

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19917

研究課題名(和文)患者組織由来脂肪幹細胞の臨床応用に向けた開発研究

研究課題名(英文)Assessment and evaluation of patient-derived adipogenic stem cells

研究代表者

三吉 範克(Miyoshi, Norikatsu)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・医長

研究者番号：20528624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：外科手術により皮下組織から効率的かつ安定的に脂肪組織由来幹細胞を抽出する方法を構築した。具体的には、手術時に皮下組織から脂肪組織を清潔状態で手術道具(クーパー等)を用いて切開し、粗大な組織をフィルターで除外した後に、遠心し細胞集塊を抽出した。この細胞についてはFACSで表面マーカー解析を行った。培養液は無血清培地を用いることで、培養細胞を安定的に維持継代することができた。この脂肪幹細胞について、免疫不全マウスの左側大腿前面の皮膚を切開し、大腿筋組織の一部を熱傷させたところに移植し、筋力の回復と運動機能の評価を行ったところ、補填することで一部の筋組織の再生と運動機能の改善を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：During a surgery, we extracted fat tissue beneath the skin using a scalpel, washed with saline. The tissue was minced into 1-mm pieces using scissors and dissociated with collagenase in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM). The dissociated tissue was filtered through a custom 200- μ m-mesh filter. The filtered solution containing cells was cultured directly or after washing with DMEM in a 20- μ m-mesh filter again. The expression of surface proteins of cultured cells was determined using flow cytometry. We could find a population expressing CD34, but not CD31. We could maintain and culture the cells in serum-free medium. Using NOD/SCID mice, we transferred the cells subcutaneously into the femoral muscle, following surgical procedure such as skin cut and muscle ablation. In these mice, the function was evaluated, suggesting that the adipogenic stem cells transplanted differentiated and supported the lost function in the operated legs.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪 外科 手術 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞研究は、幹細胞を特定の細胞系譜へと導く分化制御により、意図する目的用途に応じた移植用細胞を作り出せる可能性を示唆している。iPS 細胞は、現在再生医療における非常に有用なツールとして注目されているが、臨床応用に関しては未だ障壁が残されている。われわれの研究グループもマウスやヒトの脂肪幹細胞から多能性幹細胞を誘導し、分化多能性について検討を行い、再生医療を目指した開発研究を行っており、この中で脂肪幹細胞が臨床応用に関して有用なマテリアルとなりうる事が明らかとなってきた。外科手術、特に癌を対象とした根治切除においては機能欠損を必然的に伴うが、個々の患者由来の脂肪組織から間葉系幹細胞を抽出し、これを安定的に分化誘導させることで、より安全性の高い再生医療のマテリアルを構築できる可能性がある。

2. 研究の目的

個々の患者由来の多能性幹細胞集団として脂肪組織から間葉系幹細胞を、遺伝子操作を行うことなく抽出し、これを安定的に分化誘導させることで、より安全性の高い再生医療のマテリアルを構築する開発研究を行う。

3. 研究の方法

外科手術により皮下組織から効率的かつ安定的に脂肪組織由来幹細胞を抽出する方法を構築する。抽出した細胞集団における解析を行う。抽出した間葉系細胞の評価として、NOD/SCID マウスへの細胞移植を行い、

移植されたマウスモデルを用いて機能評価を行った。マウスモデルとして筋組織の損傷を伴うものを選択し、当該細胞の移植によって機能が補填されうるかどうかについて検討することとした。具体的な機能評価としては、マウスの大腿、下腿の可動域の評価、運動機能の評価を行った。動物実験計画に関しては、当センターの動物実験委員会の IRB 承認を得て実施した。

