- ・15ml 遠沈管 (373687、NUNC)
- ・セルスクレーパー (MS-93170、SUMILON)
- ・セル・ストレーナー (352235、FALCON)

<使用試薬>

- ・FCS[fetal calf serum] (181024、Roche、50 ml)
- ・PBS[Phosphate Buffered Saline] (D-8537、SIGMA、500 ml)
- ・1×Binding buffer (1035-100、B-Bridge、100 ml)
- ・Annexin V-FITC (K101-100、B-Bridge、100 assays)
- ・PI[propidium iodide] (P4170、SIGMA、10 mg)

<準備>

1. 6 穴プレート内に細胞を培養し、sub-confluent 後 48 時間の growth arrest を行った。
2. 培養液を吸引後、PBS 溶液 2 ml/well により洗浄した。
3. 洗浄液を吸引し、6 穴プレートにそれぞれ D-グルコース、グルコース透析液を 2 ml/well ずつ添加し、37°C/5%CO₂ にて 30 分、6、12、24、36、48 時間曝露した。

<操作>

1. あらかじめ FACS を起動させておいた。
2. 培養液を吸引後、25 cm² フラスコ内の細胞を冷 5ml の PBS 溶液で洗浄した。
3. 洗浄液を吸引後、10% trypsin/PBS 溶液 5 ml を加えて CO₂ インキュベート内にて 5 分間静置した。
4. 顕微鏡で細胞が剥がれたことを確認後、1 ml の FBS を加えた。
※細胞の剥離が十分でない場合はセルスクレーパーを使用
5. 細胞懸濁液を 15 ml 遠沈管にいれ、750 rpm で 5 分間遠心分離した。
6. 上澄み液を吸引後、0.2% FCS/PBS 溶液 5ml を加え、750 rpm で 5 分間遠心分離した。(洗浄×2 回)
7. 細胞懸濁液 100 μl (1×10⁵ 個) に対して Annexin V-FITC 10 μl と 1 mg/ml の PI 溶液 10 μl を添加し、静かに攪拌した。
8. 遮光して、室温にて 15 分間放置した後、即座に 1×Binding Buffer を 400 μl 加え、セル・ストレーナーに移した。
9. 速やかに FACS にて解析した。

《細胞表面抗原解析》

【原理】

フローサイトメトリーによる解析では、特定の分子を特異的に認識して結合する物質に適切な蛍光物質を結合させたプローブで細胞を染色する。ここにレーザーを照射して細胞が発する蛍光を検出し、測定したい分子の量を蛍光強度に置き換えて測定する。しかし、細胞には細胞自体が持っている自家蛍光がある。これは非特異的蛍光と呼ばれ、抗体が本来認識する抗原以外の場所で細胞に捕獲、あるいは接着するため、測定時は必ずコントロールが必要となる。

