

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08802

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による組織修復

研究課題名(英文) Tissue repair using adipose-derived cells

研究代表者

井坂 珠子 (Tamami, Isaka)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：40318118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：目的とした臓器・組織由来の細胞、組織以外の、他の部位から採取した幹細胞が活用される可能性が高い。今回、ブタの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。本研究の脂肪由来細胞シートは培地によって、脂肪細胞以外にも、他の細胞へ分化させることにより、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。移植実験では、作成した細胞シートが、生着し、脂肪へ分化していることが確認できた。今後は、容易にとれる組織からの細胞シートとして、組織修復が必要である部位への移植の検討を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ブタ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温度応答性培養皿で培養し、シート状態で採取できた。シート状にすることで、細胞間の支持材料を不要とする集合体を作成でき、組織へ移植することができた。体から、簡易な方法で、大量の細胞が確保でき、脂肪由来幹細胞を含むことで、移植予定部位の組織目的にあわせて、分化、増殖すれば、移植部位への効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cells derived from target organs and tissues, as well as stem cells collected from other parts of the body, other than tissues, are likely to be used in regenerative medicine. Regenerative medicine using adipose-derived mesenchymal stem cells for tissue repair has the potential to restore injured or damaged tissues and organs to a normal and healthy state. In this study, we succeeded in producing cell sheets made of adipose-derived cells, including adipose-derived mesenchymal stem cells harvested from porcine subcutaneous adipose tissue. Adipose-derived cell sheets can be differentiated into cells other than adipocytes depending on the culture medium, making it possible to create cell sheets for various purposes. After transplantation of adipose-derived cell sheets were confirmed that the prepared cell sheets thicken tissue along with fibroblasts and fat cells. In the future, we plan to study the transplantation of adipose-derived cell sheets that repair to specific organs.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：細胞シート 脂肪由来幹細胞 移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な理由で、欠損、損傷臓器の組織を再建・修復することは、生体機能の回復のために必要となる。現状では臓器移植や人工臓器に頼らざるを得ない。しかし臓器移植ではドナー不足や免疫拒絶反応など解決すべき課題が残されており、また人工臓器の利用においては、抗血栓性、生体親和性、耐久性などが大きな問題となっている。このため、これらの代替であり、かつ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、現状の臨床研究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多く用いられている。特に、ヒトにおいては最大の組織である脂肪組織から採取される脂肪由来間葉系幹細胞は、様々な研究で細胞ソースと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し、骨髄穿刺に比べて採取が容易である。脂肪由来間葉系幹細胞(ASC; adipose tissue-derived stem cells)は近年、臨床応用が進行しており、クローン病などの腸瘻を外科的閉鎖後周囲に創傷治癒促進、再瘻孔防止を目的として、周囲に投与するなどが報告されている。また、呼吸器領域では、気管瘻に自己培養ASCをフィブリン糊に混注して瘻孔を閉鎖する試みも報告されている。そのほかの報告では、脂肪組織内に脂肪前駆細胞をより多く含ませることより、移植後の治癒過程における組織吸収による萎縮を予防し、軟部組織をより効率的に増大させることが目的であるとの報告もある。また脂肪前駆細胞を軟骨細胞や血管内皮細胞へ分化、誘導させてから、目的部位へ移植を行う方法も報告されており、今後の再生医療における有効的活用が期待される場所である。創傷治癒に関しても、細胞増殖因子の出現、虚血組織の血行改善、血管新生の誘導も指摘されており、治癒効果があるとされている。しかし、いずれも、支持体を必要とし補助的に周囲に追加、塗布するなどの報告が多い。本研究においては、間葉系幹細胞を含むと考えられるASCを用いて培養細胞シートを作製し、培養条件により分化しうる細胞の性状、特性を比較検討することにより、より効果的な組織再建が可能となることを期待する。

