

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20327

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞の機能解明と培養細胞シートの開発

研究課題名(英文) Functional analysis of adipose-derived stem cells and its application to cultured epidermal sheets

研究代表者

飯田 秀雄 (Iida, Hideo)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：30751078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来幹細胞をIV型コラーゲン上で皮膚線維芽細胞と共培養し、オールトランスレチノイン酸と骨形成因子4で刺激し、さらに表皮角化細胞用培地で単独培養することで、ケラチン10の発現率で評価すると約45%が表皮角化細胞様細胞に分化誘導された。I型コラーゲンゲルに皮膚線維芽細胞を包埋培養し、表面をIV型コラーゲンにて被覆し、表皮角化細胞様細胞に分化誘導した脂肪組織由来幹細胞を播種して培養後、培地を除去して細胞を空気暴露して細胞の重層化を誘導した。しかし、強度的に実用に耐える培養表皮シートの実現は不可能であった。適切な足場の工夫が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived stem cells were co-cultured with dermal fibroblasts on type IV collagen in Dulbecco's modified Eagle's medium containing all-trans retinoic acid (ATRA) and bone morphogenetic protein 4 (BMP4). Next, the cells were co-cultured with dermal fibroblasts in keratinocyte serum-free medium (KFSM) lacking ATRA and BMP4, followed by culturing in KFSM on type IV collagen in the absence of other cells. Approximately, 80% of these differentiated cells stained positive for keratin 10, although undifferentiated cells did not. It was thought that 45% of these cells differentiated into keratinocyte-like cells. These differentiated cells were seeded, cultured, and lifted to the air-liquid interface, on fibroblasts-embedded type I collagen gel covered with type IV collagen. However, it was impossible to prepare a 3D culture cell sheet with sufficient strengths for clinical application. It was necessary to develop appropriate scaffolds.

研究分野：再生医学

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 表皮角化細胞 培養表皮シート ケラチン コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

成体幹細胞は、胚性幹細胞や人工多能性幹細胞と比較して、その利用に際して倫理的な問題が少なく、細胞の作成に遺伝子操作を要さないことから安全性が高いと考えられている。成体幹細胞の中でも間葉系幹細胞、とりわけ脂肪組織由来幹細胞は、骨髄や胎盤、血液中の間葉系幹細胞と比べても採取が比較的容易であり、再生医療における今後の臨床応用が期待されている。

脂肪組織由来幹細胞は、脂肪組織内の血管周囲に存在し、線維芽細胞様の形態をとり、多分化能を有する細胞である。本細胞は脂肪細胞のほか骨、軟骨細胞などに分化することが知られているが、近年、表皮角化細胞への分化能を有することも明らかになっている。

一方、主に広範囲熱傷時に用いる移植皮膚として、培養表皮シートがすでに臨床応用されている。培養表皮シートは同種(他家)培養表皮シートと自家培養表皮シートに大別され、前者は約1か月間で異物として排除されるために長期的な生着は困難であり、体液漏出を防ぐなどの一時的な被覆目的で用いられる。一方で、後者は永久生着が可能なものの、必要が生じてから作成するために、作成開始から移植が可能となるまでに長時間を要することが欠点である。

脂肪組織由来幹細胞は抗原性が低く、それ自体に免疫抑制能を有することから、安全性の担保された脂肪組織由来幹細胞を表皮角化細胞に分化誘導し、その細胞を用いた同種培養表皮シートの作成が実現すれば、あらかじめこれを作成して冷凍保存しておき、災害時などに応用し、また長期的な生着も期待出来ると考えられた。

2. 研究の目的

脂肪組織由来幹細胞を用いた培養表皮シートを開発するために、生体内における脂肪組織由来幹細胞の上皮転換メカニズムを解明して、脂肪組織由来幹細胞を効率よく表皮角化細胞に

