

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791261

研究課題名（和文） 脂肪由来間葉系幹細胞を含む脂肪由来細胞

研究課題名（英文） Adipose-derived cells (adipose cell, mesenchymal stem cell)

研究代表者

井坂 珠子 (ISAKA TAMAMI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40318118

研究成果の概要（和文）：皮下脂肪組織から採取した脂肪由来間葉系幹細胞を含む脂肪由来細胞を用いて、再生医療に用いるために培養実験を行った。これらの細胞は、脂肪細胞、骨細胞へ分化可能であり、温度応答性培養皿を用いての細胞シートの回収が可能であった。作成した細胞シートを肺損傷部位へ移植を行い、肺胸膜の修復が機能的、組織的に有効であることが確認できた。自己細胞を用いた再生医療において、他臓器、他部位への移植の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： This study aimed to observe a cellular character and utility by using Adipose-derived cells. Adipose-derived cells were able to differentiate into mature adipose and bone. We demonstrated effective pleural defect was repaired using tissue engineered cell sheets harvested from temperature-responsive culture dishes. The possibility of the transplantation to other internal organs, other parts was suggested in the tissue engineering with autologous cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：皮下脂肪組織・脂肪由来間葉系幹細胞・細胞シート・移植

1. 研究開始当初の背景

疾患、外傷等により、欠損、損傷した臓器・組織は再建・修復が必要となるが、現行の治療法では臓器移植または人工臓器の利用とならざるをえないことも多い。しかし、臓器移植においてはドナー不足、免疫拒絶反応など解決すべき問題が多く、また人工臓器では、抗血栓性、生体親和性や、耐久性などの課題が残されている。このため、根治治療を可能にするものと期待される再生医療が大きな注目を集めている。再生医療に供する細胞ソースとして、組織幹細胞（体性幹細胞）やES細胞（胚性幹細胞）、iPS細胞（induced pluripotent stem cells）など様々な細胞が実験レベルでは検討されているが、現状では組織幹細胞や骨髄あるいは脂肪組織から採取した間葉系幹細胞が臨床研究では多く用いられている。特に、人間においては最大の組織であると考えられる脂肪組織から採取される脂肪由来間葉系幹細胞は、従来、様々な検討に供されてきた骨髄由来間葉系幹細胞ときわめて類似した性質を示す多能性幹細胞であることが報告されている。脂肪由来間葉系幹細胞を、骨、軟骨、脂肪、神経、血管内皮、線維芽細胞など様々な細胞へ分化させることができると報告されており、今後、臨床研究への応用が大きく期待されている。これまでに、自己脂肪組織と共に、間葉系幹細胞を含むと考えられる脂肪前駆細胞分画を乳房部分切除部位に移植し、脂肪細胞の効果的増殖にともなう乳房再建などの臨床研究報告も存在する。

申請者が研究活動を展開している東京女子医科大学先端生命医科学研究所では、温度応答性培養表面を活用した細胞シートの作製および、細胞シートをたくみに活用した組織の再建に関して、皮膚、角膜、食道、心臓で臨床応用を成功させており、他にも泌尿器、呼吸器外科、耳鼻科など様々な領域で、臨床応用を目的とした大形動物実験を展開している。本申請では、細胞シート工学を用いた再生医療の細胞ソースとして、脂肪由来間葉系幹細胞に着目し、再生医療に応用する可能性を検討する。

2. 研究の目的

本申請では皮下脂肪組織から採取した細胞を用いて、再生医療における、その細胞の特性、有用性を検討することを目的とする。(1) **細胞培養条件の検討**：脂肪由来間葉系幹細胞を含む細胞に培地組成、培養期間、分化方法等の確立、最適化を目指す。(2) **細胞シートの作成**：分離、分化した細胞を温度応答性培養表面上での培養に供し、移植手技に耐えうる培養細胞シートとして回収するための播種条件、培養条件等の最適化の検討。また回収した培養細胞シート中の細胞の特性や、組織学的検討。(3) **脂肪由来細胞シートの細胞成長因子分泌能の検討**：ラット皮下脂肪組織から単離した間葉系幹細胞幹細胞を含む脂肪前駆脂肪より分泌されることが期待されるVEGF（血管内皮増殖因子）、HGF（肝細胞増殖因子）、bFGF（塩基性線維芽細胞増殖因子）タンパク質発現について検討を行う。(4) **脂肪由来細胞シートの移植実験**：脂肪由来細胞を用いて作成した培養細胞シートを移植等に供し、組織再生能を検討する。組織再生能の関連に注目し、組織学的検討をおこなう。

