

機関番号：21601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791631

研究課題名 (和文) 手術時における脂肪組織含有幹細胞群の回収方法と移植法の開発

研究課題名 (英文) Development of collection process and implant procedure of freshly isolated adipose-derived stromal vascular fraction cells (SVF) in the operation.

## 研究代表者

鈴木 輝久 (SUZUKI TERUHISA )

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80508812

研究成果の概要 (和文) : SVF は ASC と比べ、すぐに回収でき、また、細胞培養を介さない点で非常に有利である。本研究では SVF の気管再生における促進効果を確認した。また、SVF は幹細胞のマーカーである CD90, CD105, CD29 を発現し ASC と同様に多分化能を有することを確認した。本結果は、SVF が再生医療において臨床応用可能である移植細胞群であることを示した。

研究成果の概要 (英文) : Freshly isolated adipose-derived stromal vascular fraction cells (SVF) have further advantages over ASC in that they are more readily collected and do not require any culturing prior to use. The study was to identify the enhancement of the regeneration process in the trachea obtained through the use of SVF. SVF show high levels of expression of the stem cell-associated markers CD90, CD105, and CD29, and possess pluripotency like ASC. Our results show that SVF have potential clinical applications as implantable stem cells for use in the regenerative medicine.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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・耳鼻咽喉科学

キーワード：脂肪組織由来細胞, 多分化能, 移植, 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

組織の再生において効率的に再生を促進するためには生体からいかに血管新生を誘導するかが重要であると多くの研究者が報告している。われわれは、血管新生を促す細胞として末梢脂肪組織由来の幹細胞に注目した。その理由として脂肪組織由来幹細胞

(Adipose Derived Stem Cells:ASC) は骨髄由来の幹細胞と比較して同等の多分化能を有し、採取自体が容易に行え、しかも採取できる幹細胞数が多いからである。いずれの点も細胞移植において倫理的に問題の少ない自家移植に最適の条件である。さらに、ASC を採取する過程で得られる stromal vascular

fraction(SVF)といわれる細胞群にも幹細胞が含まれ、ASCと違い細胞培養を介さない点で、ASCよりもさらに自家移植に有利である細胞群の報告もされはじめている。気管ではASCとSVFが血管新生のほか上皮層の形成を形態学的、機能的に正常に誘導することが予想されるが、ASC、SVFが気管の血管新生、上皮層の形成に及ぼす影響を調べた報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、気管において効率的に再生を促進することを目的として、ASC、SVFの多分化能の確認とその有効性 *in vitro* で基礎的な知見を得る。臨床応用を行う場合、培養を必要としないSVFは非常に有益であり、手術時における細胞回収を想定し、短時間で、効率的に安全に幹細胞群を含むSVFを精製する方法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) ラットから脂肪組織を採取する。コラゲナーゼによる酵素分散法にて脂肪組織を分解後、遠心し上精の成熟脂肪細胞を除去、沈殿画分をセルストレーナーで濾過して得られた細胞が stromal vascular fraction(SVF)といわれる細胞群であり、この細胞群を3世代の継代培養を経て脂肪組織由来幹細胞(ASC)を得られる。

### (2)SVFの多分化能の確認

SVFの多分化能を確認するため、ASCを分化させることが可能であった誘導培地を用い骨細胞、軟骨細胞、神経細胞、脂肪細胞等に誘導分化させる。骨細胞誘導を行う場合は、成長因子、調整因子として dexamethasone、glycerol phosphate、ascorbic acid を使用し、軟骨細胞誘導を行う場合は、Insulin、TGF-beta1 を使用。

神経細胞誘導を行う場合は、beta-mercaptoethanol を使用。脂肪細胞誘導を行う場合は Insulin、dexamethasone、IBMX を使用する。

### (3) 移植用再生組織の作製

気道の再生組織の枠組みとしては、生体適合性のあるポリプロピレンメッシュにコラーゲンを付加した材料を用い、蛍光標識細胞を播種する。

### (4) 障害モデルの作製と再生組織の移植

実験動物として SVF を得るため脂肪組織を採取したラットを用い、頸部外切開の後に高周波メスで組織を切除・凝固することによって気管の障害モデルを作製する。欠損部には移植用再生組織を移植する。移植細胞は自家移植となる。

