

間葉系幹細胞の擬微小重力環境下における分化、組織構築過程に関する研究

産業技術総合研究所 植村寿公、大藪淑美

筑波大学整形外科 三島初

東京工業大学 田中順三

Differentiation of MSC(Mesenchymal Stem Cell) and Tissue Regeneration under Microgravity

Toshimasa Uemura, Yoshimi Ohyabu

Nanotechnology Research Institute (NRI), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, 305-8562, Japan

Hajime Mishima

University of Tsukuba

Junzo Tanaka

Tokyo Institute of Technology

Abstract Recently we have developed a novel culture technique for rapid regeneration of three dimensional cartilage tissue from rabbit bone marrow cells and human patients' bone marrow cells using a rotation wall vessel (RWV) bioreactor. The purpose of this study is to elucidate the time course and special change of the applied mechanical stress to the cartilage tissue and differentiation process of the tissue formed by the RWV bioreactor., for planning the Space Utilization Research.

We developed a novel system for PIV(particle imaging velocity) measurement of the RWV culture system.. By this system, the flow of the medium occurred in the RWV vessel was measured and the applied mechanical stress to the tissue was estimated. Combining with the special distribution of mRNA expressions of cartilage marker genes by LMD(laser microdissection) method, the relationship between mechanical stress to the tissue and its differentiaon from mesenchymal stem cells could be interpreted.

1. 緒言

最近、我々はウサギ、およびヒト患者由来の骨髄細胞を用いて擬微小重力環境を実現するといわれるRWV(rotating wall vessel)バイオリアクターを用いて迅速な軟骨再生技術の開発に成功した。このバイオリアクターは、ガス交換膜を備えた円筒状のベッセルが水平軸周りに回転することにより力を細胞に与え、重力の影響を打ち消して細胞が沈むことなく増殖、分化し3次元的組織を形成することができる。

地上では、ベッセルの回転によって培養液の流れがおき、それが適度なメカニカルストレスを細胞に与え、大きな組織が形成されると類推される。

本研究の目的は、RWVバイオリアクターによりベッセル中の組織に働くメカニカルストレスと組織分化の時間的・空間的变化をとらえ、将来の宇宙実験に備えることである。この目的のために、RWV培養システムのための新しいPIV(particle imaging velocity)法による計測システムを開発した。このシステムによって、RWVベッセル中の培養液の流れが計測でき、それにより組織にかかるメカニカルストレスが推測できる。LMD(レーザーマイクロダイセクション)による軟骨マーカー遺伝子のmRNA発現の空間分布との関連から、組織に働くメカニカルストレスと間葉系幹細胞からの分化との相関が理解できるようになる。

2. RWVバイオリアクターを用いた軟骨再生

骨髄に多く存在する間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪、筋肉、靭帯、腱など様々な組織に分化する多分化能を有し、その分化制御機構は基礎生物研究だけにとどまらず、再生医療

やセルセラピーなどの現代および次世代医療において極めて重要な役割を担っている。分化した細胞が微小重力環境で凝集し3次元組織を作りやすいことはわかってきたが、間葉系幹細胞が骨や軟骨、脂肪に分化する過程における微小重力の影響は殆ど分かっていなかった。我々は最近、ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞からRWV(rotating wall vessel)バイオリアクター(図1)によって実現できる擬微小重力環境を用いて、移植可能な大きさ(長径1.5cm、短径0.8cm)の3次元軟骨組織の構築に成功し(図2)、ウサギ軟骨全層欠損モデルに移植し、極めて良好な軟骨修復が実現することを証明し、臨床応用への可能性が極めて高いことを示した。