4. 研究成果

外科手術により皮下組織から効率的かつ安定的に脂肪組織由来幹細胞を抽出する方法を構築した。具体的には、手術時に皮下組織から脂肪組織を清潔状態で手術道具(クーパー等)を用いて切開し、これを切除後、生理食塩水で洗浄、清潔下にミンスを行い、粗大な組織をフィルターで除外した後に、遠心してペレットとして細胞集塊を抽出した。この細胞については FACS で表面マーカー解析を行い、CD34 陽性、CD31 陰性の集団に加えて、CD34 陰性、CD31 陰性の集団もとらえることができた。これらの細胞を維持する培養液についても検討をおこなった。培養液は DMEM/F12 に 10% KnockOut Serum Replacement, 1% MEM NEAA, 1% GlutaMAX-1, 1mM Sodium pyruvate, 50ug/mL L-Ascorbic Acid, 10ng/mL bFGF, 2ng/mL TGF-beta の組成を用いることで、培養細胞を 1 か月間、安定的に維持継代することができた。この臨床サンプルから抽出した脂肪幹細胞について、NOD/SCID マウスの左側大腿前面の皮膚を切開し、大腿筋組織の一部を熱傷させたところに移植し、筋力の回復と運

動機能の評価を行った。マウスは三種混合麻酔（メドミジン、ミダゾラム、ブトルファノール）を用い、麻酔薬の腹腔内投与を行った後に処置を施行した。移植する脂肪組織由来間葉系細胞は $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 個を 100 μ L のマトリゲル (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) に懸濁し、熱損傷を加えた筋組織に注入した。コントロール群では熱損傷を加えた大腿筋組織に同量のマトリゲルのみを注入し、評価を行った。施術後、3 か月経過した後にマウスの大腿筋の機能評価を行った。評価方法はマウス歩行時に施術側の足底がケージ底に接着するかどうか（足底接地）、壁伝いに後ろ足二足で立ち上がった際に施術側の下腿が進展しているかどうか（二足立ち）をビデオカメラを用いて 1 時間記録後に 2 名の観察者によって評価した。評価結果は、細胞移植を行わなかったマウス 4 体については足底接地（1 / 4）も二足立ち（0 / 4）も障害されたのに対して、細胞移植を行ったマウスでは足底接地（4 / 4）も二足立ち（4 / 4）も観察された。このことから、移植した細胞により損傷された大腿筋の機能が補填されたものと推察された。脂肪由来間葉系細胞の移植を行い、機能の補填されたマウスの大腿筋を採取し、anti-HLA antibody (Abcam, Cambridge, MA, USA) を用いて免疫組織染色を行ったところ、マウス筋組織の中に抗体陽性となる細胞の集塊を認めた。

今回、マウスの実験では、補填することで一部の筋組織の再生と運動機能の改善を確認することができた。将来的には消化器外科手術における、病変切除にともなう筋組

織の欠損に際して、自己の脂肪幹細胞を補填することで機能損傷を補填できる可能性があり、このような幹細胞研究は、癌の根治性を損なうことなく、機能回復を実現させることから臨床的有用性が非常に高いものと考えられる。

今後は CD34 陽性、CD31 陰性の細胞集団をより多く抽出できる技術および培養液組成の改良を行い、再現性の高い安定したものにすること、抽出した幹細胞についての機能解析を行い、特異的な分化の方向性や系譜について検討を行う。

また抽出した脂肪幹細胞について FACS で表面マーカー解析（CD31、CD34）を行い、目的の細胞集団（CD34 陽性、CD31 陰性）をとらえていることが確認できたことから、これらの細胞集団について *in vitro* での筋組織などの間葉系組織への分化誘導を試みる。

今回、移植した細胞の機能解析としてマウスモデルを用いたが、将来的には臨床において広範で大量な損傷組織を補填することを考えると、マテリアルを培養、増殖させてから移植するなどの方法を検討する必要があると思われる。培養される細胞は継代を重ねることで性質が変化することが予想される。移植に要する大量のマテリアルを用意するためには、期待されるマテリアルの性質を維持したまま安定的かつ効率的に培養、増殖させる必要があることから、この最適な培養環境についても今後検討する必要がある。

(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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 15 回日本再生医療学会

会期：2016 年 3 月 17 日から 19 日

場所：大阪国際会議場

発表形式：口演

タイトル：消化器外科手術における脂肪幹細胞を用いた再生医療

演者：三吉範克、藤野志季、大植雅之、安井昌義、左近賢人、松浦成昭

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者：三吉範克

(Miyoshi, Norikatsu)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・

その他部局等・医長

研究者番号：20528624

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()