

## 次世代幹細胞治療のための生物機能改変技術の開発

### Development of Technology to Manipulate the Biological Functions of Stem Cells for Cell Therapy of Next Generation

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)

京都大学・再生医科学研究所・教授



#### 研究の概要

本研究の目的は、移植幹細胞の生物機能を高めるための生体組織工学技術を開発することである。遺伝子導入のための非ウイルス性材料のスペルミン導入プルランとプラスミドDNAとのコンプレックスを3次元ゼラチンスポンジに含浸、未分化間葉系幹細胞(MSC)を播種、培養したところ、効率のよい遺伝子発現が認められた。この遺伝子導入技術は、導入培養操作により死にやすいサルMSCの神経分化誘導にも有効であった。中枢神経損傷モデル動物にこの遺伝子改変MSCを移植したところ、優れた治療効果が認められた。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学

#### 1. 研究開始当初の背景

再生医療には、細胞移植とバイオマテリアルと医工学技術を利用した生体組織工学アプローチがある。この2つのアプローチをうまく組み合わせることで、より治療効果が高まることが期待される。

国内外において、生体組織から採取可能な組織幹細胞の生物医学研究が盛んに行われている。これに対して、それらの細胞の移植後の生存率や治療効率の改善、向上を目的とした技術、方法論の研究開発は国内外を通じてほとんどなく、手がつけられていないのが研究開始当初の状態であった。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は、移植に用いる幹細胞の生物機能を高めるための生体組織工学技術の開発である。

本研究では、幹細胞へ遺伝子物質を導入する材料と培養技術を研究開発するとともに、幹細胞の生物機能の改変、増強について、in vitro および in vivo 動物実験で評価する。非ウイルス性の細胞内導入材料のデザイン、合成を行う。これらの材料による遺伝子導入効率にも影響を与える培養方法、培養技術について検討をする。本研究の独創的な点は、導入材料と導入のための培養技術との組み合わせによる効率的な幹細胞の生物機能改変である。

#### 3. 研究の方法

遺伝子導入のための非ウイルス性材料として、プルランやデキストランなどの多糖類へスペルミンを化学導入し、カチオン化多糖を作製する。カチオン化多糖とプラスミドDNAとのコンプレックスを未分化間葉系幹細胞(MSC)と培養、遺伝子発現活性を評価する。カチオン化多糖の性質がMSCの遺伝子発現に与える影響について検討する。作製したコンプレックスと細胞接着物質を3次元足場ゼラチンスポンジに組み込む。その後、スポンジ内へMSCを播種、培養、遺伝子発現を調べる。静置培養に加えて、振とうや旋回などのバイオリアクタを用いた培養を行い、遺伝子発現を比較検討する。細胞の生物機能を in vitro および in vivo で評価する。

#### 4. これまでの成果

多糖の分子量、アミン化合物の導入率などが遺伝子発現レベルに与える影響についての条件の最適化を行った。得られたカチオン化プルランは、市販の遺伝子導入試薬に比較して、高い遺伝子発現と低い細胞毒性をもっていた。カチオン化プルランとGFPのプラスミドDNAとからなるコンプレックスを細胞接着物質であるプロネクチンとともにコーティングした培養プラスチックシャーレ上でMSCに遺伝子導入培養(subfection)を行った。通常の遺伝子導入法に比較して、有意に高い遺伝子発現レベルが認められた。このsubfection法はオリジナルな技術であり、幹細胞への遺伝子導入分野に大き