図1 RWVバイオリアクター

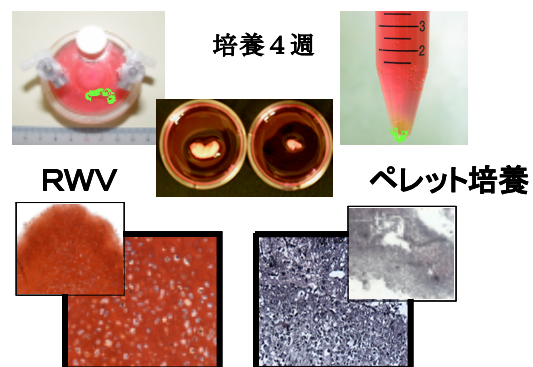


図2 RWV培養とペレット培養の比較

3. RWV バイオリアクターにより形成される擬微小重力環境の定量化を行うための2次元流体計測システムの試作

RWV バイオリアクターにより形成される擬微小重力環境の定量化を行うため、培養液中に培養液に近い比重のビーズを混ぜ、軟骨が形成するのに適切な培養条件のもと、ベッセル中でどのような動きをするか CCD カメラに収録し、それを元に RWV による擬微小重力環境と呼ばれている力の場を空間的に解析する2次元流体計測システムを構築した(図3)。

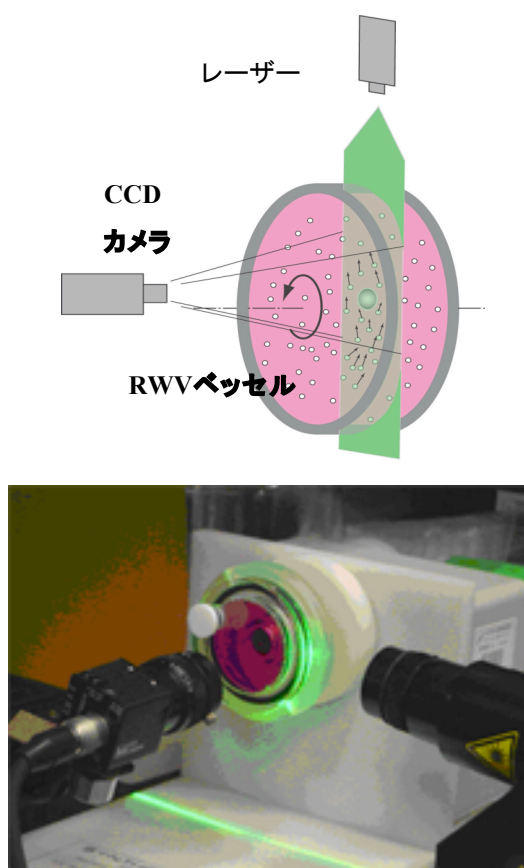


図3 2次元流体計測システムの原理と構築したシステムの写真

本システムは PIV (Particle Image Velocity) の方法を用いて RWV バイオリアクターのベッセル中の培養液(流体)中に混入された微細粒子の動きを画像計測する。流体中の粒子の

動きを CCD カメラで撮影し、解析することにより RWV バイオリアクターのベッセル中の液体の流速を定量的に計測し、ベッセル中で構築されつつある3次元軟骨組織にどのような力がかかっているかを観察することができる(図4)。