### (5) 障害モデルの気管上皮層形成の評価

障害モデルに対して、自家移植した細胞によって組織修復過程における気管の再生、特に上皮の再生について、どのような影響を受けているかを免疫組織学的に形態的に評価する。

### (6) 手術室における SVF 回収方法の開発

効率よく、安全衛生的に手術室で頸部手術を行う患者から SVF を回収し、短時間内に SVF の調整を行う。SVF の回収において酵素分散法を使用する。

### (7)回収された SVF の性質確認

ヒト由来の SVF の多分化能を確認するため、(2)と同様の手順で分化誘導を行う。間葉系幹細胞のマーカーとされている CD 90、CD 105、CD 29、の3種でフローサイトメトリーによる細胞集団の同定と細胞表面マーカー陽性細胞数測定する。また、それぞれのマーカーの発現率を調べる。

### (8)ヒト由来 SVF の移植実験

ヌードラット頸部皮膚を高周波メスで切除し、頸部皮膚欠損モデルを作成し、皮膚欠

損部へ SVF を移植し、創傷治癒効果を確認する。

#### (9) SVF の効率的回収

SVF の広く臨床応用を可能にするため、日常の手術で使われる器械類で細胞回収過程のおおよそを行うことができるようにする。

### 4. 研究成果

#### (1) SVF の多分化能の確認(図 1)

脂肪組織から SVF を回収後、軟骨誘導培地 (DMEM、 $6.25 \mu\text{g/ml}$  insulin、 $10 \text{ ng/ml}$ 、 $\text{TGF-}\beta 1$ ) を用い軟骨細胞への分化が確認できた。神経細胞誘導培地 (DMEM、 $20\%$ FBS、 $1\text{mM}$   $\beta$ -mercaptoethanol) を用い神経細胞への分化が確認できた。脂肪細胞誘導培地 (DMEM、 $1\%$  FBS、 $10 \mu\text{M}$  insulin、 $1 \mu\text{M}$  dexamethasone、 $0.5\text{mM}$  isobutyl-methylxanthine) を用い脂肪細胞への分化が確認できた。

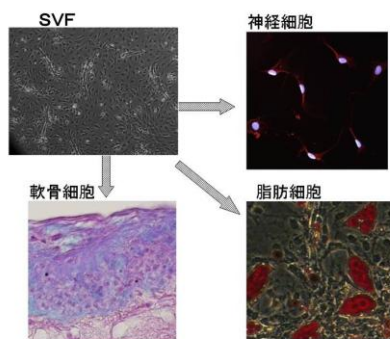


図1 SVFの多分化能

#### (2) 障害モデルを作製し SVF を含む再生組織を移植

実験動物として SVF を得るため脂肪組織を採取したラットを用い、頸部外切開の後に高周波メスで組織を切除・凝固することによって気管の障害モデルを作製した。気道の再生組織の枠組みとしては、生体適合性のあるポリプロピレンメッシュにコラーゲンを付加した材料を用い、SVF を播種した。欠損部にこの再

生組織を移植した。移植 1、2 週間後再生気管を摘出。組織学的(図 2)・免疫組織学的に形態的に再生気管の評価を行った。SVF を含む場合、移植 1 週間後、その表面にはコントロールと比較して上皮化が促進しており、移植 2 週間後には円柱状の線毛細胞や杯細胞への分化がみられ、正常気管の構造である偽多列線毛上皮層が認められたが、コントロールではこのような像は認められなかった。

