

平成30年度 技術交流助成 成果報告 (海外留学)



2020年 9月 30日

所属：国立循環器病研究センター 心臓血管外科部門 心臓外科

氏名：山下 築

留 学 先：ロンドン大学クイーンメアリー校
パーツアンドロンドン医学部
ウィリアムハーベイ研究所

留 学 期 間：平成30年 10月 1日～ 令和2年 9月 30日

1. 留学中に実施した研究テーマ

MRI を用いた異種間葉系幹細胞移植の治療効果解析について研究

2. 留学期間中の研究成果

心不全動物実験モデルとして心筋症モデルラットを使用し、ラットの病的心臓に対してヒト羊膜由来 MSC を用いた新世代バイオマテリアルを心表面へ塗布する方法(epicardial placement)にて移植(異種幹細胞移植)することを検討し、移植細胞に事前に高分子化ガドリニウム製剤(Gd_2O_3)を取り込ませ、MRI にて術後評価する実験を企図した。実験の手順としては、

1) In vitro における、異なった Gd_2O_3 の濃度における細胞への Cell toxicity の評価、 Gd_2O_3 の取り込みを免疫蛍光細胞染色(ICC)で評価、フローサイトメトリーによる取り込み後の細胞形質の評価、 2) In vivo 実験モデルにおける Gd_2O_3 を取り込んだ細胞を移植後に MRI で画像評価するという2段階に分けて計画した。

まず Cell toxicity の評価を行った。ヒト羊膜由来 MSC (hAM-MSC) を 6 well で培養し、 Gd_2O_3 を 0mM, 0.01mM, 0.05mM, 0.1mM の各濃度で各 well に投与し 24 時間後の細胞

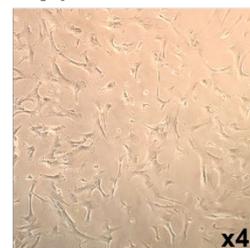
Figure 1

Pre-induction microscopy



Gd_2O_3 induction (24h later) microscopy

Gd_2O_3 concentration 0.01mM



viability を評価した (Figure 1)。同時に hAM-MSC 培養 medium の濃度において牛胎児血清 (FBS) の濃度を 5% ならびに 10% の 2 群に分け、 Gd_2O_3 の細胞投与における Cell viability に差があるか検討した (Figure 2)。結果として 5% FBS medium 使用群において、10% FBS medium 使用群と比べ有意に viability は

良かった ($p=0.0181$)。また 5% FBS medium 使用群と 10% FBS medium 使用群のそれぞれにおいて、 Gd_2O_3 を投与していない群 (0mM) と Gd_2O_3 投与した 0.01mM, 0.05mM, 0.1mM の濃度群で比較検討したが、有意差は認めなかった。これらの実験から 5% FBS medium を使用した群において 10% FBS medium を使用した群と比較し cell viability は改善するものの、 Gd_2O_3 投与群と非投与群で細胞の viability は変わらなかったと結論付けられた。

次に Gd_2O_3 の取り込みを免疫蛍光細胞染色 (ICC) で評価した (Figure 3)。まず Gd_2O_3 を dextran にてコロイド化した状態にて上述した方法で hAM-MSC に取り込ませ、その後 FITC conjugated anti-dextran antibody を用いて ICC を行った。Figure 3 に示すように Gd_2O_3 濃度 0.1mM において、細胞内への Gd_2O_3 の取り込みを確認した。

In vitro 最後の実験として、 Gd_2O_3 取り込み後の細胞の細胞形質の評価を MSC の細胞表面マーカーの一つである CD73 を指標に、フローサイトメトリーによって行った (Figure 4)。 Gd_2O_3 を取り込んだ hAM-MSC の CD73 発現率は 97.4% であり、これは Gd_2O_3 を加えなかった hAM-MSC の CD73 陽性率 (96.7%) と比べて遜色ない結果であった。

以上の結果から、今回用いた高分子化ガドリニウム製剤 (Gd_2O_3) は in vitro において、cell toxicity は顕著ではなく、かつ hAM-MSC の細胞形質を変化させることなく、取り込まれると結論付けられた。

