

講座名 再生医療・細胞治療研究  
代表者 特任准教授 常 徳華  
構成員 大学院生 朱 燦基  
研究員 申屠 雲超  
研究員 小林 正樹  
研究員 木田 克彦  
研究補佐員 梶原 紀子

### 【 講座概要 】

再生医療・細胞治療研究講座は高分子培養基材を用いた三次元臍帯由来間葉系幹細胞 (UCMSCs) の大量培養と幹細胞画像診断の開発などを推進する目的として、令和3年4月に設置されました。

間葉系幹細胞 (MSCs) とは生体内に存在する体性幹細胞の一つであり、細胞増殖促進効果、抗炎症効果、血管新生促進効果などを持つサイトカインを分泌し、パラクラインを介して組織の修復を支持することが明らかにされています。近年、臍帯組織が若い組織であるため、細胞の活性化が高いことから、臍帯から採取された間葉系幹細胞 (UCMSCs) が注目を集めています。

MSCs の培養においては、二次元培養 (2D) と三次元培養 (3D) の 2 種類に分類され、2D 培養より 3D 培養の方が細胞の自然な形状が保たれており、細胞間の結合も広く見られ、細胞間のコミュニケーションが可能となります。3D 培養することにより、細胞の凝集塊が形成され、より生体内に近い培養環境である三次元的な状態で細胞を増殖し、細胞の特徴を維持しながら細胞の機能を高めることが可能となります。

我々は培養基材 Cellhesion®を用いた 2D 培養と 3D 培養した UCMSCs の増殖能、分化能、細胞表面マーカー、血管分泌因子パラクライン機能などを比較し確認しました。今回更に、3D 培養した UCMSCs の遊走能と RNA-Seq 解析などを行いました。

### 【 研究内容 】

培養基材 Cellhesion®を培地で 20 倍に希釈し、UCMSCs の 3D 培養を行いました。1 週間後に 3D 培養した UCMSCs を走査性顕微鏡で観察し、細胞の分化能と細胞の表面マーカーを確認しました。同時に 2D 培養と 3D 培養した細胞の増殖能と血管分泌因子 VEGF、HGF などを測定し、in vitro で管腔形成試験を行いました。細胞の遊走能について、2D 培養と 3D 培養した UCMSCs が移動する速度を比較し、検討しました。更に、3D 培養した UCMSCs の RNA-Seq 解析なども行いました。

実験の結果として、3D 培養することにより、細胞の凝集塊を形成し、より生体内に近い培養環境である三次元的な状態であることが走査性電子顕微鏡 (SEM) で観察されました。細胞の増殖実験では、3 日目まで 2D 培養に比べ 3D 培養した細胞数が約 2 倍であり、細胞を培養する時間と共に、細胞は指数関数的に増殖し続けていたことが明らかになりました。3D 培養した UCMSCs 細胞表面マーカー CD73、CD90、CD105 などを確認しました。血管分泌因子について、2D 培養と 3D 培養における HGF、VEGF、IL-6、IL-8 の分泌量を培養後 1 日目から 7 日目まで測定し、2D 培養より 3D 培養した UCMSCs の分泌量の方が多くなりまいした。管腔形成試験は 2D 培養と 3D 培養した

UCMSCs の上清液を血管内皮細胞 (HUVEC) に添加することにより、内皮細胞は管腔を形成しました。12 時間後に、2D 培養に比べ 3D 培養では血管新生の管腔面積、総延長及び分枝点数が多く見られました。細胞マイグレーション実験では、培養時間の経過と共に、2D 培養より 3D 培養した UCMSCs の方が細胞マイグレーションのスピードが速かったです。また、3D 培養した UCMSCs の RNA-Seq 解析により、細胞サイクル、DNA 修復などに関連する遺伝子が多くあると解明され、細胞増殖、DNA 複製、MCM 複合体などにおいても遺伝子が発現しました。また、細胞と細胞間のシグナル伝達が観察されました。そして、このことにより MSCs はマクロファージの M1 型極性を誘導し、炎症を抑えることが示唆されました。結果として、3D 培養した UCMSCs の増殖スピード、抗炎症作用などが高まっていたことが明確になりました。

### 【 今後の展望 】

3D培養した間葉系幹細胞は、細胞の未分化能・遊走能が保たれており、2D培養では得られない大量かつ高い細胞活性が見られることから、再生医療・細胞治療などへ応用することが期待されます。今後、更にin vivoで虚血モデルを用い、3D培養したUCMSCsと血管分泌因子の有効性について検討する予定であります。

### 【令和5年度活動実績】

#### <論文・著書>

#### 英文論文

#### 国際学術論文発表

1. Shuoji Zhu, Junfeng Xuan, Yunchao Shentu, Katsuhiko Kida, Masaki Kobayashi, Wei Wang, Minoru Ono, **Dehua Chang**\*. Effect of chitin-architected spatiotemporal three-dimensional culture microenvironments on human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Bioactive Materials* 35 (2024)291-305. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2024.01.014>
2. Ming Xie, Shuoji Zhu, Gang Liu, Yijin Wu, Wenkai Zhou, Ding dang Yu, Jinkai Wan, Shenghui, Xing, Siqing Wang, Lin Gan Ge Li, **Dehua Chang**\*, Hao Lai, Nanbo Liu, Ping Zhu. A Novel Quantitative Electrocardiography Strategy Reveals the Electroinhibitory Effect of Tamoxifen on the Mouse Heart. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 26 April 2023. <https://doi.org/10.1007/s12265-023-10395-5>
3. **Dehua Chang**\*, Xiaotong Yang, Siyang Fan, Taibing Fan, Mingkui Zhang, Minoru Ono. Engineering of MSCs sheet for the prevention of myocardial ischemia and for left ventricle remodeling. *Stem Cell Research & Therapy*. 2023, 14:102 <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03322-7>

4. Tucheng Sun, Changjing Yu, Ying Zhong, Rui Guo, Keluo Cheng, **Dehua Chang**\*, Pingzhu. Construction of multifunctional hydrogel with metal-polyphenol capsules for infected full-thickness skin wound healing. *Bioactive Materials* 24 (2023) 69-80

#### <学会・講演会発表>

##### 国内学会

1. **Chang D.**, Zhu S, Kida K, Kobayashi M, Horikawa M, Wang W, Ono M 新規培養基材を用いた三次元培養した臍帯由来間葉系幹細胞の特徴と機能に関する研究 (ポスター23) 第23回日本再生医療学会総会 2024,3,21-23 新潟

##### 国際学会

2. **Dehua Chang.** Clinical Translation of Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell Sheet. The 24<sup>th</sup> South China International Congress of Cardiology. June 8-11, 2023, Guangzhou, China.
3. **D. Chang,** S. Zhu, M. Ono. Characteristics and Functions of Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Culture Using Macromolecules. *Tissue Engineering Strategies for Human Health and Longevity*. Termis Americas. 2023 Annual Conference, April 11-14, 2023, Boston.