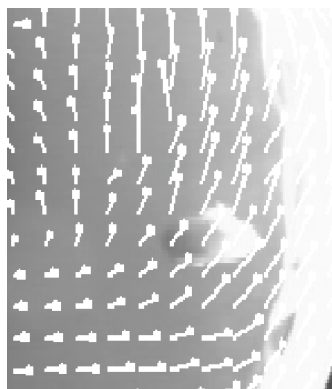


図4 RWVベッセル中の培養液の流れ

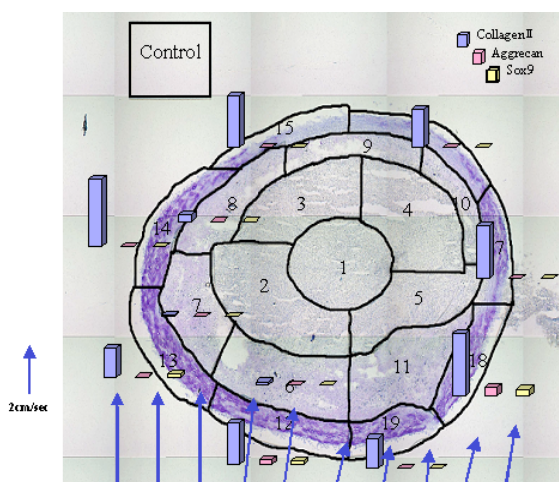
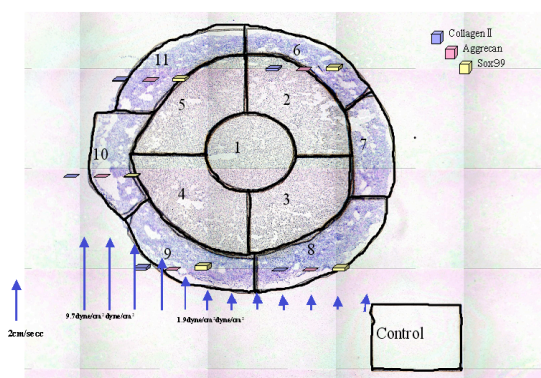


図5 培養5日、15日(ラビット)の局所的遺伝子発現とPIV法により求めた流体の場

図5は、ラビット骨髓細胞を用いてRWV培養し、5、15日目にPIV測定を行った後、凍結試料を作製し、凍結切片のLMDを用いた空間的遺伝子解析を行った結果をまとめたものである。切片のtoluidine blue染色像、LMDで切り出した切片の領域、その切片を用いてRT-PCRにより解析したcollagen type II, aggrecan, sox-9の発現量を棒グラフで示した。PIV法で測定した流体（培養液）の速度をベクトルで示した。

まず、結果から言えることは、分化は3次元組織の周囲から徐々に起こっていることである。RWVバイオリアクターによる培養は地上実験であるので、重力、流体の流れによる力の場がかかっている。それにより、間葉系幹細胞からの分化が促されていることが本実験からよく分かる。

次に分かることは、マーカー遺伝子の発現に時間的順序があること、Day5のデータを見れば分かるように、まず3次元組織の周囲にsox-9の発現が始まる。Day10のデータを見ると、次にcollagen type IIの発現の上昇が見られる。Day15のデータを見ると分かるように、最後にaggrecanの発現が上昇する。これは先行文献による知見と一致しており、sox-9はcollagen type IIの転写制御を行う転写因子であり、aggrecanはその後発現する。培養液の流れにより力を受け、間葉系幹細胞からノーマルな遺伝子発現のプロセスを経て軟骨に分化しているものと考えられる。

間葉系幹細胞から軟骨組織への分化に関して、おおよその時間変化・空間変化を捉えることができたが、軟骨分化への最適な力学的パラメーターを推定し、それをも

とに、宇宙実験への取り組みを行いたい。

REFERENCES

- 1) Yoshimi Ohyabu, Naoko Kida, Hiroko Kojima, Tetsushi Taguchi, Junzo Tanaka, Toshimasa Uemura “Cartilaginous tissue formation from bone marrow derived mesenchymal stem cells using rotating wall vessel (RWV) bioreactor” *Biotechnology and Bioengineering*, 95(5) 1003-1008 (2006)
- 2) Tomokazu Yoshioka, Hajime Mishima, Yoshimi Ohyabu, Shinsuke Sakai, Hiroshi Akaogi, Tomoo Ishii, Naoyuki Ochiai, Hiroko Kojima, Junzo Tanaka, Toshimasa Uemura, Repair of large osteochondral defects with cartilage aggregates from bone marrow derived cells using RWV bioreactors, *Journal of Orthopaedic Research*,25(10) 1291-1298 (2007)
- 3) Shinsuke Sakai, Hajime Mishima, Tomoo Ishii, Tomokazu Yoshikawa, Yoshimi Ohyabu, Chang Fei, Naoyuki Ochiai, Toshimasa Uemura, “3D structure of hyaline cartilage tissue with adult human bone marrow-derived cells using Rotating Wall Vessel Bioreactor, *Journal of Orthopaedic Research*, published online.