

橋本泰匡 論文内容の要旨

主 論 文

Alteration of the extracellular matrix and alpha-gal antigens in the rat lung scaffold reseeded using human vascular and adipogenic stromal cells

(ヒト血管内皮細胞とヒト脂肪幹細胞を用いた再細胞化ラット肺における細胞外マトリックスと異種抗原の変化)

橋本泰匡, 土谷智史, 土肥良一郎, 松本桂太郎, 樋上賀一, 小林英司, 永安 武

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine,
2019 in press

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員: 永安 武 教授)

緒 言

ドナー臓器不足を背景として、再生医療技術を核とした臓器創出技術には大きな期待が寄せられている。その中でも多能性幹細胞の分化誘導による臓器創出に於いては三次元的な高次構造の再構築が重要であり、その足場を提供する方法として、臓器の細胞外骨格をそのまま抽出し、そこに細胞を播種して臓器を創出する脱細胞・再細胞化技術が注目されている。この技術では、抗原性の喪失による移植拒絶反応の抑制が期待されるが、異種の抗原も消失するのであれば、異種の臓器骨格を使用できるかもしれない。一方、脱細胞化の行程で、足場となる細胞外マトリックスへのダメージが加わると考えられるが、同時に、再細胞化の行程で、播種細胞によって独自の細胞外マトリックスが産生される可能性も考えられる。

本研究では、肺の臓器再生における細胞外マトリックスの改変に焦点を絞って研究を行った。私たちは、まずラット肺を脱細胞化することで、細胞外マトリックスの異種抗原性が喪失し、さらに再細胞化することによって播種された細胞独自の細胞外マトリックスが産生され、Scaffoldの再構築が行われるという仮説を立てた。この研究の目的は、上記仮説を証明することである。

対象と方法

8-12 週齢の F344 ラットから肺を摘出し、ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulfate; SDS) を用いた脱細胞化プロトコールで肺の細胞外骨格を抽出した。次に以下に示す各種細胞を用いて、再細胞化 3 次元培養システムで肺組織を再構築した。脂肪幹細胞に関しては、コラゲナーゼを用いて皮下脂肪組織から単離、培養、増殖させた。コントロール群、脱細胞化群に 3 種類の再細胞化群を作製し、以下の計 5 群で比較検討した。①コントロール群、②脱細胞化群、③ラット血管内皮細胞群 (RLMVECs) ④RLMVECs+ラット脂肪幹細胞 (rASCs) 群、⑤ヒト血管内皮細胞 (HUVECs) +ヒト脂肪幹細胞 (hASCs) 群

細胞外マトリックスの評価

H/E 染色、特殊染色(EVG 染色、マッソントリクローム染色、Alcian blue 染色)、細胞外マトリックスタンパクの免疫染色 (コラーゲン I、コラーゲン IV、ラミニン、フィブロネクチン) を行った。

免疫染色画像を画像解析ソフト : ImageJ を用いて定量化した。

グリコサミノグリカン assay kit を用いて定量化した。

異種抗原性の評価

動物からヒトへの異種移植を行う際に超急性拒絶反応を引き起こす α -gal 抗原を免疫染色、Western blotting 法を用いて評価した。

結 果

細胞外マトリックスの結果

脱細胞化による細胞外マトリックスのダメージを評価した特殊染色、免疫染色において、5 群間で遜色のない結果であった。

グリコサミノグリカン量は、コントロール群と比して脱細胞化群で著明に減少していたが、血管内皮細胞を用いた再細胞化群で増加傾向を認め、血管内皮細胞と脂肪幹細胞を併用した再細胞化群においてはさらに増加した。

異種抗原性の評価

α -gal 抗原の免疫染色では脱細胞化群において染色性が低下していたが、Western blotting 法では、バンドは遺残し細胞外マトリックス内に α -gal 抗原の残存が示唆された。

ヒト細胞を用いた再細胞化群においては、免疫染色、western blotting 法ともに α -gal 抗原の著明な減少を示唆する結果であった。

考 察

脱細胞化組織骨格で減少したグリコサミノグリカン量は再細胞化によって増加していることより、再細胞化による播種細胞が自ら細胞外マトリックスを産生していると考えられる。さらに、ヒト細胞を用いた再細胞化により異種抗原量の減少が認められたことで、ヒト細胞を用いた再細胞化によって、ラット細胞外マトリックスがヒト由来のものに再構築をされている可能性が示唆された。これらの結果は、異種組織骨格を臓器再生に用いることの正当性を示している。

今後は、細胞や移植モデルを用いて、細胞や生体に対して実際に抗原性の減弱が生じるかを証明していく必要がある。