

令和 2 年 9 月 25 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・特命助教

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迅速に抽出・培養できるマイクロパターン基材の開発を行った。このマイクロパターン基材は、脂肪組織からADSCsを迅速かつ大量に抽出しながら培養することができる。この技術は、癌化のリスクの低い安全なiPS細胞の分離や抽出をはじめ、様々な細胞の分離や抽出に応用可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、安全で良質な細胞を迅速かつ大量に生産することが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、さまざまな組織に含まれる細胞の分離や抽出、培養、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さまざまな細胞機能の差異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 pattern scaffold quickly rather than other cells contained in adipose tissue. In this research, we developed the micropattern scaffold which can extract and cultivate it quickly from adipose tissue by using the such character of ADSCs. The micropattern scaffold can extract and cultivate the ADSCs quickly and in large quantities from adipose tissue. This technology can apply the separation of the safe iPS cells having low risk of canceration and can apply it to the extraction of various cells.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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おり、ADSCs 注入による乳房の再建や、難治性の創傷治癒などが成功例として知られている。ADSCs による再生治療は、患者さん自身から吸引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。この方法は2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 **ADSCs の品質が低下する恐れ**があることである。従来の方法では 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。この遠心分離や酵素処理の強い刺激が、ADSCs の品質を低下させていると指摘する研究者もいる。ここでいう ADSCs の品質とは、その純度や増殖能、分可能、代謝能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。脂肪組織は体積の90%以上を脂肪細胞が占めており、ADSCs は5%にも満たないと言われている。ADSCs を患部にまんべんなく行き渡らせるために、ADSCs を脂肪組織に混ぜて体積を稼ぎ、それを患部に注入する従来の方法では、低密度の ADSCs で治療していることになる。そのため、ADSCs による治療効果を疑問視する声もある。そこで我々は、マイクロパターン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 のみを用いた効果的な再生治療を行いたいと考えた。ADSCs による再生治療の効果を向上させ、一般的な治療法として広く認められるためには、高品質の ADSCs を大量に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、**マイクロパターンを用いて脂肪組織から高品質の ADSCs のみを選択的に抽出・培養**し、これを**迅速に大量生産する新技術を提案**する。この新技術は、ADSCs がマイクロパターンに沿って速く遊走する性質を利用し、ADSCs の抽出や培養に遠心分離や酵素処理を用いない。そのため、ADSCs をダメージレスに抽出・培養でき、その品質向上にも繋がると考えた。更に、マイクロパターン上で培養された ADSCs は、その増殖速度向上も期待できる。我々は、高品質の ADSCs を迅速に大量生産し、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使えるようにしたいと考えている。

本研究は、ある種のパターン(特許出願を予定しているため具体的に記載できず)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最初の目標とした。まず、生体から採取された脂肪組織をある種のパターン(特許出願を予定しているため具体的に記載できず)上に載せる。ある種のパターンは脂肪組織に含まれる ADSCs をパターンに沿って直線的に遊走させると共に、その**遊走速度の向上**も期待できる。それに対して、脂肪組織に含まれる他の細胞(脂肪細胞、マクロファージ、好中球、血管内皮細胞など)のある種のパターン上での遊走速度は、ADSCs と比べて極めて遅い。つまり、ある種のパターン上に載せた脂肪組織から真っ先に這い出してくるのは ADSCs である。そして、速く這い出してくる ADSCs はある種のパターン上で高密度となるため、その**増殖速度の向上**も大いに期待できる。更に、本研究で開発される技術は、抽出および培養において遠心分離や酵素処理を必要とせず、細胞に与えるダメージが極端に少ない。そのため、ADSCs の**品質の向上**にも寄与できると考えている。我々は、こういった用途に対して最適化されたある種のパターン基材を開発し、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する。将来的には、ある種のパターン基材によって ADSCs の質と量を十分に確保し、効果の高い再生治療の実施を目指している。

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、これまでにある種のパターン上で ADSCs を培養し、その興味深い性質を見いだしている。その一つが、ADSCs がある種のパターンに沿って他の細胞よりも速く遊走することである。本研究はこういった ADSCs の性質を活用して、脂肪組織から ADSCs のみを選択的に遊走させて抽出・培養し、迅速に大量生産できるマイクロパターンを開発した。このマイクロパターンは一枚の基材上にある種のパターンを掘ったもので、このパターンの構造や配向、配置に特

徴がある。我々は、この特徴的なパターンが掘られた基材を、その用途からある名称で呼称しているが特許出願内容に触れるので記載できない。

4. 研究成果

本研究で新規に開発されたマイクロパターン基材について紹介する。この【**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。しかし、特許出願を予定しているため具体的に記載できない。

【**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**酵素処理を必要としない培養基材を考案**した。このセルマイグレーションセパレーターを、より優れた培養基材とするために、セルマイグレーションセパレーターに播種された細胞や組織に対し、**荷重をかけて接着性を向上させるとともにメカニカルなストレスの付与により細胞の分離や抽出、培養の効率を向上させる技術**や、**NIPAM を用いた細胞の剥離回収技術**を検討中である。しかし、特許出願を予定しているため具体的に記載できない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

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, 第36巻, 2019年, 57-64 (査読なし)
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: <https://10.1002/jbm.b.33905>
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ェ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: <https://doi.org/10.1380/jsssj.38.473>

〔学会発表〕(計8件)

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, 鳥袋真人, 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)
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)
H. SUNAMI, Y. SHIMIZU, Y. IGARASHI, T. TABELI, 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)
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)
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)
Hiroshi SUNAMI, Junko DENDA, Ikuko YOKOTA, Yukiko UECHI, Hitoshi NAKASONE, Tomokazu YOSHIZAWA, 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)

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)

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1件)

名称: コラゲ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/オルソリバース

種類: 特許

番号: PCT/JP2019/007472

出願年: 2019/2/27

国内外の別: 国外

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(8桁): 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(8桁): 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)

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。