＜自家蛍光と目的抗原＞

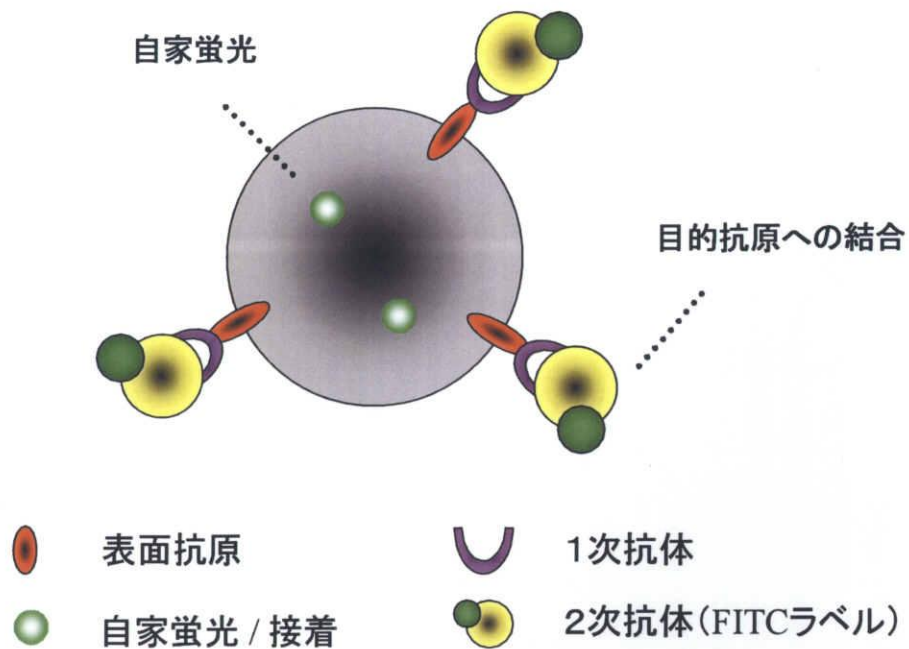


図 9-5. 細胞の自家蛍光と目的抗原への結合

細胞表面上にはその細胞特異的な抗原が存在しており、これらを測定することで細胞を同定することが可能となる。例えば、同じ骨髄中に存在する造血幹細胞と間葉系幹細胞であるが、造血幹細胞では CD34 抗原陽性であるが間葉系幹細胞では陰性となる。

＜使用機器・器具＞

- ・15ml 遠沈管 (373687、NUNC)
- ・セルスクレーパー (MS-93170、SUMILON)

・セル・ストレーナー (352235、FALCON)

<使用試薬>

- ・trypsin-EDTA (T4174、SIGMA、100 ml)
- ・FCS[fetal calf serum] (181024、Roche、50 ml)
- ・PBS[Phosphate Buffered Saline](D-8537、SIGMA、500 ml)
- ・ネガティブコントロール-FITC(6603864、BECKMAN COULTER、1 ml)
- ・CD14[negative マーカー](IM0645、BECKMAN COULTER、2 ml、)
- ・CD34[negative マーカー](IM1870、BECKMAN COULTER、2 ml)
- ・CD45[negative マーカー](A07776、BECKMAN COULTER、2 ml)
- ・CD29[positive マーカー](IM0791、BECKMAN COULTER、2 ml)
- ・CD44[positive マーカー](IM1219、BECKMAN COULTER、2 ml)

<操作>

- ①6 穴プレートに細胞を sub-confluent まで培養した。
- ②培養液を吸引後、6 穴プレート内の細胞を PBS 溶液で洗浄した。
- ③洗浄液を吸引後、10%trypsin/PBS 溶液を 2 ml/well ずつ加えて、37°C/5% CO₂ で 5 分間インキュベートした。
- ④顕微鏡で細胞が剥がれたことを確認後、FBS を 400 µl/well ずつ加えた。
※細胞の剥離が十分でない場合はセルスクレーパーを用いた。
- ⑤細胞懸濁液を 15 ml 遠沈管にいれて、1000 rpm で5分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした。
- ⑥2% FBS/PBS 溶液を 2 ml ずつ加えて、1000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした。(洗浄)
- ⑦2% FBS/PBS 溶液を 1 ml ずつ加えて、抗体を各 10 µl 加えて 4°C で 20 分間インキュベートした。(遮光保存)
- ⑧1000 rpm で5分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした。
- ⑨2%FCS/PBS 溶液を 2 ml ずつ加えて懸濁し、1000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄みをアスピレーションした。
- ⑩2%FBS/PBS 溶液を 500 µl ずつ(計 3 ml)加えて、FACS で測定した。

<CD 抗体>

・CD14

CD14 抗原は分子量 53-55 kDa の、グリコシルホスファチジルイノシトール結合型単鎖膜糖タンパク。骨髓単球系細胞にみられ、単球やマクロファージに強く発現し、好中球に弱く発現する。また B リンパ球にも弱く発現するが、T リンパ球、NK 細胞、

赤血球および血小板にはみられない。

・CD29

CD29 抗原 II は、130 kDa のインテグリン $\beta 1$ 鎖で、インテグリン $\alpha 1 \sim \alpha 8$ と αV サブユニットと非共有結合的に結合したヘテロダイマーとして発現する。幅広い細胞反応性を示すが、赤血球には発現しない。正常末梢血では、 $CD4^+$ Tリンパ球、 $CD8^+$ Tリンパ球のサブセットに発現し、少数の Bリンパ球にもみられる。

・CD34

CD34 抗原は、分子量約 110 kDa の単鎖膜貫通型リン酸化糖タンパク。CD34 抗原は、最も未分化な多能性幹細胞と全細胞系統の造血前駆細胞に発現し、最も未分化の幹細胞で最も高く、各細胞系統に分化するに従って徐々に失われていく。また、毛細血管内皮細胞や骨髄ストローマ細胞にも検出されている。