3. 研究の方法

(1) **培養条件の検討**：実験動物（ラット）より皮下脂肪組織（鼠径部）を採取し、0.1%コラゲナーゼを用いて酵素処理を行い、細胞を単離し、35mm培養皿に 1×10^4 個/cm²で播種し、37度インキュベータにて7-10日間培養を行った。FBSを含むDMEM基本とし、インスリン添加、または、骨分化培地にて培養を行った。

(2) **細胞シートの作成**：分離、分化した細胞を35mm温度応答性培養皿にて培養を行い、細胞シートを作成し、それぞれの組織学的評価を行った。また、培養した細胞をFACS

（fluorescence activated cell sorting）を用いて細胞表面マーカー解析を行った。

(3) **細胞シートの細胞増殖因子分泌能の検討**：細胞増殖因子であるHGF FGF VEGFの測定を行った。脂肪由来間葉系幹細胞を含む脂肪由来細胞シート作成後、PBSにて培養液を洗浄、培養皿上に24時間留置し、培養液中のそれぞれのHGF EGF VEGFについて測定した。

(4) 脂肪由来細胞シートの移植実験：脂肪由来細胞を用いて作成した培養細胞シートを臓器損傷部位へ移植を行い、組織再生能の検討を行った。移植細胞を確認するためGFPラットから作成した細胞シートの移植を行った。①皮下移植モデルの作成。F344ヌードラットを全身麻酔（フォールン）にて麻酔を行い、背部の皮膚を切開、筋膜上で剥離を行い、作成した細胞シートを貼付し、移植を行った。②肺胸膜損傷モデルの作成。F344ヌードラットを全身麻酔、人工呼吸管理下、左開胸を行い、肺胸膜表面を約5mm円形に切開。気道内を加圧し、肺気漏を確認し、肺胸膜損傷モデルを作成した（図1A）。損傷気漏作成部位に脂肪組織から作成した細胞シート2枚を重ねて貼付、移植を行った（図1BC）。いずれも、2-4週間後に皮下組織摘出、肺組織を摘出し、肉眼的、組織学的検討を行った。

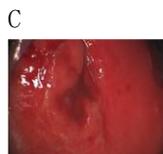
図1-A



肺気漏作成モデル



B



C

肺胸膜損傷部位への細胞シート貼付

4. 研究成果

(1) 細胞培養条件の検討

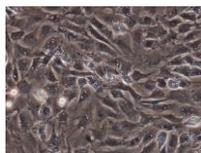
①ラット皮下脂肪組織から採取した脂肪由来間葉系幹細胞を含む細胞を、2%FBS、10%FBS、15%FBS 添加 DMEM 培養液下で培養を行った。10%、15%FBS 添加 DMEM 下では7日目にコンフルエントとなったが、2%FBS 下では細胞増殖が悪く、7日以上かかった。（図2）

図2 位相差顕微鏡所見

10%FBS 培養下での7日目



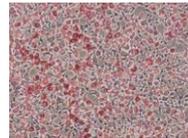
×40



×100

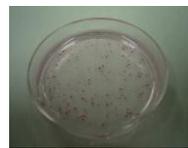
②insulin 添加 DMEM 培養下では細胞培養は、脂肪滴（oil red O 染色にて染色される）を有した細胞に分化した（図3A）。骨分化培養培地による培養細胞はアリザリンレッドに染色され、骨細胞の分化が確認できた（図3B）。以上より皮下脂肪組織内の間葉系幹細胞を有していることが確認できた。

図3A



×40 (oil red O 染色)

図3B



(Alizarin red 染色)

(2) 細胞シートの作成：上記の培養条件検討より10%FBS 添加 DMEM での培養が適性と判断し培養を行った。温度応答性培養皿上で、培養後、7日から10日目に、低温処理により細胞シートの回収が可能であった（図4）。脂肪分化を行った細胞では脂肪滴を含んだ細胞シートの回収が可能であった。採取した細胞を FACS（fluorescence activated cell sorting）を用いて細胞表面マーカー解析を行った。組織採取直後の単離した細胞解析では血球成分が残っているためと考えられる、CD34, 45 陽性の細胞が多く認められたが、CD31, CD146, CD105 陽性も少量ではあるが、存在した。さらに、シート作成時と同様に10日培養した細胞についても FACS 解析を行った。幹細胞系で発現されている CD90 は 79.16%、CD29 は 92.5%と多く認められ、CD45 は 5.92%と低下を認め、CD31 は 2.66%であった。培養を行った細胞内には幹細胞成分も含まれることが確認できた。

