

令和 5 年 11 月 9 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03008

研究課題名（和文）三次元パターンを用いた脂肪組織由来幹細胞の迅速な大量抽出技術の開発

研究課題名（英文）Development of the rapid mass extraction system for adipose derived stem cells by using micro-patterned scaffold

研究代表者

角南 寛（Sunami, Hiroshi）

琉球大学・医学部・特命准教授

研究者番号：50374723

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000 円

研究成果の概要（和文）：脂肪幹細胞（ADSCs）は、脂肪組織に含まれる他の細胞よりもマイクロパターン基材の上を速く遊走する。本研究は、こういったADSCsの性質を活用し、脂肪組織からADSCsのみを選択的に遊走させて、これを迅速に抽出・培養できるマイクロパターン基材（セルマイグレーションセパレーター）を開発した。ストライプ状のパターン構造を有するセルマイグレーションセパレーターは、脂肪組織片を播種するだけで迅速に大量のADSCsを抽出・培養できる画期的なマイクロパターン基材である。この技術は、癌化のリスクの低い安全なiPS細胞の抽出・培養をはじめ、様々な細胞の抽出・培養に応用可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、安全で良質な細胞を迅速に大量生産できるシンプルなシステムを開発した。本システムはシンプルゆえに汎用性の高いシステムになる可能性を秘めており、ADSCsやiPS細胞だけでなく、様々な組織に含まれる細胞の抽出・培養や、疾患組織の細胞診断などにも応用可能である。そのため、医療産業への波及効果は非常に大きく、巨大な市場を新規開拓できると考えている。また、本システムは、遊走能の異なる細胞を的確に分離同定することが可能であることから、遊走能の異なる細胞の多様な細胞機能を厳密に評価するような基礎研究用のツールとしても有望だと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Adipose derived stem cells (ADSCs) migrate on a micro patterned substrate quickly rather than other cells contained in adipose tissue. In this study, we developed the micro patterned substrate (Cell Migrating Separator) which can extract and cultivate ADSCs quickly from adipose tissue by using the character of ADSCs. The Cell Migrating Separator, which has a striped pattern structure, is an innovative micropatterned substrate that can rapidly extract and culture large amounts of ADSCs simply by seeding adipose tissue slices. This technology can be applied to extracting and culturing a variety of cells, including the safe extraction and culturing of iPS cells with a low risk of canceration.

研究分野：生物物理、再生医工学、物理化学、高分子化学

キーワード：脂肪幹細胞 マイクロパターン 大量培養 幹細胞抽出 細胞遊走 iPS細胞 体性幹細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

脂肪幹細胞（ADSCs）を用いた再生治療は大いに注目されている。ADSCs の注入による乳房の再建や、難治性の創傷治癒などが良く知られている。現在のADSCsによる再生治療は、患者さん自身から採取された脂肪組織を酵素処理し、ADSCs を抽出・培養した後に脂肪組織と一緒に患部に注入するのが主流である。しかし、この方法は二つの問題点を抱えている。一つ目は、ADSCs の抽出・培養の過程で再生治療に使用される**ADSCsの品質が低下**する恐れがあることである。従来法では、ADSCs を抽出・培養するのに、遠心分離や酵素処理を何度も繰り返す必要があるが、このような遠心分離や酵素処理による強い刺激は、ADSCs の品質の低下を招く可能性が高い。ここで言うADSCs の品質とは、その増殖能や分能、代謝能、純度の高さのことである。二つ目は、患部に移植投与される **ADSCs の密度が低い**ことである。ADSCs を患部全体にまんべんなく行き渡らせるために、ADSCs を脂肪組織と混ぜて体積を稼ぎ、これを患部に注入する従来の再生治療は、患部に届けられる ADSCs の密度がかなり低くなってしまふ。脂肪組織の体積の95%以上が脂肪細胞だからである。そのため、ADSCs による治療効果を疑問視する研究者も多い。そこで我々は、マイクロパターン基材を用いて品質の高い ADSCs を迅速かつ大量に抽出・培養し、品質の良いADSCs のみによる効果的な再生治療を行いたいと考えた。ADSCs による再生治療効果を向上させ、一般的な治療法として広く認められるためには、**高品質な ADSCs を迅速に大量生産する技術**の開発が急務である。