2. 研究の目的

本申請では、再生医療の細胞ソースとして用いることを最終目的として、ブタ皮下脂肪組織から採取した間葉系幹細胞および同細胞を含む分画を用いて、その特性、有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1)ブタ皮下脂肪組織からの細胞単離、培養、細胞シート作成：解析

全身麻酔下の実験用ブタ皮膚を切開し、皮下より正常脂肪組織を採取し、コラゲナーゼなどの酵素処理を用いて成熟脂肪細胞等を除去後、得られた細胞分画(SVF; stromal vascular fraction)を培養に供する。培地は一般的な細胞培地であるDMEMあるいはMEMを基本とし、分化条件の検討においては、デキサメサゾン、インスリン、FBS(Fetal Bovine Serum)などを添加する。それぞれの適正な種類、濃度について比較検討した。採取した細胞を温度応答性培養皿上で培養して、シート状で回収できる培養条件(播種細胞密度、培養期間等)の確立を目的とする。

(2)ブタ脂肪由来細胞シートの移植

ブタ皮下脂肪組織から採取した細胞を用いて作製した細胞シートを移植し、細胞の生着、移植部位での組織学的検討を行う。

4. 研究成果

(1)ブタ皮下脂肪組織からの細胞単離、培養、細胞シート作成：解析

ブタ皮下組織より皮下脂肪組織を採取し、細断後、コラゲナーゼを用いて酵素処理を行い、細胞を単離し、成熟脂肪細胞を除去。35mm 培養皿に 1×10^4 個 / cm^2 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。培養液の検討では、15%FBS、インスリン添加の DMEM 培養液下で培養しすると、脂肪滴を多く有する細胞が培養可能であった。oil redO 染色を行うと、脂肪滴が赤く染色され、脂肪を有した培養細胞であることが確認できた。分離、分化した細胞を温度応答性培養皿に継代し、培養すると、脂肪を有した細胞シートが採取可能であった。細胞増殖因子である HGF FGF 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 について測定すると、HGF、VEGF の上昇は認められなかったが、FGF の測定では SVF 細胞シートの培養中の培養液に FGF の上昇を認めた。培養中の培養液と、シート作製後、24 時間後の培養液中の FGF 濃度の差は認められなかった。

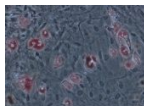
細胞シート



Oil red O 染色



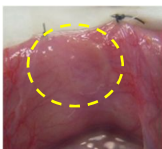
細胞シート (HE/ Azan)



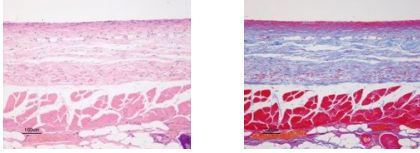
(2)ブタ脂肪由来細胞シートの移植

採取した、ブタ脂肪由来細胞シートを作成後、生体への生着を確認するため、F344 ノードラットの皮下へシートを移植し、細胞シートの生着について評価した。4 週間後に組織学的評価を行うと、移植した部位への皮下組織の線維芽細胞の増生と脂肪細胞の生着を認めた。今回作製した細胞シートは、生体への生着が可能であることが確認できた。

細胞シート移植



移植した部位の組織学的検査



総括

再生医療において、目的とした臓器・組織由来の細胞、組織以外の、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、全身にある、最大の脂肪組織はその筆頭候補である。今回、ブタの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、脂肪細胞以外にも、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、現在、美容整形などで、皮下脂肪吸引が広く行われており、採取時の安全性は担保されている。よって、低侵襲で、かつ、大量の細胞が採取、確保できる組織である。細胞の培養液の検討で、最適な細胞シートを採取できた。移植実験では、皮下移植で作成した細胞シートが、生着し、脂肪と線維芽細胞ととのみ組織を厚くしていることが確認できた。今後は、容易にとれる組織からの細胞シートとして、呼吸器外科領域である、肺、気管など、血管が乏しく、修復改善が難しい部位への移植の検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------