・CD44

CD44 分子群は、hyaluronan 結合タンパクである hyaladherin ファミリーに属する膜貫通タンパク。多数の CD44 アイソフォームが報告されているが、主要なアイソフォームは、分子量が 85 kDa の CD44S である。CD44 分子は、ほとんどの細胞と組織に発現しないが、血小板、肝細胞、心筋、腎尿細管上皮、精巣、皮膚には発現していない。

・CD45

CD45 分子は単鎖膜タンパクで、少なくとも 5 つのアイソフォームがあり、分子量は 180 から 220 kDa。非限定 CD45 エピトープはすべてのヒト白血球、すなわちリンパ球、好酸球、単球、好塩基球、好中球表面に発現し、この順に弱くなる。CD45 はリンパ球の膜の主要成分のひとつであり、赤血球および血小板には存在せず、骨髄中の赤芽球系細胞が成熟する過程で失われていく。

9-9. ゲル濾過クロマトグラフィー

【原理】

溶質がクロマトグラフィーベッドを通り抜ける際の動きは、移動相の大きな流れと、固定相へのあるいは固定相からの拡散を引き起こす溶質自身のブラウン運動とに依存している。ゲル濾過法では様々な試料分子を固定相の網目に入り込む程度の違いによって分離する。固定相の網目に入らない大きな分子は最も速くクロマトグラフィーベッドを通り抜ける。ゲルの網目に入れる小さな分子は溶出してくるまでの時間のいくらかを固定相で過ごすため、よりゆっくりとカラム中を移動する。その結果、分子は大きいものから順に溶出される⁹⁹⁾。

ゲルの特性としては、Sephadex はデキストランとエピクロロヒドリンで三次元的に架橋して得られたビーズ状ゲルである。内部に存在する多数の水酸基の為、強い

親水性を示し、水または電解質溶液中で容易に膨潤する。G-25 と G-75 では架橋が異なり、従って膨潤度・分画範囲が異なる。また、化学的に分解を受けない限りあらゆる溶媒に不溶であり、水、塩類溶液、有機溶媒、アルカリおよび酸に対して安定である⁹⁹⁾。

<使用機器・器具>

- ・ 試験管
- ・ 1ml シリンジ(TERUMO 社)
- ・ 0.45 μ m フィルター(MILLIPORE 社)
- ・ カラム
- ・ 示差屈折率検出器(Shodex)
- ・ VOLTAGE LOGGER(HIOKI)
- ・ COMMUNICATION UTILITY(HIOKI)
- ・ Fraction Collector(Pharmacia 社)
- ・ PUMP P-500(Pharmacia 社)
- ・ FREEZE DRY SYSTEM / FREEZONE 4.5

<使用試薬>

- ・ プルラン STANDARD P-82(Shodex)
- ・ SephadexG-25 ゲル(Pharmacia 社)
- ・ SephadexG-75 ゲル(Pharmacia 社)

<操作・結果>

1. 標準試料による校正曲線の作成

- ①濃度 1 mg/ml で調整したサンプルを試料が膨潤するまで冷蔵庫内に放置後 0.45 μ m のフィルターで濾過した。
- ②流速 60 ml/時間であらかじめ脱イオン水で平衡化しておいたカラムに標準試料を流した。
- ③得られたデータから校正曲線を作成した。

《標準試料のクロマトグラム》

グラフの横軸は溶出体積(ml)で、縦軸は屈折率を示す。ピークトップ分子量は左から 47300、22800、11800、5900 でありそのときの溶出体積は 57.3、68.0、80.7、93.3 (ml)であった。