Figure 2

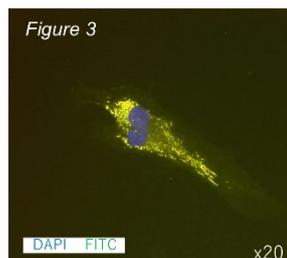
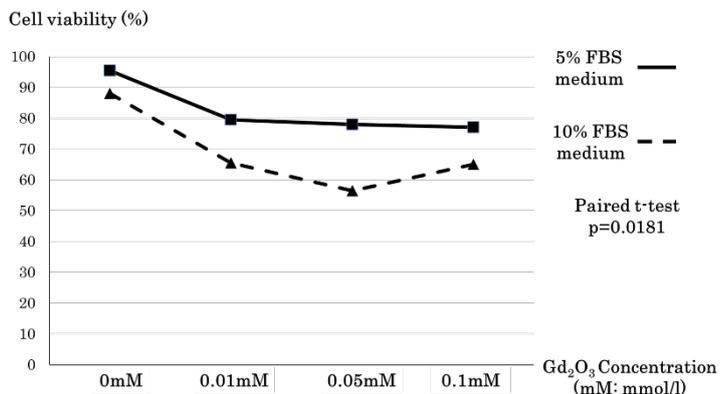
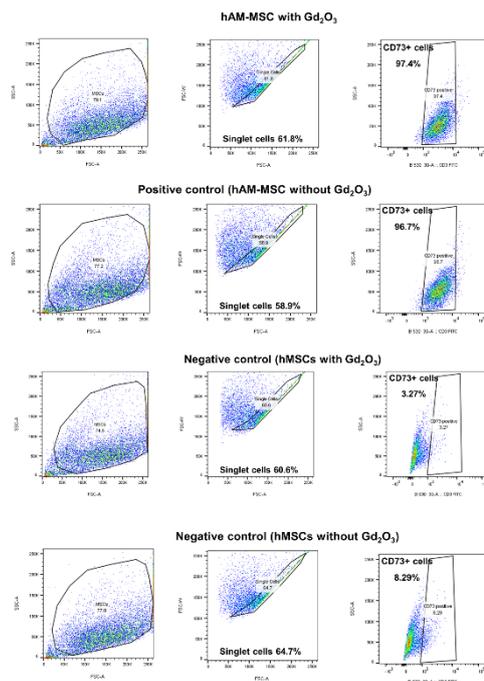


Figure 4



また当初の予定としては虚血性心筋症、拡張型心筋症、劇症型心筋症モデルラットを使用し、ラットの病的心臓に対してGd₂O₃で標識した hAM-MSC を用いた新世代バイオマテリアルを心表面へ塗布する方法(epicardial placement)にて移植(異種幹細胞移植)しMRIで評価することを検討していたが、折からのCOVID-19 pandemicにより本実験関連実験施設が長期間閉鎖となった。実験施設再開時までにビザの有効期限を迎えるため、やむなく in vivo の実験は途中終了した。

3. 今後の研究計画

残念ながら、COVID-19 pandemicの影響により本研究の全てを留学中に完遂することは能わなかった。今後は in vivo における検証実験に移ることとなるが、留学前の所属施設である国立循環器病研究センターと、連携を取り合い、本留学の結果が無駄にならないように努力し、形に残る業績として残していきたい。帰国後も Queen Mary University of London の上司や同僚と密に連絡を取り合い、今後も同研究の進展および、医工技術の発展に貢献できるよう継続して努力し、本研究を論文に残していきたいと考えている。

4. 謝辞

初めての留学であり、最初の数カ月は日本での暮らしとの違いもあり戸惑いの連続であった。いよいよ本格的な study に取り組もうとした留学2年目の矢先、COVID-19 pandemicにより自宅待機を余儀なくされた。研究環境のみならず、あらゆる店、施設、公共交通機関までも一斉に閉鎖されるという、普通の生活を営むことも困難となる厳しい状況ではあったが、周囲のサポートもあり危機を乗り越えることができた。研究ではリモートワークを駆使し研究所スタッフ達と連絡を取りながら、一定の留学成果を挙げる事ができた。私がこの留学で得たものは、アイデアの着想、方法、実験、成果といった基礎研究のスキームの獲得にとどまらず、母国と留学先の異国との違いを乗り越え、一個人として異国の社会とどのように接し、溶け込んでいくかというかけがえのない人生経験であった。

コロナ禍により多くの研究者が在宅勤務を余儀なくされ、その中でも実験を苦心しながら遂行できたことは、いかに困難な状況の中でも目標に向かって努力する大切さを知る貴重な経験であった。かかる大変な状況の中ご指導いただいた鈴木憲教授、艱難辛苦を共に乗り越え実験の邁進にご尽力いただいた Queen Mary University of London のスタッフ達には、深く感謝の意を表したい。

最後になったが、中谷医工計測技術振興財団からの御支援により、今回の貴重な

留学の機会をいただくことができた。この場を借りて、篤く御礼申し上げる。



鈴木憲教授と研究室メンバーの集合写真。国際色豊かなラボであった。



研究会でのポスター発表。



ロンドン市内に位置するロンドン大学クイーンメアリー校