分化誘導することを実現する。また、適切な足場を用いることで、脂肪組織由来幹細胞を用いた培養表皮シートの作成を実現する。以上が本研究の当初の目的であった。

3. 研究の方法

- (1) 微生物試験を実施されて各種感染性微生物が陰性の、ヒト皮下脂肪吸引物より単離された脂肪組織由来幹細胞初代細胞を用いて、これらにおけるデスマグレイン 3、ケラチン 5、ケラチン 14、p63 など各種表皮角化細胞マーカーの局在を、蛍光免疫染色やフローサイトメトリー、リアルタイム PCR、ウェスタンブロットなどの手法で確認した。
- (2) 脂肪組織由来幹細胞を、表皮基底膜構成成分である IV 型コラーゲン上で、トランスウエルを用いて皮膚線維芽細胞と分離抽出が可能な状態で共培養し、オールトランスレチノイン酸 (all-trans retinoic acid: ATRA) と骨形成因子 4 (bone morphogenetic protein4: BMP4) で刺激し、その後これらの刺激因子を含む培地を除去して、これらの刺激因子を含まない表皮角化細胞用培地で培養した。さらに皮膚線維芽細胞を取り除いて、表皮角化細胞用培地で脂肪組織由来幹細胞を単独培養した。以上の分化誘導法の前後におけるケラチン 5、ケラチン 10、ケラチン 14 などの各種表皮角化細胞マーカーの発現の程度を、蛍光免疫染色を中心に各手法にて評価した。
- (3) MEM 培地を混じた I 型コラーゲンゲルに皮膚線維芽細胞を包埋培養し、続いて表面を IV 型コラーゲンにてコーティングし、その表面に前述の操作で表皮角化細胞様細胞に分化誘導した脂肪組織由来幹細胞を播種して培養後、培地を除去して細胞を空気暴露して細胞の重層化を誘導し、培養表皮シートの作成を試みた。
- (4) 免疫抑制マウス背部皮膚に鉋刃にて径 1cm の皮膚欠損創を作成し、同部に脂肪組織

由来幹細胞を用いた培養表皮シートを移植し、非移植群と創傷治癒の速度を比較することを計画した。

- (5) 磁気細胞分離装置を用いて、デスモグレイ ン 3 など各種の発現マーカーによる細胞の分離培養をおこなう。これらの細胞を前述の操作で表皮角化細胞に分化誘導し、その分化誘導率を、各種表皮細胞マーカーの蛍光免疫染色を用いて評価することを計画した。
- (6) ボイデンチャンバー法を用いて、脂肪組織由来幹細胞が有孔膜を通過することにより、細胞の遊走能を評価することを計画した。

4. 研究成果

- (1) 未分化な脂肪組織由来幹細胞は、表皮角化細胞マーカーであるデスモグレイ ン 3、ケラチン 14、p63 を発現していることを、蛍光免疫染色、フローサイトメトリーで確認した。(図1) また、脂肪組織由来幹細胞を脂肪細胞に分化誘導すると、これらの表皮細胞マーカーの発現が低下することを、リアルタイム PCR、ウェスタンブロット、蛍光免疫染色で確認した。

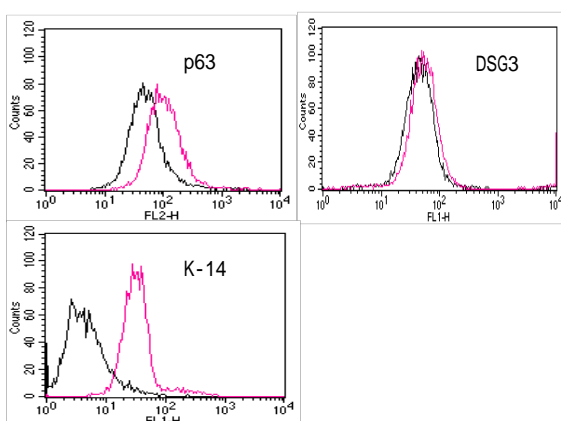


図1 未分化な脂肪組織由来幹細胞における表皮角化細胞マーカーの確認

- (2) IV 型コラーゲン上で線維芽細胞と共培養し、ATRA と BMP4 で刺激した後に表皮角化細胞

用培地で培養することで分化誘導した脂肪組織由来幹細胞は、未分化な状態と比べてデスモグレイ ン 3、ケラチン 5 が著増することを、リアルタイム PCR で確認した。(図2) また、蛍光免疫染色を用いて解析すると、未分化な脂肪組織由来幹細胞は殆ど発現していないケラチン 10 を、分化誘導後の細胞は 45%に発現していた。分化誘導後のケラチン 10 の発現上昇は、フローサイトメトリーとリアルタイム PCR によっても確認された。以上より、本分化誘導法によって約半分の脂肪組織由来幹細胞が表皮角化細胞様細胞に分化誘導されたと判断した。この結果は、幹細胞から他の系統の細胞への分化誘導の結果としては、非常に高いものと考ええる。

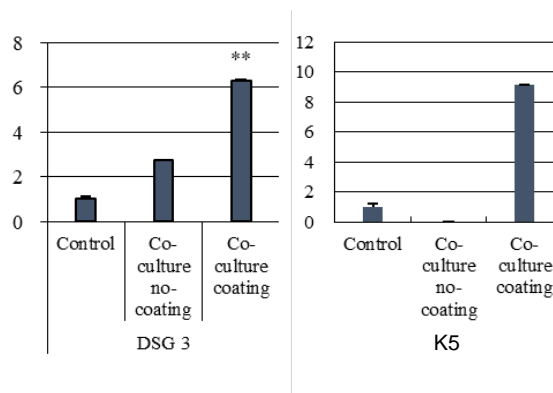


図2 デスモグレイ ン 3 とケラチン5の発現上昇

それぞれ左より、未分化な細胞、type IV コーティング無し、type IV コーティング有

- (3) I 型コラーゲンゲルに皮膚線維芽細胞を包埋培養し、表面を IV 型コラーゲンにて被覆し、本分化誘導法によって表皮角化細胞様細胞に分化誘導した脂肪組織由来幹細胞を播種して表皮角化細胞用培地で培養後、細胞の重層化を誘導した結果、2 週間の培養期間でコラーゲンゲルは融解傾向となり、細胞シートとしての採取は困難であった。断片的に得られたゲルを固定して HE 染色にて検討した結果、細胞の重層化は若干なが

