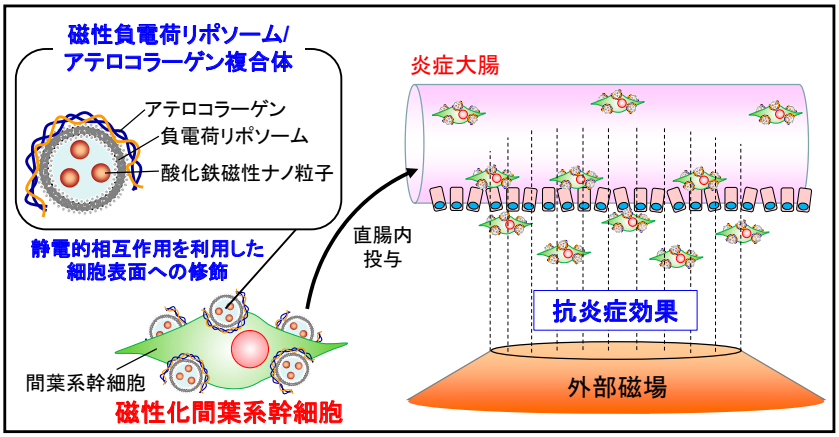
198　磁性体の細胞表面修飾による磁性化間葉系幹細胞の作製	河野　裕允

【目的】間葉系幹細胞（MSC）は、種々の免疫調節物質の産生を通して、炎症反応の抑制や損傷組織の修復に寄与することが知られている。そのため、MSC は、種々の炎症性疾患に対する有効な細胞製剤となることが期待されている。MSC を用いた細胞治療法を構築するうえでは、MSC が長期間疾患部位に留まることが望ましいが、生体内に投与された MSC の組織滞留性は低い。そのため、MSC を用いた効果的な細胞治療を実現するためには、疾患部位に MSC を滞留させる技術の開発が必要である。細胞を標的組織に滞留させる技術としては、細胞の磁性化と外部磁場による誘導を利用する手法が有用である。我々はこれまで、磁性ナノ粒子を内封した負電荷リポソームと正電荷を有するアテロコラーゲンの複合体を開発し、本複合体が MSC 表面に効率的に吸着することを明らかにしている。本研究では、磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体を利用して MSC 表面に磁性体を修飾し、本磁性化 MSC の大腸内滞留性、および潰瘍性大腸炎に対する治療効果の評価を行った。

【方法】蛍光標識磁性負電荷リポソームと種々の濃度のアテロコラーゲンを低温下で混合することで複合体を作製した。各複合体を MSC に添加し磁場負荷を施した後、MSC 表面に吸着した複合体量を測定した。また、細胞生存率を WST-8 アッセイで評価した。骨分化能、脂肪分化能については、各分化誘導培地中で MSC を培養した後、染色することで評価した。次に、作製した磁性化 MSC をマウス結腸がん由来細胞株 Caco-2 に添加し、磁場付加を施した際の細胞接着効率を評価した。さらに、磁性化 MSC を潰瘍性大腸炎モデルマウスに直腸内投与した際の、大腸内滞留性および抗炎症効果を評価した。

【結果】高濃度のアテロコラーゲンを用いて作製した磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体は、MSC に吸着した後、細胞表面に安定に留まることが明らかとなった。この時、磁性化による MSC の生存率の低下、および骨分化能、脂肪分化能の変化は認められなかった。この磁性化 MSC を Caco-2 細胞に添加し磁場付加を施した結果、Caco-2 細胞に短時間で顕著に接着した。また、Caco-2 細胞に接着した磁性化 MSC は、生理食塩水による洗浄を繰り返してもほとんど剥離しなかった。次に、磁性化 MSC を潰瘍性大腸炎モデルマウスに直腸内投与した結果、磁場付加を施すことで大腸内における MSC の滞留性が顕著に向上することが明らかとなった。さらに、大腸内における炎症性サイトカイン量が有意に減少することも示された。以上より、磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体を用いて作製した磁性化 MSC は、潰瘍性大腸炎に対する効果的な細胞製剤となる可能性が示された。