《校正曲線》

ピークトップ分子量 47300、22800、11800、5900 の対数値を縦軸に、そのときの溶出体積の値を横軸にとった。

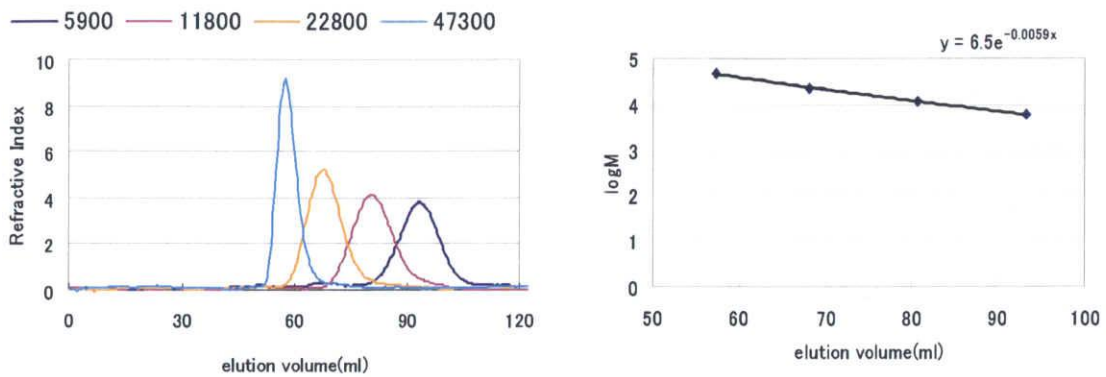


図 9-6.標準試料プルランのクロマトグラム、較正曲線

2. 平均分子量測定

- ①未知使用の流出体積データを較正曲線に当てはめ各流出体積における分子量を計算した。
- ②求めた分子量を使い、各画分の数平均分子量 (Mn) と重量平均分子量 (Mw)、分子量分布の幅 (Mw/Mn) を以下の式を用いて計算した。

$$\text{数平均分子量: } \overline{Mn} = \frac{\sum RI \times M}{\sum RI}$$

$$\text{重量平均分子量: } \overline{Mw} = \frac{\sum RI \times M^2}{\sum RI \times M}$$

- ③較正曲線より各分画分子量の平均分子量以下のように求めた。

較正曲線の式

$$y = 6.5e^{-0.0059x} \text{ より}$$

$$\text{分子量} = 10 \cdot 6.5e^{-0.0059 \times (\text{溶出体積})} \quad (5900 < \text{分子量} < 47300)$$

求めた分子量を使い、グルコースポリマーの各画分の数平均分子量 (Mn) と重量平均分子量 (Mw)、分子量分布の幅 (Mw/Mn) を計算した。結果を以下にまとめた。

表 9-2. グルコースポリマーの分画分子量

	分画1	分画2	分画3	分画4	分画5
重量平均分子量	40943	19223	8415	3856	1987
数平均分子量	46894	18731	7505	3441	1287

3. グルコースポリマーの分離

ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて透析液中の高分子量物質であるグルコースポリマーと電解質(塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、乳酸ナトリウム、塩化カルシウム)を含む低分子量物質を分離した。以下のグラフはグルコースポリマー透析液の分子量分布を示している。グラフの横軸は溶出体積(ml)、縦軸は屈折率で、グルコースポリマーは溶出体積 165~330(ml)で、電解質は溶出体積 330~420(ml)にて検出された。