2. 研究の目的

本研究は、マイクロパターン基材を用いて脂肪組織から高品質の ADSCs を選択的に抽出・培養し、これを**迅速に大量生産する新技術**を提案するものである。この新技術は、ADSCs がマイクロパターン基材のストライプ状の溝構造に沿って速く遊走する性質を利用し、遠心分離や酵素処理を一切用いないでADSCs の抽出・培養を行う画期的なものである。我々は、この新技術により、ADSCs をダメージレスに抽出・培養でき、その品質を向上させられると考えた。更に、マイクロパターン基材上での ADSCs の接触阻害の発生頻度の低減も期待できることから、増殖速度の向上にも繋がると考えた。本研究は、ストライプ状の溝が掘られたマイクロパターン基材（セルマイグレーションセパレーター）の構造を最適化し、採取された脂肪組織から高品質のADSCs を遊走させて取り出すことを目標とした。将来的には、高品質のADSCs を迅速に大量生産することで、ADSCs による再生治療効果を高め、より多くの患者さんが気軽に受けられる治療として普及させたいと考えている。

3. 研究の方法

多くの研究者たちが、マイクロパターン基材に注目し、これを細胞の足場として活用する研究を実施している。我々は、これまでにストライプ状の溝が掘られたマイクロパターン基材（セルマイグレーションセパレーター）の上でADSCs を始めとする様々な細胞を抽出・培養し、セルマイグレーションセパレーターの**ストライプ構造を最適化**してきた。同時に、これらの細胞がセルマイグレーションセパレーター上で発現する興味深い性質も見いだしている。ADSCs がセルマイグレーションセパレーターのストライプ構造に沿って遊走し、他の細胞よりも速く、遠くまで遊走することなどである。本研究は、こういったADSCs の性質を活用し、セルマイグレーションセパレーターに播種された脂肪組織からADSCs のみを選択的に遊走させて抽出・培養し、迅速に大量生産する新技術を開発した。このセルマイグレーションセパレーターは、一枚の基材上にストライプ状の溝が掘られたもので、そのストライプ状の溝の構造や配向、配置に特徴がある。

本研究では、まず、患者さんから提供されたヒト脂肪組織をセルマイグレーションセパレーター上に載せて抽出・培養し、その抽出・培養条件を最適化した。本研究でのヒト脂肪組織の使用については、琉球大学人を対象とする生命科学・医学系研究倫理審査委員会承認されている（承認番号:860）。次に、セルマイグレーションセパレーターが、脂肪組織に含まれるADSCs の**遊走速度を向上**や**増殖速度を向上**、**品質の向上**に寄与することを確認した。以上を着実に実施することで、脂肪組織から**高品質の ADSCs を迅速かつ大量に抽出・培養する新技術**を開発した。

4. 研究成果

本研究において新規に開発されたマイクロパターン基材（セルマイグレーションセパレーター）について紹介する。セルマイグレーションセパレーターの**形状と機能**および**再生治療用の培養基材として使用する方法**に

新規性と独創性があり、以下に説明する。

【**形状と機能**】我々は、再生治療用の ADSCs を脂肪組織から抽出・培養して迅速に大量生産する新しい技術を開発した。まず、この技術の中核を担う 2 cm 角のマイクロパターン基材（セルマイグレーティングセパレーター）を作製した。セルマイグレーティングセパレーターという名称は、その用途にちなんだものである。このセルマイグレーティングセパレーターは 1 mm の厚さのシリコンウェハ上に、フォトリソグラフィ技術を用いて精緻なパターン形状を掘られたものである。このセルマイグレーティングセパレーターには、中央に脂肪組織を播種される正方形のエリア（7000 μm $\times$ 7000 μm ）があり、そのエリアから基材の四辺に対して垂直に伸びたストライプ状の構造（深さ 10 μm 、幅 10 μm 、間隔 10 μm 、長さ 6500 μm ）がある（**図 1**）。現在、セルマイグレーティングセパレーターは**図 1** のような正方形であるが、中心から外縁部に向けて放射状の連続構造があればどのような形であっても機能すると考えられる。