間葉系幹細胞の磁性化による大腸内滞留性向上戦略



198. 磁性体の細胞表面修飾による磁性化間葉系幹細胞の作製

河野　裕允

*立命館大学 立命館グローバル・イノベーション研究機構

Key words：間葉系幹細胞，磁性化，リポソーム，大腸炎

緒　言

間葉系幹細胞（MSC）は、骨髄や脂肪など様々な組織に存在する体性幹細胞であり、種々の液性因子を産生し、免疫調節作用を発揮することが知られている。このMSCが示す免疫調節作用は、炎症性腸疾患などの自己免疫疾患の症状を劇的に回復させることが明らかにされてきているため、MSCを用いた炎症性疾患に対する細胞治療法の開発が盛んに進められている[1]。このようなMSCを用いた細胞治療法を構築するにあたり、より高い治療効果を得るためには、MSCが損傷組織に効率的に移行し、その場に留まることが望ましい。しかしながら、生体内に投与されたMSCの組織滞留性は非常に低い。そのため、MSCを用いた効果的な細胞治療法を構築するためには、MSCを標的組織に長期間保持する技術の開発が必要である。

体外から投与した細胞を組織内に滞留させる技術として、外部磁場の利用が有用である。すなわち、酸化鉄磁性ナノ粒子（SPIONs）の導入により細胞を磁性化することで、外部磁場を付加した部位に細胞を保持することができる。我々はこれまで、SPIONsを導入した免疫細胞と外部磁場を併用することで、免疫細胞を大腸内に効率的に保持することに成功している［2]。一方、SPIONsは濃度依存的に細胞毒性を示すことに加え、MSCの骨分化を抑制するなど、MSCの多分化能にも影響を及ぼすことが報告されている。そのため、MSCの性質と生存率への影響を考えると、SPIONsを用いてMSCを磁性化する場合、SPIONsはMSC内部へ導入するのではなく、MSC表面に修飾する方が望ましい。

我々はこれまで、安全性の高い負電荷リン脂質を構成成分とする脂質二重膜の小胞であるリポソームの内部にSPIONsを封入した「磁性負電荷リポソーム」と正電荷を有する生体適合性材料である「アテロコラーゲン」の複合体を作製し、本複合体が磁場存在下において高効率に細胞に吸着することを明らかにしている［3]。また、アテロコラーゲン濃度を増大することで、本複合体の細胞内移行が抑制され、細胞表面に留まることも確認している。

そこで本研究では、磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体を利用して、細胞内へのSPIONsの導入を伴わない磁性化MSCを作製し、その大腸内滞留性および潰瘍性大腸炎に対する治療効果を評価した。本研究より、複合体を利用して作製した磁性化MSCと外部磁場付加を併用することで、MSCの大腸内滞留性を顕著に向上でき、その結果、大腸内炎症反応を有意に抑制できることを明らかにした。

方　法

1. 磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体を利用したMSCの磁性化の最適化

異なるアテロコラーゲン濃度で作製した蛍光標識磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体を緑色蛍光タンパク質（GFP）発現マウスMSCに添加した後、30分間磁場付加を施した。その後、細胞全体および細胞内のリポソーム濃度を測定した。

2. 磁性化MSCのCaco-2細胞単層膜に対する接着効率の評価

磁性化MSCをヒト結腸がん由来細胞株Caco-2の単層膜上に添加し、10分間磁場付加を施した後、蛍光顕微鏡を用いてCaco-2細胞単層膜上に接着した磁性化MSCを観察した。その後、生理食塩水を用いて10回洗浄を行った後に再度観察を行った。

*現在の所属：神戸薬科大学 薬剤学研究室

3. 磁性化 MSC のマウス大腸内滞留性の評価

3%デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）水溶液を摂水させることで作製した潰瘍性大腸炎モデルマウスに対して、磁性化 MSC を直腸内投与した後、大腸に対して磁場付加を 1 時間施した。その後、経日的に大腸内の MSC 量を測定した。

4. 磁性化 MSC のマウス大腸炎治療効果の評価

潰瘍性大腸炎モデルマウスに対して磁性化 MSC を直腸内投与した後、大腸に対して磁場付加を施した。その 3 日後、大腸を摘出、ホモジナイズし、ELISA 法により大腸内炎症性サイトカイン濃度を測定した。

5. 統計処理

実験結果は、一元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法の多重比較を行い、P 値が 0.05 未満を有意と判定した。