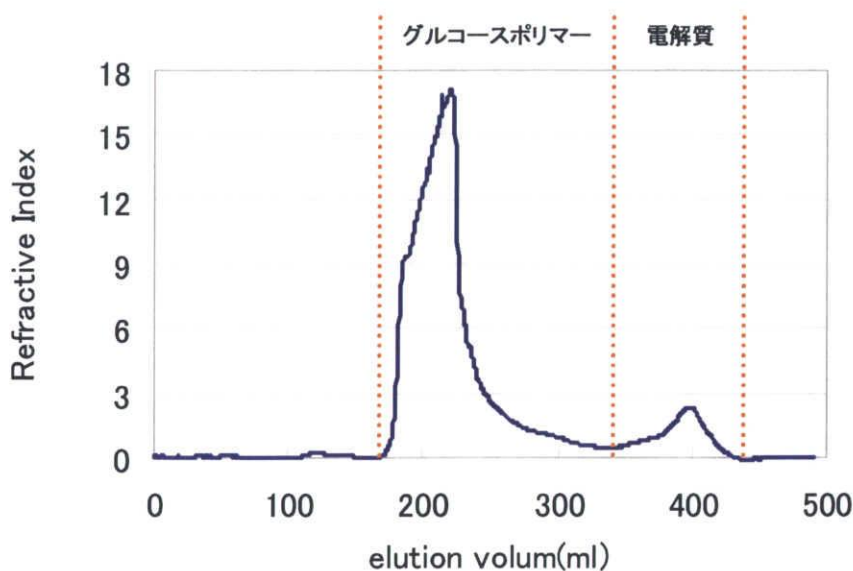


図 9-7. グルコースポリマー透析液の分子量分布

4. グルコースポリマーの分画・分取

分離したグルコースポリマーを以下に示すように溶出体積(分子量)で 5 分画した。グラフの横軸は溶出体積(ml)、縦軸は屈折率を示している。

分画 1~5 の溶出体積はそれぞれ、分画1は 50~65 ml、分画2は 65~80 ml、分画3は 80~95 ml、分画4は 95~110 ml、分画5は 110~125 ml とした。

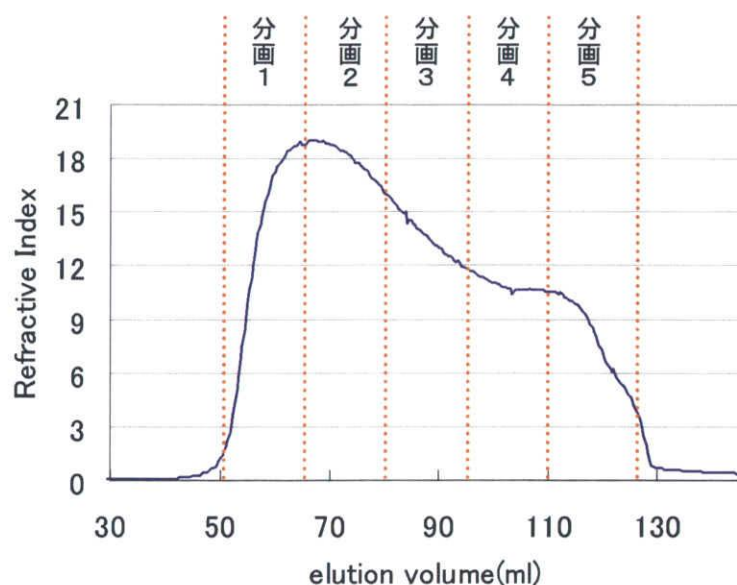


図 9-8. グルコースポリマーの分子量分布

9-10. 酵素染色法

【原理】

アルカリフォスファターゼ (AIP) はアルカリ領域で種々のリン酸エステルを加水分解する酵素の総称で、通常、リン酸モノエステル分解酵素を指す。酵素の基質となるナフトールまたはその誘導体のリン酸エステルが AIP で分解され、生じたナフトール (または誘導体) が反応液中のジアゾニウム塩とジアゾ結合し、酵素の局在部に不溶性のアゾ色素を生じる^{91,92)}。

<使用機器・器具>

- ・CO₂ インキュベーター (10-0212 / 池本理科工業)
- ・ウォーターバス (BT-15 / Yamato)
- ・Vortex (S-100 / TAITEC)
- ・吸引ポンプ (BR-21B / 日機装)
- ・オリンパス倒立型顕微鏡 (CK2 / OLYMPUS)
- ・光学顕微鏡 DIAPHOT 300 (SRM-100 / Nikon)
- ・φ35mm シャーレ (MS-80240 / 住友ベークライト株式会社)

<使用試薬>

- ・DMEM [Dulbecco's Modified Eagle's Medium] (D6046 / SIGMA, 500 ml)
- ・FBS [Fetal Bovine Serum] (KQM25242 / MyClone, 500 ml)

- ・PBS[Phosphate Buffered Saline](D8537/SIGMA、500 ml)
- ・bFGF[FGF basic](HKW266081/R&D systems、25 µg)
- ・DTT[Dithiothreitol](1261627/Invitrogen、500 µl)
- ・2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol(207-06275/Wako、500 g)
- ・Naphthol AS-MX phosphate Na salt(142-03591/Wako、100 mg)
- ・N,N-Dimethylformamide(047-29191/Wako、100 ml)
- ・Fast red violet LB salt(158029/Wako、50 mg)
- ・5N 塩酸(081-05435/Wako、500 ml)
- ・Acetone(012-00343/Wako)
- ・Methanol(134-01833/Wako)

<準備>

1. 緩衝液(0.2 mol/L、pH8.6) : 冷蔵(4°C)保存

- ・2-amino,2methyl,3propanediol・・・2.1 g
- ・1N 塩酸・・・14.0 ml(5N 塩酸:2.8 ml)
- ・蒸留水・・・86.0 ml

