

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19303

研究課題名(和文) 血液循環停止に起因する組織中の生理活性物質量の経時変化と法医診断への応用

研究課題名(英文) Changes with the time of the amount of physiologically active substance in the tissue: potential application to forensic diagnosis

研究代表者

齊藤 高志 (Saito, Takashi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：40764981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺体中の幹細胞は再生医療や法医診断に有用かもしれないが、その特性は不明な点が多い。脂肪由来間葉系幹細胞(脂肪幹細胞)は多分化能を持ち、また低酸素環境でも比較的長期間生存可能であることが報告されている。そこで、本研究ではヒト遺体中の脂肪幹細胞は採取、培養可能かどうかを確認することを目的とした。腋窩脂肪組織を法医解剖時に採取し、酵素処理を加えることで脂肪幹細胞を含む細胞群を単離した。この細胞を培養し、増殖させた後、特性解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Although postmortem stem cells may be useful for regenerative therapy and forensic diagnostics, their characteristic remain to be better understood. Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) have the capacity to differentiate through several cell lineages and are able to survive in an ischemic environment for a prolonged time. This study aimed to confirm whether human postmortem ASCs can be collected and culture-expanded from cadavers. Axilla subcutaneous adipose tissues were harvested during forensic autopsy and enzymatically digested to obtain a heterogeneous cell mixture, including the ASCs population. The mixture was seeded onto collagen-coated cell culture dishes and spindle-shaped adhesive and proliferative ASCs were confirmed. And then, the cultured cells were characterized.

研究分野：法医学

キーワード：法医診断 死後変化 経時変化 脂肪幹細胞 表面マーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 法医学解剖では、解剖時の肉眼所見、後日の組織学的検査及び生化学的検査などで得られた情報と、死亡前の情報を組み合わせ、遺体の死後経過時間の推定や死因究明を含めた法医学診断が行われている。しかしながら、死亡までの経緯が明確でない事例では法医学診断が困難な場合も少なくない。その結果、重大な犯罪や事故を見逃す恐れがある。診断方法を増やすことは法医学診断の精度をあげることにつながる。

(2) 脂肪由来間葉系幹細胞（脂肪幹細胞）は、脂肪組織を酵素で処理し、遠心分離することで大量採取可能な幹細胞である[1]。脂肪幹細胞の生体内での役割のひとつは、脂肪組織内で血管内皮細胞に分化したり、血管新生促進因子を分泌したりして血管新生に寄与することである。また、脂肪幹細胞は増殖が速く細胞活性も高いため、様々な疾患治療をはじめとした有望な幹細胞ソースと考えられており、基礎的研究、前臨床試験が進められている[2]。

(3) 本研究は、肉眼的に腐敗、外表損傷がない、または軽度である死体を対象とし、法医学解剖の通常の術式範囲内でアクセス可能で、かつ腐敗などの死後変化を受けにくい部位・組織として、まず腋窩から脂肪組織を採取する。そこから脂肪幹細胞を単離、培養し、培養した脂肪幹細胞の特性解析を行うことで死後経過時間の影響や死因との関連など法医学的に有用な指標を探索する。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は死後、血液循環停止に起因する組織、すなわち脂肪組織の中に存在する脂肪幹細胞の細胞活性の経時変化を法医学診断に応用できるようにすることである。

(2) 様々な遺体から採取した脂肪組織中に存在する脂肪幹細胞の培養が可能な条件を検討する。次に、培養した脂肪幹細胞の特性解析を行うことで死後経過時間の影響や死因との関連など法医学的に有用な指標を探索する。

3. 研究の方法

(1) 脂肪組織の採取

肉眼的に腐敗、外表損傷がない、または軽度である死体を対象とし、法医学解剖の通常の術式範囲内でアクセス可能で、かつ腐敗などの死後変化を受けにくい部位・組織として、腋窩脂肪組織を解剖時に採取した。

(2) 免疫組織化学染色

脂肪組織の一部を 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定し、凍結切片を作製した。BODIPY、Hoechst 33258、及び Rhodamine labeled Ulex Europaeus Agglutinin I、あるいは抗ヒト CD31、CD34、及び CD45 抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。

(3) 走査型電子顕微鏡観察

脂肪組織の一部を 1%グルタルアルデヒドで固定し、白金をスパッタコーティングした後、走査型電子顕微鏡を用いて脂肪組織の表面形態を観察した。

(4) 脂肪幹細胞培養

脂肪組織をハサミで細断した後、リペラーゼ酵素を加え、37℃で15分処理した。脂肪的を除去し、フィルターろ過することで、ヘテロな間質血管細胞群 (SVF) を得た。SVF に溶血処理を加えた後、10%FBS 含有 DMEM/F12 で培養し、継代数 2 (p=2) で凍結保存した。