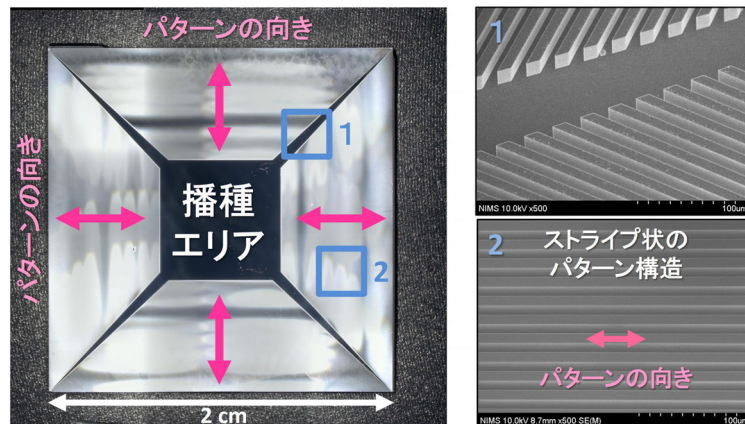


図 1 セルマイグレーティングセパレーターの概観

次に、このセルマイグレーティングセパレーターをシャーレ上に置かれたヒト脂肪組織に被せ、脂肪組織から基材上に遊走して出てくる ADSCs を観察した。その結果、脂肪組織から遊走して出てくる ADSCs は、培養 12 h から存在し、培養 72 h でも多数存在することが分かった。また、セルマイグレーティングセパレーターの中央の播種エリアに脂肪組織がくるようにして 15 日間抽出・培養したところ、脂肪組織の中から ADSCs がストライプ状のパターン構造に沿って積極的に這い出し、セルマイグレーティングセパレーターの四辺、即ち外縁に向かって **2～5 mm もの長距離を活発に増殖しながら遊走**する様子が確認された。このとき、セルマイグレーティングセパレーターの外縁に ADSCs を大量に集積させることに成功している（**図 2**）。更に、遊走距離に応じて、サイズや形態、細胞骨格構造の異なる ADSCs が分布する興味深い結果も得られた。一方、セルマイグレーティングセパレーターと同じサイズの FLAT な基材を脂肪組織にかぶせて、同様に抽出・培養したものは、ADSCs を遠くまで遊走させることができなかった。セルマイグレーティングセパレーターの持つ特徴的なストライプ状の溝の構造や配向、配置が、ADSCs の抽出・培養に重要であることは間違いない。以上の結果より、**セルマイグレーティングセパレーターの持つ優れた抽出・培養能**が明らかとなった。

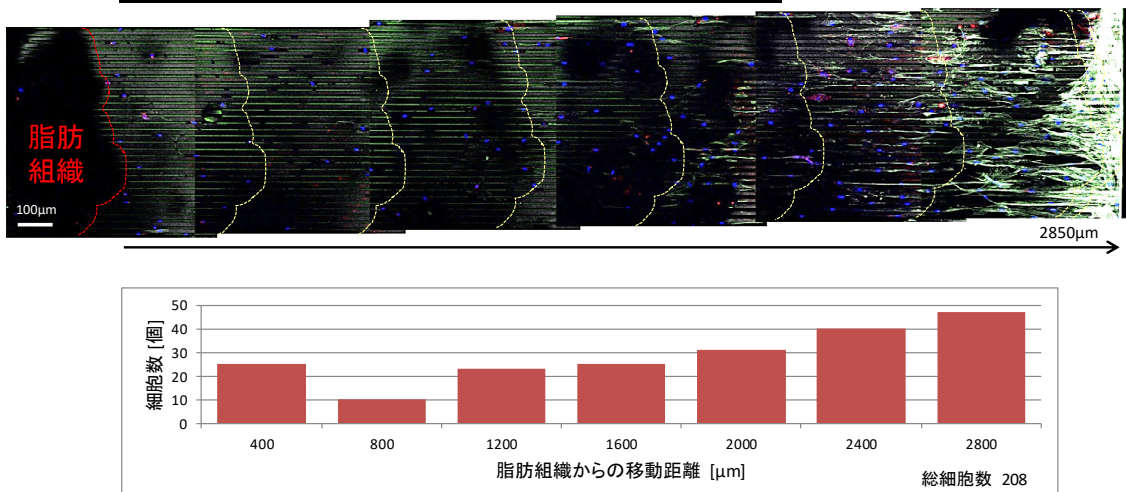


図 2 セルマイグレーティングセパレーターによる ADSCs の抽出・培養

このような研究を実施し、我々は、再生治療用の ADSCs を迅速かつ大量に抽出・培養できるセルマイグレーションセパレーターを開発した。このセルマイグレーションセパレーターは、コストのかかる酵素処理や継代などを一切必要とせず、脂肪組織から ADSCs を抽出・培養できるため、**再生医療の低コスト化**にも繋がると大いに期待されている。