2. 基質原液 : 冷蔵(4°C)保存

- ・Naphthol AS-MX phosphate Na salt・・・10 mg
- ・N,N-Dimethylformamide・・・4.0 ml
- ・蒸留水・・・120.0 ml
- ・緩衝液・・・76.0 ml

3. 反応液 : 冷蔵(4°C)保存

- ・基質原液・・・10 ml
- ・Fast red violet LB salt・・・10 mg

4. 固定液 : 冷凍(-20°C)保存

- ・アセトン:メタノール=1:1で混合する

5. I型コラーゲン : 冷蔵(4°C)保存

- ①PBS溶液に1N塩酸を加えてpH3に調整し、0.22 µm フィルターで滅菌した。
(※pHの調整法に関しては Appendix9-1を参照)
- ②3 mg/mlのI型コラーゲン液に①で作成したPBS溶液を加えて30倍に希釈した。(最終濃度 0.1 mg/ml)

6. エラスチン: 冷蔵(4°C)保存

- ・最終濃度 0.1 mg/mlになるようにPBS溶液中にエラスチンを加えて、0.22 µm フィルターで滅菌した。

7. 滅菌水 (※詳細については Appendix9-1を参照)

<操作>

- ①細胞浮遊用φ35 mmシャーレに滅菌水、0.1 mg/mlのI型コラーゲン、0.1 mg/mlのエラスチンCをそれぞれコーティングした。
(※コーティング方法の詳細については Appendix9-12 を参照)
- ②コーティング溶液吸引後、骨細胞分化誘導用培地を 2 ml ずつ加えて、37°C/5%CO₂ インキュベーター内で 15 分以上プレインキュベートした。
- ③φ35 mmシャーレに間葉系幹細胞を播種し(5×10⁴ cells/well)、それぞれ必要培養日数分培養した。
- ④培養液吸引後、PBS 溶液 2 ml を添加し洗浄した。
- ⑤洗浄液吸引後、1:1 アセトン/メタノール溶液を添加し 5 分間細胞を固定した。
- ⑥固定液吸引後、反応液を 2 ml 添加し 30 分間室温で反応させた。
- ⑦反応液吸引後、PBS 溶液 2 ml を添加し洗浄した。(×4 回)
- ⑧光学顕微鏡を用いて細胞を観察した。

9-11. 免疫組織化学法

【原理】

免疫組織化学法は抗原-抗体反応という特異的な結合反応を利用して、目的とする蛋白質の細胞内および組織内の局在を検出する手法である。方法としては抗原に対する特異的抗体である一次抗体に酵素や蛍光物質を直接結合させて検出する直接法と一次抗体に対する抗体である二次抗体を用いて可視化する間接法がある。間接法ではシグナルを増強した高感度の検出が可能であり、かつ一次抗体にそのつど標識する手間がかからないという利点で現在広く利用されている。免疫染色の出来は用いる抗体の抗体価に依存しており、どの抗体を用いるかが成功の鍵を握っているといつて過言ではない⁹¹⁾。

<使用機器・器具>

- ・ 蛍光顕微鏡 (ダイアフォト TMD300/Nikon)
- ・ 一眼レフカメラ (FM2/Nikon)
- ・ Chamber Slide 8Chamber (117745/NUNC)

<使用試薬>

- ・ Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin Clone D33 (M0760/Dako)
- ・ Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4 (M0851/Dako)
- ・ Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin Clone DC 10 (M7010/Dako)

・ Monoclonal Mouse Anti-Human Von Willebrand Factor Clone F8/8 (M0616/Dako)

・ダコ PAP キット(ビメンチン, モノ(V9)) (L1863/Dako)

・Anti-IgG, Mouse, Goat-Poly, FITC (AP308F/WAKO)

<操作>

1) 8wells Chamber への播種

- ① collagen I で 1 時間コーティングした。
- ② 8wells Chamber に CS-C 培地を 300 μ l/well 添加し、37°C/5%CO₂ インキュベーター内で培養した。(プレインキュベート)
- ③ プレインキュベート後、継代培養により作成した細胞懸濁液を 30 μ l/well 添加した。
- ④ 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で培養し、3 日に 1 度培地交換を行った。