(5) フローサイトメトリー解析

p=4 の細胞に、蛍光標識された抗ヒト CD13、CD31、CD34、CD45、CD90、CD105 及び CD146

抗体を用いて染色し、その発現量をフローサイトメトリーで評価した。

4. 研究成果

(1) 脂肪組織からの脂肪幹細胞採取

脂肪組織中から脂肪幹細胞を採取し、培養可能であった例を表1に示す。高齢者遺体からも脂肪幹細胞が培養できた。また、死後寒冷環境下に存置され続けた遺体からは死後約7日経過していても脂肪幹細胞が採取、培養可能であった。一方、死因が薬物多量摂取や、高BMI値 (BMI=45) を示す遺体では脂肪幹細胞が培養できなかった (データ記載なし)。

表1. 脂肪幹細胞が培養可能であった遺体

コード	性別	年齢	死後経過時間 (hr)	BMI	死亡時平均気温 ()
1	女	88	61	22.7	3.4
2	男	36	30	24.5	5.5
3	男	83	177	23.1	7.6
4	男	64	67	23.4	7.8
5	女	86	45	21.9	8.7
6	男	78	81	22.1	9.8
7	女	75	55	17.8	13.7
8	女	69	65	28.5	26
9	男	53	69	28.1	27.9

(2) 脂肪組織の形態学的観察

脂肪幹細胞が培養可能な組織は血管網の残存が観察された (図1A)。一方、脂肪幹細胞が培養できない組織は血管及び脂肪細胞の融解が観察された (図1B)。

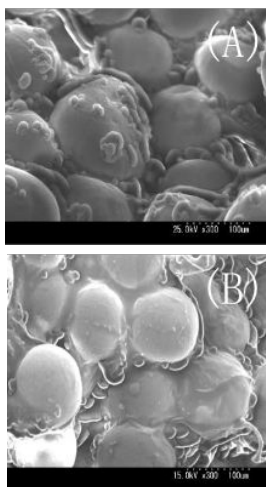


図1. 脂肪組織の表面観察

(3) 脂肪幹細胞の局在

CD31 陰性、CD34 陽性、かつ CD45 陰性脂肪幹細胞が脂肪細胞間に局在していた (図2)。この細胞は脂肪細胞間の血管周囲に局在していた (データ記載なし)。すなわち、生体から得られた脂肪組織中の脂肪幹細胞と同じ部位に脂肪幹細胞が局在することがわかった。

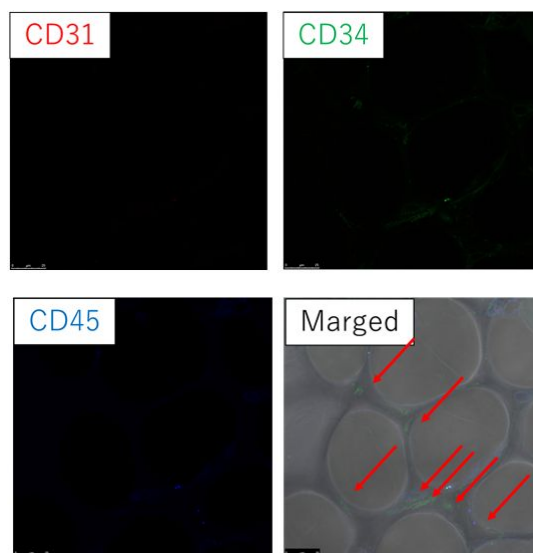


図2. 脂肪幹細胞の局在

(4) 脂肪幹細胞の表面マーカー解析

培養した脂肪幹細胞は CD13 陽性 (図3A)、CD31 陰性 (図3B)、CD90 陽性 (図3E) であった。組織中では CD34 陽性であった (図2) が、生体から採取した脂肪幹細胞は培養すると CD34 の発現量が減少し、CD105 の発現量が増加することが知られている。CD146 陽性脂肪幹細胞は老化した脂肪幹細胞であることが知られているが [3]、ほとんどの培養脂肪幹細胞からは確認されなかった (表2 サンプル 1、2、4)。生体由来の脂肪幹細胞と同様の細胞特性を持つことがわかった (表2)。

一方、培養細胞の CD34、CD105、及び CD146 の発現量には差が見られた (表2)。これらの表面マーカーは法医診断に応用可能かもしれない。

表2. 脂肪幹細胞の表面マーカー発現

Code	CD13	CD31	CD34	CD45	CD90	CD105	CD146
正コントロール	99.9	1.0	7.2	0.9	99.9	20.7	2.8
サンプル1	99.8	0.8	45.5	0.5	97.9	30.7	2.0
サンプル2	99.9	0.7	17.1	0.6	99.7	86.9	0.6
サンプル3	96.4	1.8	3.7	1.0	95.3	97.8	81.5
サンプル4	84.5	1.2	6.7	0.9	99.4	19.5	4.8