結果および考察

1. 磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体を用いた磁性化 MSC の作製

まず、MSC の磁性化方法を最適化するため、種々のアテロコラーゲン濃度で作製した磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体の MSC に対する吸着特性を評価した。その結果、低濃度のアテロコラーゲンを用いて作製した複合体は効率的に MSC に吸着する一方で、細胞内にも一定の割合で取り込まれることが明らかとなった（図 1A）。一方、高濃度のアテロコラーゲンを用いた場合、MSC に対する複合体の吸着量自体は少ないものの、その大部分が細胞内へは移行せず、MSC 表面に保持されることが示された。これは、高濃度のアテロコラーゲンは繊維状の構造を形成するため、磁性負電荷リポソームの細胞内移行を物理的に抑制したためであると推察される。また、高濃度のアテロコラーゲンを用いた場合、複合体が MSC に吸着した後、解離しにくいことも確認された（図 1B）。これは、高濃度のアテロコラーゲンは粘性が高いため、効率的に磁性負電荷リポソームを保持したためであると考えられる。以上より、磁性化 MSC の作製には、高濃度のアテロコラーゲンを用いて作製した複合体を用いることとした。

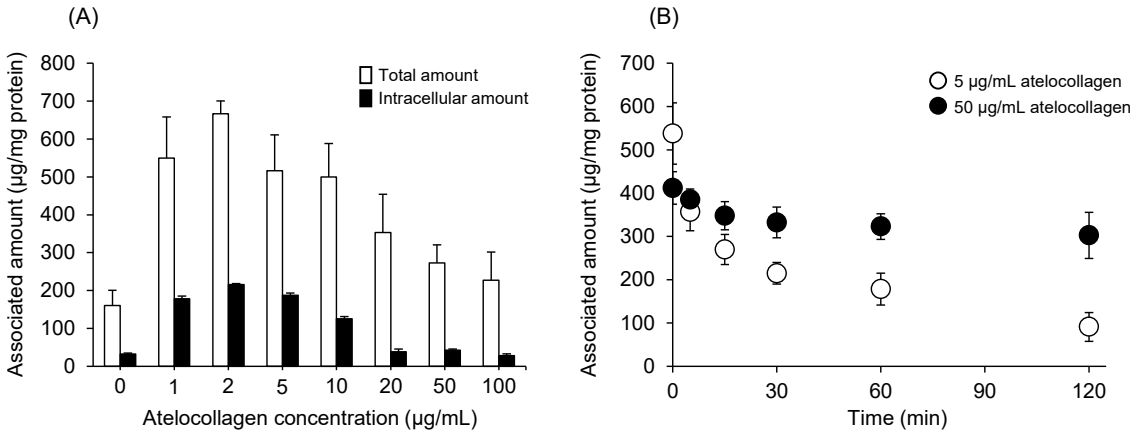


図 1. MSC に対する磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体の吸着・取り込みの評価

A）異なるアテロコラーゲン濃度で作製した複合体の細胞吸着・取り込み量。

B）MSC に吸着した複合体の経時的な減少。

2. 磁性化 MSC の *in vitro* 接着効率の評価

次に、磁性化 MSC の Caco-2 細胞単層膜に対する接着効率を評価した。その結果、磁場付加を施すことにより磁性化 MSC の接着効率が顕著に増大することが明らかとなった（図 2）。また、Caco-2 細胞単層膜に接着した MSC は、生理食塩水による洗浄を繰り返してもほとんど剥離しなかった。本結果は、MSC 表面のアテロコラーゲンが静電的相互作用を介して MSC と Caco-2 細胞の接着を強固にしている可能性を示唆するものであった。

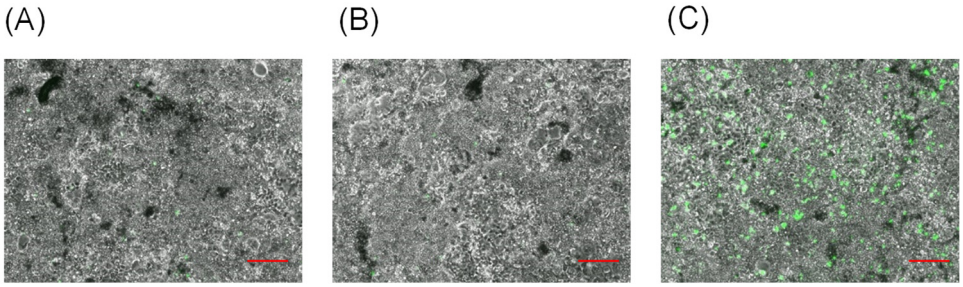


図 2. Caco-2 細胞単層膜に接着した磁性化 MSC の観察
MSC（A）、あるいは磁性化 MSC（B）を Caco-2 細胞単層膜に添加した後、蛍光顕微鏡を用いて接着した MSC（緑色蛍光）を観察した。（C）には、磁性化 MSC を添加後、10 分間磁場付加を施した結果を示す。スケールバー：10μm。