2) 細胞の免疫染色

A) 固定

- ① 培地を吸引し、ice-cold (-20°C) 95% ethanol で 30 分間浸透させた。

B) 洗浄(非特異的吸着を防ぐため)

- ① 0.9%BSA/PBS 溶液で 3 回洗浄した。

C) 一次抗体

- ① 適当な一次抗体(調整は Table. 10-1 を参照)を 200 μ l 加え、4°C、飽和湿度で overnight 浸透させた。
- ② 抗体を吸引除去した。

D) 洗浄

- ① 0.9%BSA/PBS 溶液で 4 回洗浄した。

E) 二次抗体

- ① 適当な二次抗体(調整は表. 9-3 を参照)を 200 μ l 加え、室温で 1 時間遮光して浸透させた。
- ② 抗体を吸引除去した。

F) 洗浄

- ① 0.9%BSA/PBS 溶液で 4 回洗浄した。
- ② 8wells Chamber の well wall をはがした。

G) 観察、撮影

- ① 蛍光顕微鏡を用いて観察および撮影を行った。

表 9-3. 各抗体の調整量

	抗体名	濃度	希釈率
一次抗体 (anti-Human)	Desmin	230mg/l	1:50~100
	α -Smooth muscle actin	70mg/l	1:50~100
	Cytokeratin 18	305mg/l	1:25~50
	Facter VIII	240mg/ml	1:25~50
	vimentin		原液
二次抗体	Goat anti-Mouse IgG FITC		1:200~250

9-12. コーティング方法

生体細胞は、接着するための足場を必要とする接着細胞と、接着なしに浮遊したまま培養可能な浮遊細胞に分類される。接着細胞は細胞外マトリックス(ECM)に接着することではじめて接着・分化・増殖といった機能を果たすため、接着細胞のECM 上での詳しい解析を行う必要がある。そこで、細胞接着もタンパクの吸着もできない浮遊細胞培養用のシャーレを表面処理した後にECMをコーティングすることでECM のみの表面を持つシャーレを作成した。

【原理】

コロナ放電処理では放電自体の物理的な表面改質と極性官能基生成による化学的な表面改質の相乗効果により著しい濡れ性の向上が得られる。化学的表面改質は高エネルギーの電子やイオンが衝突してプラスチック表面にラジカルやイオンが生成し、これらに周囲のオゾン、酸素、窒素、水分などが反応して、カルボニル基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、シアノ基などの極性官能基が導入されて起こる。

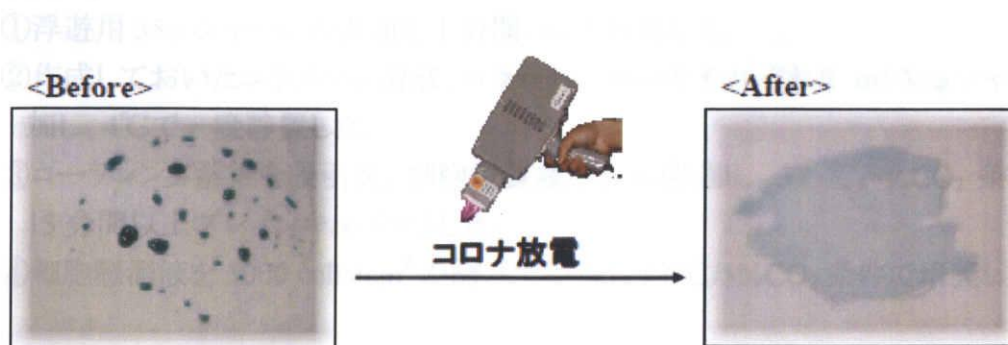


図 9-9. コロナ放電前後でのプラスチック表面の様子の違い

<使用機器・器具>

- ・35 φ シャーレ (MS-80240 / 住友ベークライト株式会社)
- ・Corona Fit (CFG-500 / 信光電気計装株式会社)
- ・0.22 μm フィルター (SVGSB1010 / ステリベックス)
- ・50 ml 遠沈管 (MS-56500 / SUMILON)

<使用試薬>

- ・エラスチン
- ・I 型コラーゲン (050518 / 新田ゼラチン株式会社、20 ml)
- ・5 mol/L HCl aq (081-05435 / WAKO、500 ml)