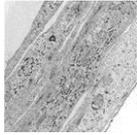
図 4

シート位相差顕微鏡所見



Vimentin

シート走査電子顕微鏡所見



(3) 細胞シートの細胞増殖因子分泌能の検討:

細胞増殖因子である HGF FGF VEGF の測定を行った。培養液中のそれぞれの HGF EGF VEGF について測定を行ったが、結果として有意に検出されなかった。

(4) 脂肪由来細胞シートの移植実験:

- ①皮下移植実験 移植部位を青色光で観察し、組織への移植が確認できた。組織学的所見においては、皮下移植部位に脂肪細胞 (oil red O 染色にて脂肪滴を染色) を伴った組織を認め、同部位には小血管の新生を認めた。
- ②肺胸膜損傷モデルでの実験。移植後、組織摘出まで、ラットの感染兆候、呼吸困難、出血などの合併症は認められなかった。2-4 週間後に再開胸を行い、胸腔内を観察したところ、いずれも胸腔内の肺、胸壁との癒着を認めなかった。青色光下では、胸膜損傷部位への細胞シートの生着が確認できた (図 5A)。また周囲組織、修復部位へ新生血管が認められ、組織学的所見では、修復部位には膠原線維による肺胸膜の肥厚が認められた。また、4 週間後では欠損した胸膜下に脂肪組織の形成を認めた (図 5B)。

図 5A

再開胸時肉眼的所見

青色光下所見

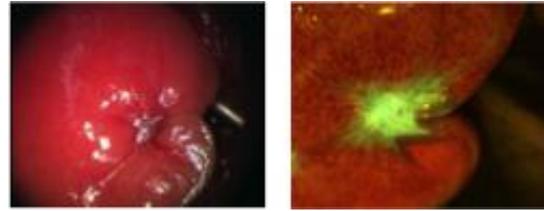
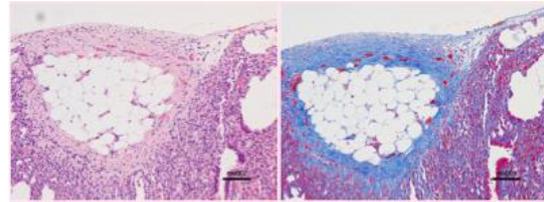


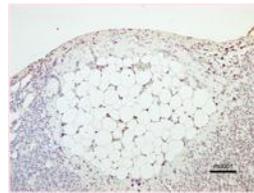
図 5B 組織学的所見

HE

AZAN



GFP 染色



総括

将来、自己細胞を用いた再生医療において、必ずしも対象臓器・組織由来の幹細胞にこだわることなく、他の部位から採取した幹細胞が活用される可能性が高く、脂肪組織はその筆頭候補である。今回、皮下脂肪組織から採取した脂肪由来間葉系幹細胞を含む脂肪由来細胞から細胞シートを作成することが可能であった。本研究の細胞シートは培地によって、脂肪細胞、骨細胞など、他の細胞へ分化させることにより、さらに目的に応じた細胞シートの作成が可能であることが示唆された。皮下脂肪組織は人体のなかでも最大の組織であり、組織、細胞採取の際には低侵襲かつ、容易に大量の細胞が確保できると考えられる。細胞シートの移植実験としておこな

った、肺胸膜損傷部位への貼付実験で、組織修復について検討を行ったが、肺胸膜組織修復は可能であると判断できた。今後は、容易にとれる組織からの細胞シートとして、胸腔内を含む他部位への組織修復について、検討を進める予定である。

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)

[学会発表] (計1件)

- ① 井坂珠子 皮下脂肪組織由来細胞シートによる肺胸膜修復についての検討(ポスター) 日本再生医療学会 平成 23 年 3 月 2 日 新宿京王プラザホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井坂 珠子 (ISAKA TAMAMI)
東京女子医科大学・第一外科・助教
研究者番号：40318118