【再生治療用の培養基材として使用する方法】 ADSCs を用いた再生治療では、細胞が酵素処理などのダメージを繰り返し受けて、安全性や品質が低下することが指摘されている。再生治療をより効果的なものにするためには、このようなダメージを低減し、安全で良質な ADSCs を生産する技術が必要である。そこで、我々は酵素処理を一切必要としない培養基材（セルマイグレーションセパレーター）を考案した。このセルマイグレーションセパレーターを、再生治療用のより優れた培養基材とするために、これに播種された組織に荷重をかけることを検討した。そうしたことで、播種された組織とセルマイグレーションセパレーターの密着性を向上させ、細胞の抽出・培養効率を向上させることに成功した。また、NIPAM を用いた、細胞の剥離回収技術を検討中である。NIPAM を用いた剥離回収技術とは、セルマイグレーションセパレーターの外縁部のみ NIPAM をコートし、外縁部まで遊走してきた細胞を NIPAM の温度応答特性を利用して剥離させるものである。この技術を用いれば、組織の採取から細胞の回収までの酵素処理が一切不要となるため（現在は、最終的な細胞回収時のみ必要）、安全で良質な細胞を低コストで生産できるようになると考えている。更に、我々はセルマイグレーションセパレーターの用途や状況に応じた使い分けを検討した。それを以下の (a) ～ (c) に紹介する。

- (a) **セルマイグレーションセパレーターを一枚のみで使用する場合：** これは小規模の細胞の抽出・培養や細胞診断などに利用される。細胞の抽出・培養の過程は、接着・遊走・増殖・剥離という流れである。まず、セルマイグレーションセパレーターの中心に細胞や組織を配置（播種）し、これらを接着させる。このとき、セルマイグレーションセパレーターの**上にこれらを載せる形**でも、**下にこれらを敷く形**でもかまわない。ただし、培地中に浮きやすい細胞や組織はセルマイグレーションセパレーターの下に敷く形が有効である。セルマイグレーションセパレーターの下に敷く場合は、抽出・培養を行う容器の表面が細胞非接着性であることが望ましい。細胞非接着性の表面を持つ容器とは、例えば pMPC や pHEMA をコートしたシャーレなどである。こういった細胞非接着性の容器を用いる理由は、セルマイグレーションセパレーター以外に接着する細胞を減らし、セルマイグレーションセパレーターの持つ細胞の抽出・培養の効率をできる限り高めるためである。なお、このようにしてセルマイグレーションセパレーターの下に細胞や組織を敷く形で細胞の抽出・培養を行う場合、フレッシュな培地の供給方向がマイクロパターンの連続する方向に限定されるため、**ケモタキシスによる細胞の抽出・培養効率を高める効果**も期待できる。
- (b) **セルマイグレーションセパレーター二枚で細胞や組織を挟んで使用する場合：** この場合は、細胞非接着性のシャーレなどを利用しなくても、セルマイグレーションセパレーターに十分に細胞を接着させることができる。一枚のセルマイグレーションセパレーターの場合よりも、**抽出・培養の効果が高まると期待**される。ケモタキシスによる抽出・培養効率の向上も、一枚のセルマイグレーションセパレーターの場合よりも高まる可能性がある。
- (c) **三枚以上のセルマイグレーションセパレーターを積層化して使用する場合：** この場合は、セルマイグレーションセパレーターの両面にマイクロパターンを作製することになる。積層化する枚数が多いほど、同時に多量の細胞の抽出・培養を行えるため、スケールアップと省スペースをはかる場合に効果的である。問題は、積層化されたセルマイグレーションセパレーター間の中心付近に、如何に手間をかけずに細胞や組織を配置（播種）するかである。この点に関しては、積層化されたセルマイグレーションセパレーターの中心部分貫く管を用意し、その管から各層に同時に細胞や組織を注入するシンプルな仕組みを考案している。このように積層化して使用する場合は、カラム状のデバイスになる見込みである。**積層化によって細胞の生産能力が飛躍的に向上**するので、拡大する再生医療現場の需要に応えられるのではないかと期待している。