ら認めたと (図3)、細胞シートとして臨床応用するためには、適切な足場 (scaffold) が必要であることが明らかになった。コラーゲンの下層に羊膜などの膜様物質を置いた結果も同様であった。このため、免疫抑制マウス背部に皮膚欠損創を作成し、同部に培養表皮シートを移植する実験は実現出来なかった。

- (4) 培養表皮シート移植実験の代替実験として、マウス背部皮膚欠損創に表皮角化細胞へと分化誘導した脂肪組織由来幹細胞を塗布し、創傷被覆剤にて被覆することによる創傷治癒実験をおこなったが、脂肪組織由来幹細胞投与群、非投与群ともに創は約 14 日間で上皮化し、その速度に有意差は得られなかった。潰瘍面の組織学的検討においても、表皮形成と肉芽組織形成に違いを認めなかった。現時点での反省点としては、全層皮膚欠損創では真皮深層の残存する多くの皮膚潰瘍を再現しているとは言えず、メスを用いて真皮深層を残した皮膚潰瘍を作成することは不可能であることから、今後は一定条件での熱傷を応用して皮膚潰瘍を作成すべきであると考えた。
- (5) 磁気細胞分離装置を用いて細胞の選別 (ソーティング) をおこない、特定の脂肪組織由来幹細胞を抽出して、さらに効率的に脂肪組織由来幹細胞を表皮角化細胞に分化誘導することを計画したが、細胞内に発現するマーカーによる抽出は不可能であることが判明した。また、細胞表面に発現し、本手法により細胞を抽出出来るマーカーのうち、表皮角化細胞への分化誘導に有利なものは無かった。
- (6) ボイデンチャンバー法による細胞遊走能の評価も試みたが、各種の孔サイズの膜を用いて実験においても、脂肪組織由来幹細胞の移動 (遊走) は見られなかった。この結果には、手技的な問題があった可能性があると考え、本研究期間における再検討は

不可能であった。

- (7) 以上より、脂肪組織由来幹細胞を用いた培養表皮シートの作成に向けた今後の課題としては、細胞の分化誘導法よりむしろ、例えば吸収性の不織布のようなものを用いる、あるいはコラーゲンにヒアルロン酸を混和するなど、培養表皮シートのための足場 (scaffold) の開発が必要であることが明らかになった。

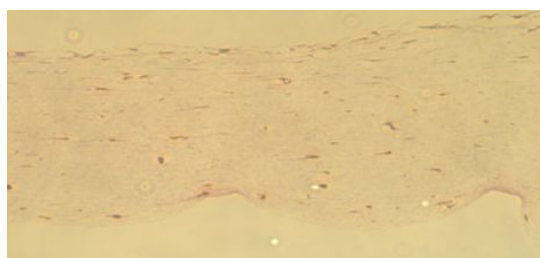


図3 重層化した細胞 (HE 染色)

コラーゲンの内側に表皮線維芽細胞、表層に脂肪組織由来幹細胞がみられる

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 2 件)

① Hasegawa T, Sakamoto A, Wada A, Fukai T, Iida H, Ikeda S: Keratinocyte progenitor cells reside in human subcutaneous adipose tissue. PLoS One 10: e0118402, 2015
DOI: 10.1371/journal.pone.0118402

② Maeda Y, Hasegawa T, Wada A, Fukai T, Iida H, Sakamoto A, Ikeda S: Adipose-derived stem cells express higher levels of type VII collagen under specific culture conditions. J Arch Dermatol Res 309:843-849, 2017 査読有り
DOI:10.1007/s00403-017-1781-9

(学会発表) (計 3 件)

① Iida H, Hasegawa T, Sakamoto A, Wada A, Fukai T, Ikeda S: Keratinocyte progenitor cells in human subcutaneous adipose tissue. The

Society for Investigative Dermatology 2015
Annual Meeting, 2015, Atlanta, GA

②前田 佑一郎, 長谷川 敏男, 飯田 秀雄, 坂
本 淳, 和田 章乃, 池田 志孝: 脂肪組織由来
幹細胞による表皮再生医療の可能性. 第 33 回
日本美容皮膚科学会総会・学術大会, 2015, 大
阪

金 宗訓, 長谷川 敏男, 前田 佑一郎, 和田
章乃, 飯田 秀雄, 小川 秀興, 池田 志孝. 脂
肪組織由来幹細胞を用いた皮膚再生医療の可
能性. 第 31 回表皮細胞研究会, 2017, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 秀雄 (IIDA, Hideo)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号: 3075107