3. 磁性化 MSC のマウス大腸内滞留性の評価

磁性化 MSC を潰瘍性大腸炎モデルマウス直腸内に投与した後、大腸選択的に磁場付加を施した結果、投与後 3 日の時点でも約 50%の MSC が大腸内に滞留していることが示された。これは、過去に我々が報告している磁性化マクロファージの大腸内滞留性を上回るものであり［2］、前項と同様に、アテロコラーゲンが磁性化 MSC の大腸への高い接着効率および滞留性に寄与しているものと推察される。

4. 磁性化 MSC による大腸炎抑制効果の評価

最後に、潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける大腸内炎症反応に対する磁性化 MSC の治療効果を評価した。磁性化 MSC を直腸内投与した場合、大腸内の炎症性サイトカイン（IL-6、TNF-α、および IL-1β）濃度に変化は認められなかったが、磁場付加を併用した際には顕著な減少が認められた（図 3）。本結果より、MSC が長期間大腸内に滞留することで高い抗炎症効果を得られることが示唆された。

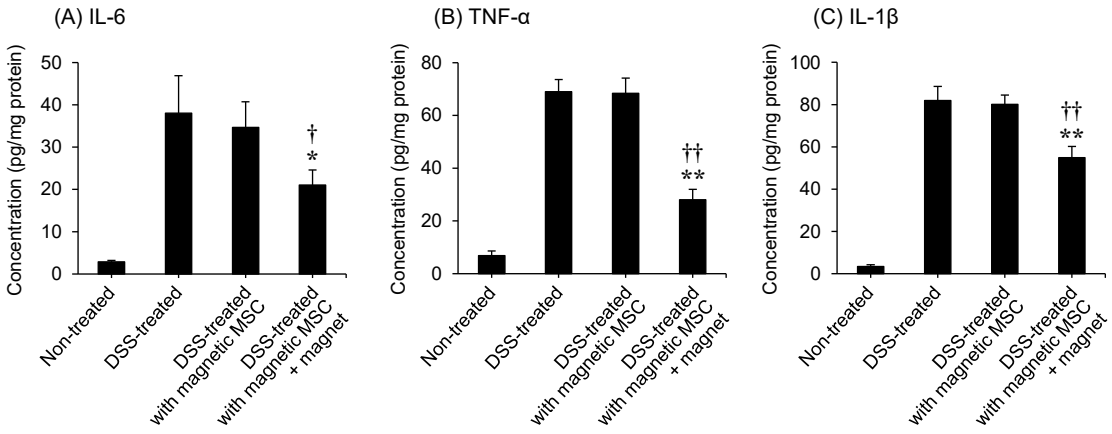


図 3. 磁性化 MSC による大腸炎症反応の抑制効果の評価
磁性化 MSC を潰瘍性大腸炎モデルマウスに直腸内投与した 3 日後に、大腸内 IL-6（A）、TNF-α（B）、および IL-1β（C）濃度を ELISA により測定した。
*P＜0.05、**P＜0.01（DSS 処理群との比較）、†P＜0.05、††P＜0.01（磁性化 MSC 治療群との比較）。

以上、本研究では、磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体を利用した新規細胞磁性化法を構築し、本手法により作製した磁性化MSC と外部磁場を併用することで、直腸内投与したMSC を長期間大腸内に保持することができ、それにより高い抗炎症効果が得られることを明らかにした。本成果は、磁性化 MSC が炎症疾患に対する有効な細胞製剤となる可能性を示すものである。

共同研究者

本研究の共同研究者は、立命館大学理工学部マイクロ・ナノメカトロニクス研究室の小西聡である。

文　献

1） Regmi S, Pathak S, Kim JO, Yong CS, Jeong JH. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. Eur J Cell Biol. 2019 Dec;98(5-8):151041. PMID: 31023504 DOI: 10.1016/j.ejcb.2019.04.002

2） Kono Y, Gogatsubo S, Ohba T, Fujita T. Enhanced macrophage delivery to the colon using magnetic lipoplexes with a magnetic field. Drug Deliv. 2019 Dec;26(1):935-943. PMID: 31530198 DOI: 10.1080/10717544.2019.1662515

3） Kono Y, Nakai T, Taguchi H, Fujita T. Development of magnetic anionic liposome/atelocollagen complexes for efficient magnetic drug targeting. Drug Deliv. Nov;24(1):1740-1749. PMID: 29141461 DOI: 10.1080/10717544.2017.1402219