なインパクトを与えると考えられる。この技術により、細胞の生存率を下げることなく、サルMSCのドーパミン分泌神経細胞への分化誘導が可能となった。これは、非ウイルス性遺伝子導入試薬を用いた幹細胞の神経分化誘導についての世界で初めての報告である。3次元細胞足場として、ゼラチンスポンジを作製した。遺伝子導入培養時でのスポンジの変形、スポンジ内部での細胞の死滅を防ぐために、スポンジに繊維あるいはセラミクス粉末を組み込んだ。この力学補強スポンジに、GFPプラスミドDNAとカチオン化多糖コンプレックスを組み入れ、MSCに対する3次元のsubfectionを行った。その結果、2次元の基材に比較して、3次元スポンジ足場を用いることで、細胞への遺伝子導入効率が高まり、かつ遺伝子発現が增強されることがわかった。また、遺伝子導入培養を静置で行ったところ、スポンジ内部の細胞は死滅し、遺伝子発現が見られなかったが、MSCを旋回および振とう培養することにより、細胞の生存率と遺伝子発現効率は有意に改善された。さらに、コンプレックスの3次元スポンジ内への組み入れた後、熱処理を行った。この熱処理時間の増大とともにコンプレックス放出期間が延長し、また、それともない遺伝子発現期間の延長が見られた。この結果は、3次元スポンジ内で増殖しているMSCに、スポンジからプラスミドDNAを含むコンプレックスが持続的に供給され、遺伝子発現が高まったことが理由であると考えられた。次に、骨形成因子(BMP)-2のプラスミドDNAを用いて、同様の検討を始めた。その結果、期待通り、BMP-2プラスミドDNAコンプレックスと3次元スポンジを組み合わせ、ラットMSCを培養することにより、MSCの骨や軟骨分化誘導を実現できた。この技術は他の幹細胞にも応用が可能である。

別の研究として、遺伝子導入による幹細胞の生物機能改変のための新規技術となる、プラスミドDNAの細胞内徐放技術を考案した。直径数百ナノメートルのカチオン化ゼラチンハイドロゲル微粒子にプラスミドDNAを含浸させた後、ラットMSCと培養した。その結果、微粒子は細胞内に取り込まれ、微粒子の分解とともにプラスミドDNAが細胞内で徐放された。プラスミドDNAの細胞内徐放期間の延長とともに、遺伝子発現期間は延長することがわかった。プラスミドDNAの細胞内徐放は新規な遺伝子改変技術であり、今後の幹細胞生物学や細胞移植治療への展開が期待される。

##### 5. 今後の計画

これまでに得られた研究成果を基に、生物機能をもつ遺伝子プラスミドDNAによるsubfectionを幹細胞に対して行い、その分化誘導を検討する。また、遺伝子を組み込んだ3次元足場とバイオリアクタを組み合わせる用い、遺伝子改変培養した幹細胞の生物機能をin vitroとin vivoで検討していく。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
1. Nagane, K., Kitada, M., Wakao, S., Dezawa, M., Tabata, Y. Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng Part A*, 15(7) 1655-65(2009)
2. Thakor, D.K., Teng, Y.D., Tabata, Y. Neuronal gene delivery by negatively charged pullulan-spermine/DNA anioplexes. *Biomaterials*, 30(9) 1815-26(2009)
3. Jo, J., Tabata, Y. Gene delivery system based on cationized polysaccharide carriers. *Soft Nanomaterials*, 319-28(2009)
4. He C.X., Tabata, Y., Gao J.Q. Non-viral gene delivery carrier and its three dimensional transfection system *Int J Pharm.*, 386 232-42(2010)
5. Nagane K, Jo J, Tabata, Y. Promoted adipogenesis of rat mesenchymal stem cells by transfection of small interfering RNA complexed with a cationized dextran. *Tissue Engineering*, 16(1) 21-31(2010)
6. Jo J, Okazaki A, Nagane K, Yamamoto M, Tabata, Y. Preparation of cationized polysaccharides as gene transfection carrier for bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomater Sciences Polym Eds*, 21(2) 185-204(2010)
7. Kido Y, Jo J, Tabata, Y. A gene transfection for rat mesenchymal stromal cells in biodegradable gelatin scaffolds containing cationized polysaccharides. *Biomaterials*, 32(3) 919-25(2011)
8. Dai Matsuse, Masaaki Kitada, Fumitaka Ogura, Shohei Wakao, Misaki Kohama, Jun-ichi Kira, Yasuhiko Tabata, Mari Dezawa. Combined transplantation of bone marrow stromal cell-derived neural progenitor cells with a collagen sponge and fibroblast growth factor (bFGF) releasing microspheres enhances recovery after cerebral ischemia in rats. *Tissue Engineering*, in press

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te02/index-j.php3>