(a) ～ (c) のいずれの培養方法においても、脂肪組織から ADSCs を抽出・培養する際にコラゲナーゼを必要とせず、ADSCs を継代培養する際にもトリプシンを必要としない。そのため、安全で高品質な再生治療用の ADSCs を低コストで得ることができる。

また、本研究で開発されたセルマイグレーションセパレーターは、分化誘導された iPS 細胞の集団から、十分に分化した安全な細胞を選択して抽出・培養することにも利用できる。これには、未分化で癌化リスクの高い iPS 細胞がほとんど遊走しないという性質を利用している。分化誘導された iPS 細胞の集団をセルマイグレーションセパレーターの中心に置き、十分に分化して遊走能を獲得した細胞のみを外側に遊走させて抽出・培養するのである。この技術を用いれば、癌化のリスクの高い未分化の iPS 細胞を低コストで除去できると考えられる。もちろん、分化誘導された様々な体性幹細胞や ES 細胞から目的の細胞のみを抽出・培養することにも利用可能である。

以上で述べたように、本研究で開発されたセルマイグレーションセパレーターとそれを用いた抽出・培養技術は、非常にシンプルなシステムである。我々は、このシンプルなシステムを用いて安全で良質な細胞を迅速かつ大量に生産することに成功した。このシステムは、シンプルゆえに汎用性の高い技術になる可能性を秘めている。上述の ADSCs や iPS 細胞、ES 細胞だけでなく、**様々な組織に含まれる細胞の抽出・培養、疾患組織の細胞診断**などにも応用可能である。医療産業への将来的な波及効果は大きく、巨大な市場を新規開拓できると考えている。また、セルマイグレーションセパレーターは、遊走能の異なる細胞を的確に分離同定することもできるため、遊走能の異なる細胞の機能を厳密に評価するような基礎研究用のツールとしても有望である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- ① Sunami H, Shimizu Y, Futenma N, Denda J, Nakasone H, Yokota S, Kishimoto H, Makita M, Nishikawa Y, Rapid Stem Cell Extraction and Culture Device for Regenerative Therapy Using Biodegradable Nonwoven Fabrics with Strongly Oriented Fiber, **Advanced Materials Interfaces**, Volume 9, Issue 16, e2101776, 2022. (査読あり) DOI: 10.1002/admi.202101776
- ② 角南寛, 細胞の遊走方向をコントロールする足場の形, **生物物理**, Vol. 62 No. 1, 62-65, 2022. (査読あり) DOI: 10.2142/biophys.62.62
- ③ Hiroshi Sunami, Yusuke Shimizu, Junko Denda, Ikuko Yokota, Hidehiro Kishimoto, Yasuyuki Igarashi, A 3D Microfabricated Scaffold System for Unidirectional Cell Migration, **Advanced Biosystems**, 4(10), e2000113, 2020. (査読あり) DOI: 10.1002/adbi.202000113
- ④ Edward H. Ntege, Hiroshi Sunami, Yusuke Shimizu, Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions, **Regenerative Therapy**, 14, 136-153, 2020. (査読あり) DOI: 10.1016/j.reth.2020.01.004
- ⑤ 角南 寛, 清水 雄介, 普天間 直子, 牧田 昌士, 大阪 直也, 西川 靖俊, 組織再生を促進する幹細胞抽出培養シートの開発, **BIO INDUSTRY**, Vol.36, No.10, 38-47, 2019.
- ⑥ 野村 紘史, 清水 雄介, 友利 新, 角南 寛, 脂肪組織由来幹細胞培養上清のスキンケア製品への応用, **BIO INDUSTRY**, Vol.36, No.1, 57-64, 2019.
- ⑦ Sunami H, Shimizu Y, Denda J, Yokota I, Yoshizawa T, Uechi Y, Nakasone H, Igarashi Y, Kishimoto H, Matsushita M, Modulation of surface stiffness and cell patterning on polymer films using micropatterns, **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, 106(3), 2018, 976-985. (査読あり) DOI: 10.1002/jbm.b.33905
- ⑧ 角南 寛, 清水 雄介, 横田 育子, 五十嵐 靖之, 岸本 英博, 松下 正之, 微細加工シリコンウエハ上での生細胞遊走観察, **表面科学**, 38 巻, 9 号, 2017, 473-478. (査読あり) DOI: 10.1380/jsssj.38.473

〔学会発表〕(計 8 件)

