

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号	2023C-25						
研究開発課題名	羊膜上皮細胞組織の作製とナノ粒子暴露による影響						
分類※	<input type="checkbox"/> ①	<input checked="" type="checkbox"/> ②	<input type="checkbox"/> ③	<input type="checkbox"/> ④	<input type="checkbox"/> ⑤	<input type="checkbox"/> ⑥	<input type="checkbox"/> ⑦
区分	<input type="checkbox"/> A	<input type="checkbox"/> B	<input checked="" type="checkbox"/> C	<input type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> S		
主任研究者	所属	周産期病態研究部					
	役職	研究員					
	氏名	宮本義孝					
実施期間	2023年 4月 1日 ~ 2024年 3月 31日						

※分類は下記①～⑦より選択

- ① 日本の成育分野の疾患の研究の基盤となる研究
- ② 診断、治療及び予防法の開発に関する研究
- ③ 発症機序や病態の解明等を行う研究
- ④ 診断や治療のための基準の開発等に関する研究
- ⑤ 患児・者のQOL向上に結びつく研究
- ⑥ 研究的視点や技術をもつ医療従事者を育てるための研究
(プロトコル作成のフェージビリティ研究)
- ⑦ 政策提言に結びつく研究

成果の概要

【背景および目的】本研究では、羊膜上皮細胞を始めとする細胞シートを作製し、体内に取り込まれるナノ粒子暴露による影響を評価することを目的とする。体や器官の表面には上皮細胞と呼ばれる細胞のシートによって覆われ、外界からの異物の侵入を防ぐバリアとして機能している。しかし、ひとたび上皮細胞シートのバリア機能が破綻すると、生体への致命的な影響や疾患の誘発につながると考えられる。したがって、ナノ粒子の暴露がシートのバリア機能にどのような影響を与えるか検討した。

【研究計画】12 ウェル細胞培養プレート内にカルチャーインサート（PET膜、もしくは、コラーゲン薄膜）を配置した後に、各ウェルに上皮細胞および血管内皮細胞を播種・培養し、単層膜を形成した。作製した単層膜上に、それぞれ所定の濃度の磁性ナノ微粒子を暴露し、細胞バリア機能への影響を検討した。磁性ナノ微粒子添加1日後の単層膜上の鉄の検出、細胞生存率への影響、経上皮電気抵抗（TEER）測定によるバリア機能を評価した。

【結果および考察】まず、ナノ粒子暴露による上皮細胞（A549細胞）および内皮細胞（HH細胞）への影響を検討した。ナノ微粒子として、MRI用肝臓造影剤リゾピスト、カチオン性酸化鉄微粒子EADMを用いた。ナノ微粒子の特性評価した結果、リゾピスト、EADMの直径は、57.9 nm、52.1 nmであり、ゼータ電位は、-14.7 mV、+30.1 mVであった。続いて、コラーゲンコートしたPET

膜上に A549 細胞を播種・培養し、ナノ微粒子を暴露した後に、細胞および単層膜の状態を検討した。EADM 微粒子は A549 細胞内に取り込まれ、濃度依存的に高い毒性が確認できた。一方、リゾビストは細胞内にはほとんど取り込まれず、EADM と比べると、低毒性が確認できた。そして、微粒子暴露による A549 細胞の生存率には、大きな影響を及ぼさなかった。また、ナノ微粒子暴露前後の上皮細胞シートは、経上皮電気抵抗値、TEER を測定し、シートのバリア機能が保持されていることを確認できた。内皮細胞についても、同様の結果が得られた。

成育で得られたヒト羊膜から、研究で利用する細胞を分離・培養・保管した。コラーゲン薄膜上に、ヒト羊膜上皮細胞を播種・培養し、上皮細胞シートを作製した。結果、経上皮電気抵抗値、TEER を測定し、シートのバリア機能を保持されていた。