

C316

酵素架橋性カルボキシメチルセルロースゲルを用いた脂肪組織体の構築

(九大院工/ JSPS) ○(学)大串 裕子*・(九大院工)(正)境 慎司・(正)武井 孝行・
(正)井嶋 博之・(正)川上 幸衛

【緒言】

外傷や腫瘍摘出、先天的奇形によって失われた軟組織の再建を目的として、幹細胞と適切な足場材料を用いた脂肪組織の構築が注目されている。脂肪組織工学の細胞源として用いられる脂肪組織由来幹細胞 (ASCs) や脂肪前駆細胞の接着、増殖、分化挙動は、足場材料の特性に影響を受けることが知られている。本研究では、足場材料として、カルボキシメチルセルロース (CMC) の側差にフェノール性水酸基 (Ph-OH 基) を付与することにより、ペルオキシダーゼ酵素反応により水ゲルを形成する酵素架橋性 CMC (CMC-Ph) を創製した¹⁾。CMC-Ph のゲル化反応は数分程度の短い時間で進行するため、注射による移植が可能であり、移植時の患者の負担を軽減することができる。この水ゲルに ASCs を包括して培養し、CMC-Ph ゲル内での ASCs の増殖と脂肪細胞への分化を評価した。また、ASCs と塩基性繊維芽細胞増殖因子を包括した CMC-Ph ゲルをラット皮下に注入し、生体内での脂肪組織の構築を試みた。

【実験方法】

水溶性カルボジイミドを用いて CMC のカルボキシメチル基とチラミン塩酸塩のアミノ基を結合させることにより CMC に Ph-OH 基を導入した。実験には、Ph-OH 基の導入率が 5.6 個/100 units-CMC の CMC-Ph を使用した。

Wistar ラットの皮下脂肪組織から単離した ASCs を CMC-Ph ゲルに包括して培養した。細胞の増殖は、Cell counting kit-8 (同仁化学) を用いてミトコンドリア活性を測定することにより評価した。コントロールとして、コラーゲンゲルおよびアガロースゲルに包括した ASCs の活性も同様に測定した。また、分化誘導には、insulin、dexamethasone、3-isobutyl-1-methylxanthin を添加したダルベッコ変法イーグル培地を用い、脂肪細胞への分化は、細胞内のグリセロール 3 リン酸脱水素酵素 (GPDH) 活性測定により評価した。GPDH 活性は NADH の減少から図 2 の式より算出した。



図 1 GPDH によるジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) からのグリセロール 3 リン酸の合成反応

$$\text{GPDH 活性 (U/ml)} = \frac{\Delta \text{O.D. (1分間あたりの吸光度の変化量)}}{6.22 (\text{NADH のミリモル分子吸光係数})} \times \frac{(\text{ml- 反応総量})}{(\text{ml- 検体量})} \times \frac{\text{検体希釈率}}{(\text{cm- 光路長})}$$

図 2 GPDH 活性の計算式

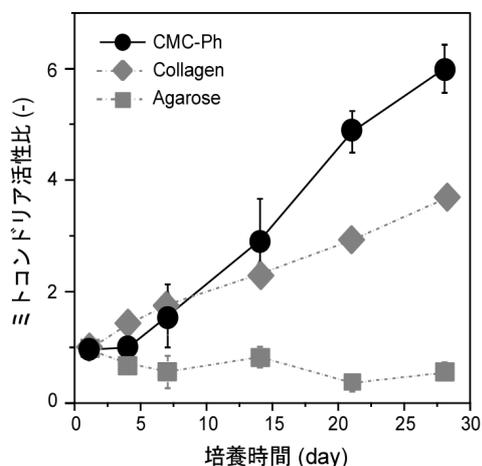


図 3 包括細胞のミトコンドリア活性比 ($n=3$, bars; S.D.)

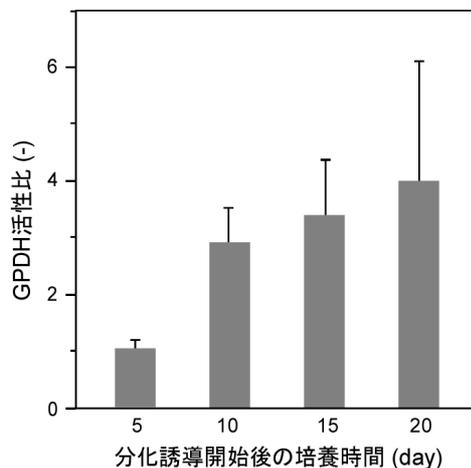


図 4 包括細胞の GPDH 活性比 ($n=3$, bars; S.D.)

【結果および考察】

図 3 にミトコンドリア活性比を示す。アガロースゲルに包括した ASCs のミトコンドリア活性は、培養期間を通してほぼ一定であったが、コラーゲンゲルに包括した ASCs と CMC-Ph ゲルに包括した ASCs のミトコンドリア活性は、培養時間の経過に伴い増大した。このことから、CMC-Ph ゲルに包括された ASCs は、コラーゲンゲルに包括された ASCs と同様に増殖したと考えられる。図 4 に分化誘導後の GPDH 活性比を示す。分化誘導後の培養時間経過に伴い、細胞の GPDH 活性は増大した。このことから、CMC-Ph ゲルに包括した ASCs が分化誘導刺激により脂肪細胞へ分化したことが確認された。

【参考文献】

- 1) Ogushi Y, Sakai S, Kawakami K., *J. Biosci. Bioeng.* (2007)

*E-mail: yogushi@chem-eng.kyushu-u.ac.jp