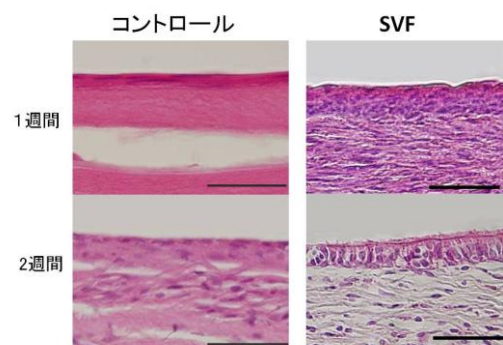


図2 SVFの気管への移植 Bar=50  $\mu\text{m}$

#### (3) 手術時における SVF 回収方法の開発

頸部手術を行う患者から脂肪組織を回収し酵素分散法を用い短時間内に SVF の調整を行うことが可能であった (図 3)。

#### (4) ヒトより回収した SVF の多分化能

ヒトより調整した SVF を軟骨誘導培地 (DMEM、 $6.25 \mu\text{g/ml}$  insulin、 $10 \text{ ng/ml}$ 、 $\text{TGF-}\beta 1$ ) を用い軟骨細胞への分化が確認できた。脂肪細胞誘導培地 (DMEM、 $1\%$  FBS、 $10 \mu\text{M}$  insulin、 $1 \mu\text{M}$  dexamethasone、 $0.5\text{mM}$  isobutyl-methylxanthine) を用い脂肪細胞への分化が確認できた (図 3)。

さらに、フローサイトメトリーで調整した SVF の間葉系幹細胞マーカーの発現率を調べた結果、CD29 は  $66.9\%$ 、CD90 は  $83.3\%$ 、CD105 は  $65.6\%$  の発現率を示し、この細胞群は多分化能を有することが確認された (図 4)。

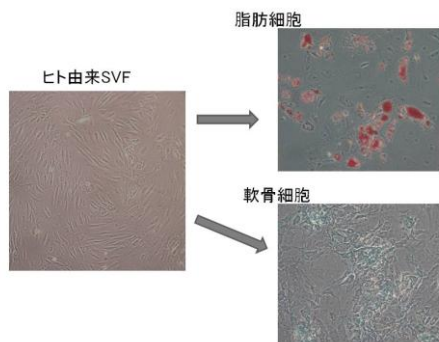


図3 ヒト由来SVFの多分化能

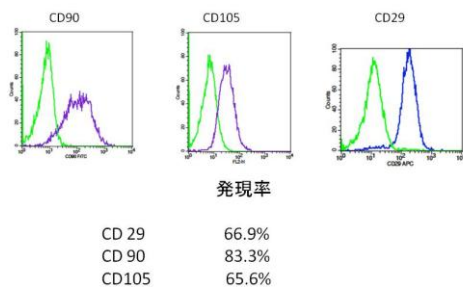


図4 フローサイトメトリーによる回収SVFの幹細胞マーカー発現率

(5) ヒトより回収した SVF の創傷治癒効果

ヌードラットの頸部皮膚欠損モデルに調整した SVF を移植した結果、組織学的に線維芽細胞の遊走が促進され創傷治癒が進んでおり、ヒト由来 SVF も組織再生効果が確認された。

(6) SVF の効率的回収

ヒト脂肪組織より SVF を回収する場合、酵素分散法を使用し、反応温度を高めにするこ  
とで、細胞回収時間を短縮することが可能であった。

(7) 以上の結果から、本手法により回収された SVF は多分化能を有していることが確認された。また、in vivo でラット SVF の移植実験を行った場合、気管上皮の再生を促進させていた。さらにヒト脂肪組織より調整した SVF をヌードラットの頸部皮膚欠損モデルに移植実験を行った結果、創傷治癒が進んでおり、ヒト由来 SVF を自家移植した場合、気管再生に大きく寄与できる結果と考えられた。

細胞回収においても回収時間を短縮でき、手術時の細胞回収効率をあげ臨床応用に有効であると考えられた。

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)

①Okano W, Nomoto Y, Kobayashi K, Miyake M, Suzuki T, Tada Y, Nakamura T, Watanabe M, Omori K. Bio-engineered scaffold with fibroblast for tracheal regeneration in a rabbit model.

Inflammation and Regeneration 30, 34-39(2010) 査読有り

②Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Wada I, Nakamura T, Omori K. A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells. Biomaterials 31(18) 4855-4863(2010) 査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 輝久 (SUZUKI TERUHISA)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80508812

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小林 謙 (KOBAYASHI KEN)  
北海道大学大学院農学研究院・助教  
研究者番号：30449003

岡野 渉 (OKANO WATARU)  
福島県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号：10554420

鈴木政博 (SUZUKI MASAHIRO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90513268