- ① 角南 寛, 傳田 淳子, 清水 雄介, 普天間 直子, 與古田 沙耶香, 仲宗根 均, 栗原 沙織, 島袋 真人, 牧田 昌士, 大坂 直也, 西川 靖俊, 脂肪幹細胞の軟骨分化を促進する足場基材の開発, 第18回日本再生医療学会総会, 2019年3月21日, 神戸国際会議場(神戸)
- ② 角南 寛, メカニカルな刺激を用いた脂肪幹細胞の機能制御と再生治療への応用, 3th tech pitch, 2018年12月10日, 沖縄産業支援センター(那覇)
- ③ H. SUNAMI, Y. SHIMIZU, Y. IGARASHI, T. Tabei, S. YOKOYAMA, H. KISHIMOTO, M. MATSUSHITA, H. ISHIDA, Control of cellular functions using micro-patterned

scaffolds, The 2nd International Symposium on Biomedical Engineering, 2017年11月9日, Tokyo Institute of Technology (Tokyo, Japan)

- ④ H. SUNAMI, Y. SHIMIZU, J. DENDA, I. YOKOTA, Y. IGARASHI, H. KISHIMOTO, M. MATSUSHITA, H. ISHIDA, Modulation of stiffness and cell patterning using micropatterned films, 2017 Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society- Asia Pacific Meeting (TERMIS-AP), 2017年9月21日, Jinshi International Hotel (Nantong, China)
- ⑤ Hiroshi SUNAMI, Yusuke SHIMIZU, Yasuyuki IGARASHI, Hidehiro KISHIMOTO, Masayuki MATSUSHITA, Development of a new scaffold technology for regenerative therapy, 2017 INTERNATIONAL BIOMEDICAL INTERFACE SYMPOSIUM, 2017年03月05日, Taipei Medical University (Taipei, Taiwan)
- ⑥ Hiroshi SUNAMI, Junko DENDA, Ikuko YOKOTA, Yukiko UECHI, Hitoshi NAKASONE, Tomokazu YOSHIKAWA, Yasuyuki IGARASHI, Yusuke SHIMIZU, Modulation of surface elasticity and cell patterning on polymer films by using micropatterns, 3rd International Conference on BioTribology (ICoBT), 2016年09月11日, Imperial college (London, UK)
- ⑦ Hiroshi SUNAMI, Junko DENDA, Ikuko YOKOTA, Hitoshi NAKASONE, Yasuyuki IGARASHI, Ryogo KUBA, Yusuke SHIMIZU, Development of a new cell separation method using micropatterns, 2016 Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society- Asia Pacific Meeting (TERMIS-AP), 2016年09月05日, Fullon hotel Tamsui (Taipei, Taiwan)
- ⑧ 角南 寛, 安全で良質な再生医療用細胞を大量生産する培養容器の開発, 第5回TOBIRA研究交流フォーラム, 2016年05月23日, 御茶ノ水ソラシティカンファレンスセンター (東京都千代田区)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

- ①【名称】: コラグナーゼを用いないで脂肪組織由来幹細胞を分離抽出するための方法、及び脂肪由来幹細胞分離抽出用キット 【発明者】: 角南 寛, 清水 雄介, 普天間 直子, 牧田 昌士, 大坂 直也, 西川 靖俊 【権利者】: 琉球大学/オルソリパース 【種類】: 特許 【番号】: PCT/JP2019/007472 【出願年】: 2019/2/27 【国内外の別】: 国外
- ②【名称】: 再生医療用細胞の生産および評価、機能調節する培養基材とその使用方法 【発明者】: 角南 寛, 傳田 淳子, 清水 雄介 【権利者】: 琉球大学 【種類】: 特許 【番号】: 特願 2023-174331 【出願年】: 2023/10/6 【国内外の別】: 国内

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 村上 明一

ローマ字氏名: (MURAKAMI, Akikazu)

所属研究機関名: 琉球大学

部局名: 大学院医学研究科 職名: 助教 研究者番号: 00733635

研究分担者氏名: 石田 昌義

ローマ字氏名: (ISHIDA, Masayoshi)

所属研究機関名: 近畿大学

部局名: 医学部 職名: 助教 研究者番号: 50643251

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 傳田 淳子

ローマ字氏名: (DENDA, Junko)

所属研究機関名: 琉球大学

部局名: 医学部 職名: 特命一般職員

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。