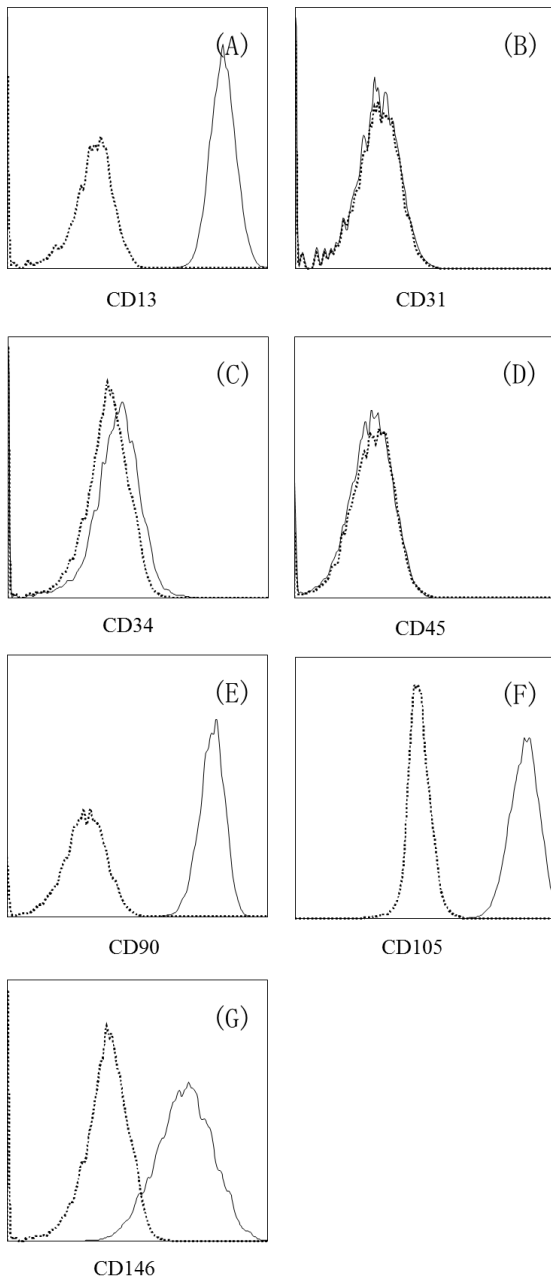


図3. 脂肪幹細胞の表面マーカー解析

(5) 結論

死後、組織中の細胞は生存時とは異なるシビアな栄養飢餓や低酸素等の刺激を受けるため、細胞の種類や体内の存在部位によっては短期間で細胞としての機能を失ったり、性質が変化したりする可能性がある。本研究で

は、約7日経過した遺体から脂肪幹細胞が採取できた。これらは生体と同じ局在を示し、表面マーカーの解析からは生体と同じ細胞であることが示唆された。すなわち、脂肪幹細胞は死後、比較的長期間体内で生存可能な幹細胞だといえる。また、生体と同じ幹細胞ではあるが、いくつかの表面マーカーの発現に差が見られた。本研究は遺体から得られた間葉系幹細胞の法医診断や再生医療への応用を目指した研究であり、さらに検体数を増やし、解析を続けることで幹細胞研究の発展に大きく貢献することに疑いはない。

引用文献

- [1] D.M. Minteer, K.G. Marra, J.P. Rubin, Adipose stem cells: biology, safety, regulation, and regenerative potential, *Clin. Plast. Surg.* 42(2) (2015) 169-79. 10.1016/j.cps.2014.12.007
- [2] L.E. Kokai, K. Marra, J.P. Rubin, Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration, *Transl Res* 163(4) (2014) 399-408. 10.1016/j.trsl.2013.11.009
- [3] K. Yoshimura, T. Shigeura, D. Matsumoto, T. Sato, Y. Takaki, E. Aiba-Kojima, K. Sato, K. Inoue, T. Nagase, I. Koshima, K. Gonda, Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates, *J. Cell. Physiol.* 208(1) (2006) 64-76.

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

Takashi Saito, Isolation and culture of adipose derived stem/stromal cells collected from post-mortem adipose tissue, International Society for Stem Cell Research, 2017

齊藤 高志、遺体から採取した腋窩脂肪組織に存在する脂肪幹細胞の培養、日本法医学会、2017

Takashi Saito, Adipose derived fibroblast-like cells adopt a reversible dormant state in the corpse, International Symposium Advances in Legal Medicine, 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等(なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 高志 (SAITO, Takashi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：40764981