

三次元培養造血系細胞の培養密度が増幅度に及ぼす影響

阿保 賢二 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 三好 浩稔 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

造血幹細胞移植は白血病などの重篤な血液疾患に対する有用な治療法であるものの、ドナー不足や採取できる細胞数が少ないといった問題から移植を受けられる患者数は限られており、広範には実施されていない。生体外で造血幹細胞を増幅することができればこれらの問題の解決につながると期待されることから、生体内の環境を模倣することで造血幹細胞を増幅するための研究が盛んに行われている。

生体内では、造血系細胞は造血支持細胞(ストローマ細胞)と三次元的に共存することによって造血微小環境を形成している。この三次元的な環境を模倣するために、医学医療系医工学研究室ではスポンジ状の polyvinyl formal (PVF) 樹脂多孔質体を担体とする造血系細胞の三次元培養法について検討してきた¹⁾。これまでに、ストローマ細胞と共培養することや、そのストローマ細胞を三次元凍結保存処理することによって、造血系細胞を効率的に増幅できることを明らかにした²⁾。しかし、これらの研究は特定の培養密度条件下で行われたものであり、培養密度が造血系細胞の増幅度に及ぼす影響については検討されていない。

そこで本研究では、多孔質樹脂を用いた三次元培養系において異なる密度で造血系細胞を播種して培養することで、培養密度が増幅度におよぼす影響について検討した。

方法

造血系細胞として、胎生 14 日目のマウスより採取した胎仔肝臓細胞 (FLCs) を用いた。細胞の三次元培養担体として、PVF 樹脂多孔質体を 2×2×2 mm の立方体状に細切したものにコーゲンコートして使用した。造血系細胞の培養には Hava 培地を用いた³⁾。

培養では、FLCs を 1×10⁷、2×10⁷、または 1×10⁸ cells/cm³ の 3 通りの密度で播種して 2 週間培養を行った(それぞれ D1、D2、または D10 とする)。各条件において、担体内部の総細胞数は MTT 法を用いて測定した¹⁾。

培養細胞中の各造血系細胞の比率は、フローサイトメーター (FACS) を用いた解析から求めた。抗体には、血芽球系細胞の指標である抗 Ter119 抗体 (PE 標識)、B 細胞の指標である抗 CD45R/B220 抗体 (FITC 標識)、造血前駆細胞の指標である抗 c-kit (CD117) 抗体 (PE 標識)、および造血前駆・幹細胞の指標である抗 CD34 抗体 (FITC 標識) を用いた。死細胞は propidium iodide (PI) の染色によって除外した。

培養細胞中の各 lineage の細胞数は MTT 法により測定した総細胞数と、FACS 解析の結果から得られた Ter119、B220、c-kit、および CD34 の陽性細胞の比率から求めた。

結果・考察

全細胞数および、各造血系細胞数が 2 週間の培養で何倍に増幅されたのかを表 1 に示す。全細胞数については、D1 と D2 の

低密度培養条件下で大幅に減少したのに対して、高密度条件下 (D10) では増加しており高い増幅度が得られた。各造血系細胞については、Ter119 陽性細胞を増幅することはできなかったものの、B220、c-kit、および CD34 陽性細胞は一部の条件下で増幅された。これらの細胞の増幅度を比較すると、低密度条件である D1、D2 に比べて、高密度条件である D10 でより高い増幅度が得られた。高密度条件 (D10) においては、特に造血幹細胞移植に重要である造血前駆細胞と造血前駆・幹細胞が高い割合で増幅された。

これらのことから、FLCs 中の造血系細胞を三次元培養する際には、低密度条件下では効率的に細胞を増幅できないことが示された。また、今回得られた増幅度の結果を、同様の三次元培養系において造血幹細胞をストローマ細胞と共培養した結果と比較すると³⁾、増幅度は共培養した場合のほうが高かった。したがって、ストローマ細胞を用いることで、より効率的に造血系細胞を体外で増幅できることが確かめられた。

今後の予定

造血系細胞の培養密度が増幅度に及ぼす影響をより詳細に調べるとともに、ストローマ細胞との共培養実験の結果と比較検討することで、造血系細胞の増幅に最適な条件を決定する。また、ヒト由来造血系細胞の増幅についても同様の検討を行う予定である。

表 1 全細胞および各造血系細胞の増幅度

播種密度	全細胞数	Ter119	B220	c-kit	CD34
D1	0.45	0.21	1.30	0.80	0.42
D2	0.29	0.05	0.18	0.76	3.04
D10	4.47	0.59	2.32	15.5	11.6

播種密度: D1、1.0×10⁷ cells/cm³; D2、2.0×10⁷ cells/cm³; D10、1.0×10⁸ cells/cm³

参考文献

- 1) Tun T, Miyoshi H, Ema H, Nakauchi H and Ohshima N. New type of matrix support for bone marrow cell cultures: in vitro culture and in vivo transplantation experiments. *ASAIO J.* 46: 522-526, 2000
- 2) Miyoshi H, Ohshima N and Sato C. Three-dimensional culture of mouse bone marrow cells on stroma formed within a porous scaffold: influence of scaffold shape and cryopreservation of the stromal layer on expansion of haematopoietic progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med* 7: 32-38, 2013
- 3) 内海 義生. 固定処理したストローマ細胞と造血系細胞の三次元共培養. 修士論文. 筑波大学, 2014