<準備>

1. エラスチン溶液の調整

- ①水溶性エラスチンを滅菌水中に 1 mg/ml で溶解させた。
- ②0.22 μm フィルターを用いて滅菌し、50 ml 遠沈管に入れた。(4℃保存)
- ③作成した 1 mg/ml エラスチン溶液を滅菌水で 10 倍希釈し、0.1 mg/ml エラスチン溶液を作成した。

2. コラーゲン溶液の調整

- ①滅菌水を塩酸により pH3 に調整した後、0.22 μm フィルターを用いて滅菌し、50 ml 遠沈管に入れた。(4℃保存)
(※pH の調整法に関しては Appendix9-1 を参照)
- ②3 mg/ml の I 型コラーゲン溶液を①で作成した滅菌水で 30 倍に希釈することで最終濃度 0.1 mg/ml のコラーゲン溶液を作成した。

<操作>

- ①浮遊用 35φ シャーレの表面を 1 分間コロナ放電した。
- ②作成しておいたエラスチン溶液、コラーゲン溶液をそれぞれ 2 ml/35φ シャーレ添加し、4℃で一晩静置した。
- ③コーティング溶液を吸引後、細胞培養液を 2 ml 添加し、37 °C/5%CO₂ 条件で 15 分間以上プレインキュベートした。
- ④細胞懸濁液を 5000 cells/cm² の割合で添加し 37 °C/5%CO₂ 条件で培養した。

9-13. コラーゲン・ゲル培養法

【原理】

コラーゲン・ゲル包埋培養法は、コラーゲン・ゲル内に細胞を包埋し細胞培養を行う方法であり、コラーゲンを細胞外マトリックスとして利用した三次元培養法となる。コラーゲン・ゲル上培養法は、培養皿にコラーゲンを薄くコートし、その上で細胞を培養する方法で、細胞は単層様に増殖していくため、細胞接着因子を利用した二次元培養法(単層培養法)となる。

<使用機器・器具>

- ・35φ シャーレ (MS-1135R/住友ベークライト株式会社)
- ・0.22 μ m フィルター (SVGSB1010/ステリベックス)
- ・50 ml 遠沈管 (MS-56500/住友ベークライト株式会社)

<使用試薬>

- ・I型コラーゲン (050518/新田ゼラチン株式会社、100 ml)
- ・HEPES[2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (340-01371/Dojindo、250 g)
- ・重炭酸ナトリウム (191-01305/Wako、500 g)
- ・2 mol/l 水酸化ナトリウム (196-05635/Wako、500 ml)

<準備>

A.0.3%Cellmatrix Type I -A

B.間葉系幹細胞の骨細胞分化誘導培養用培地 DMEM

(※培地の詳細は Appendix9-1 参照)

C.再構成用緩衝液

0.05 N 水酸化ナトリウム水溶液 100 ml に対し、重炭酸ナトリウム(NaHCO_3)2.2 g、HEPES4.77 g を溶解させ、0.22 μ m フィルターで濾過滅菌した。再構成後の HEPES の濃度は 20 mM となる。

1.コラーゲン・ゲル上培養法

<操作- α ->

- ①冷却しながら A 液と B 液を 7:2 の割合で 50 ml 遠沈管中で泡立てないように攪拌混合した。※冷却が不十分な場合、ゲル化することがあるので注意(4°Cが適温)
- ②A/B 混合溶液に C 液を攪拌混合した。(A:B:C=7:2:1)

※混合時には泡立たないように注意

- ③A/B/C 混合溶液を浮遊用 35φ シャーレに 1 ml ずつ分注し、37°Cで 30 分間インキュベートし、コラーゲン・ゲルを作成した。
- ④細胞懸濁液をゲル上に播種し、通常の単層細胞培養法と同様に培養した。
(5,000 cells/cm²)

2. コラーゲン・ゲル包埋培養法

<操作-β->

- ①<操作-α->に従い浮遊用 35φ シャーレにコラーゲン・ゲル層を作った。
- ②別に用意した A/B/C 混合溶液に細胞懸濁液を冷却しながら加えた。
- ③細胞/コラーゲン混合溶液をコラーゲン・ゲル層上に播種し、37°Cで 30 分間インキュベートした。
- ④ゲルが形成した後、細胞培養液 2 mlを重層し、通常の単層細胞培養法と同様に培養した。(5,000 cells/cm²)