

平成21年4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592071

研究課題名（和文） 大網由来幹細胞の展開

研究課題名（英文） Omentum-derived mesenchymal stem cells

研究代表者 鳥山 和宏 (Toriyama kazuhiko)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40314017

研究成果の概要：

お腹の中には、虫垂炎や胃潰瘍の時に癒着して治す大網という組織があります。われわれは、以前より、大網には皮下脂肪と同様に幹細胞（いろいろな細胞に分化できる細胞）が含まれていることを示してきた。本研究では、大網から幹細胞を選び出して培養し、骨や軟骨に分化できる具体的な条件を検討した。大網からの幹細胞では、骨への分化は脂肪からの幹細胞とは異なり、BMP-2 という因子だけを加えることがポイントであった。また、軟骨への分化は脂肪からの幹細胞からの分化と同様に TGF- β の添加が大切であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：大網、SVF、幹細胞、分化能

1. 研究開始当初の背景

皮下脂肪組織には、未分化な幹細胞が豊富に含まれていて、その採取も容易なことから骨髄組織に変わりうる、体性幹細胞のソースとして注目を集めている。一方、大網は、皮下脂肪組織と同様に、豊富な脂肪組織を含み、血管が極めて豊富であると同時に、その内部に特殊なリンパ組織（大網乳斑）を有している。例えば、大網乳斑は腹腔マクロファージやリンパ球の産生部位で、腹腔内の免疫反応において重要な役割を果たしている。大網は

皮下組織と同様の体性幹細胞のソースとしての可能性、さらに一部の血球系のソースの可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

そこで、本研究は、脂肪組織から幹細胞を得る技術を大網へ応用して、大網に含まれる幹細胞について分化能を評価するとともに、皮下脂肪組織と異なる大網の特性を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

手術時に余剰となった大網を患者さんに書面で同意を得た上で(倫理委員会承認 159)、大網を提供して頂いた。皮下脂肪と同様の方法で、コラゲナーゼ処理後の遠心操作よりSVFを得た。

FD20 培地 (DMEM と Ham F12 の 1: 1 の混合培地に 20%FBS を添加したもの)

FL2 培地(DMEM と MCDB201 の 3:2 の混合培地に 2%FBS, ITS, FGF2, レノイン酸を添加したもの)

【増殖】高血清の FD20 培地および低血清の FL2 培地にて培養を行った。位相差顕微鏡にて細胞形態を写真撮影するとともに増殖曲線を求めた。

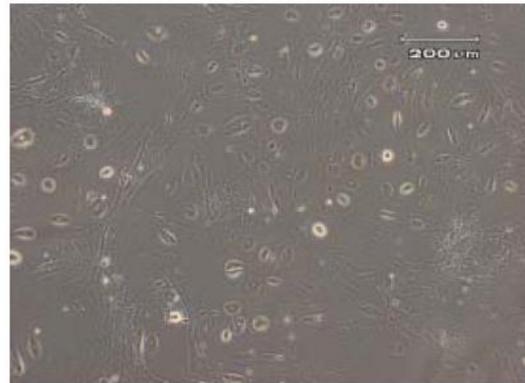
【脂肪分化】FL2 培地で 3 日間培養してコンフルエントになった状態で脂肪細胞に分化誘導するために脂肪分化培地 (10%FBS 添加の DMEM 培地にインドメサシン・ヒドロコルチゾン・インシュリン・デキサメサゾンなどを含む) で 21 日間培養した。脂肪細胞への分化は細胞内の油滴の蓄積を顕微鏡下で観察した。

【骨分化】皮下脂肪由来の SVF では培地に BMP2 とレチノイン酸(RA)を添加すると骨分化の効率が上がることが知られている。大網でも BMP2 と RA の有無によって、分化に影響があるか検討した。骨分化誘導培地 (10%FBS 添加の DMEM 培地にアスコルビン酸とグリセロールフォスフェイトを添加) に BMP2 と RA を適宜添加して、誘導後 21 日目の細胞外のコルチシニアパタイト中のカルシウムを定量比較した。また、アルカリフォスファターゼ活性の確認とコッサ染色による細胞外のコルチシニアパタイトの確認を行った。

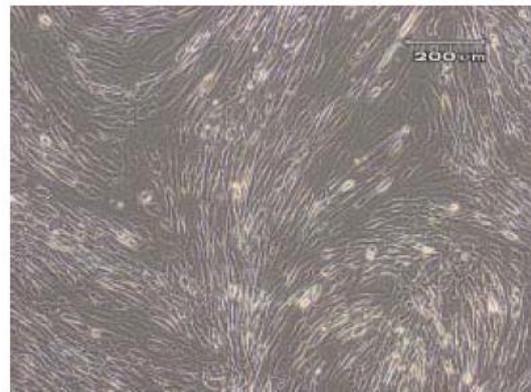
【軟骨分化】皮下脂肪では DMEM 培地に無血清で TGF- β を添加すると軟骨へ分化することが知られている。大網では無血清の DMEM 培地に TGF- β を添加しても軟骨への分化が poor であった。そこで、無血清の DMEM 培地に代わって、FD20 培地と FL2 培地+LIF で TGF- β の添加の効果を検討した。

4. 研究成果

【増殖 1】FD20 培地および FL2 培地にて培養を行い、P1 の Day 8 にて撮影した (次図)。高血清の FD20 培地では丸い小型細胞と線維芽細胞様細胞が混在していた。一方、低血清の FL2 培地では増殖した線維芽細胞様細胞が大勢を占めた。

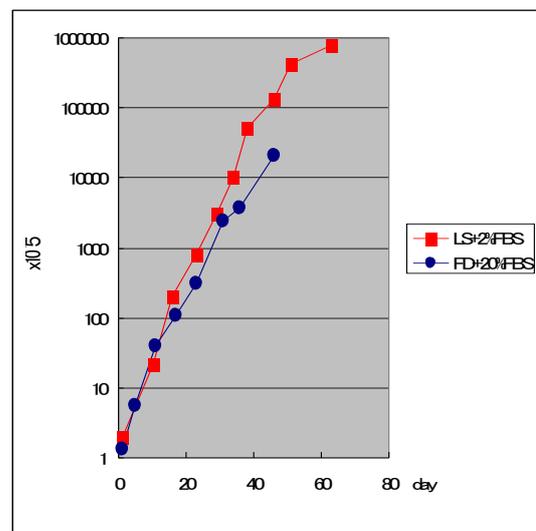


FD20 培地の Day 8

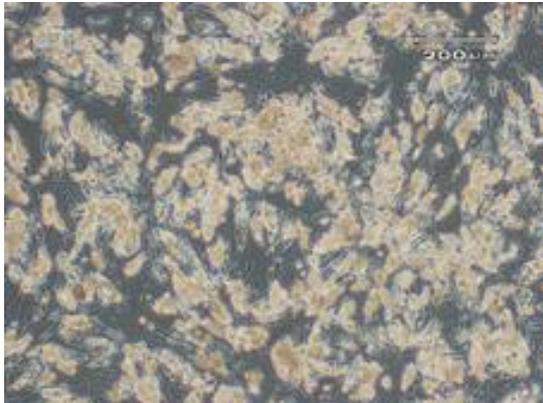


FL2 培地の Day 8

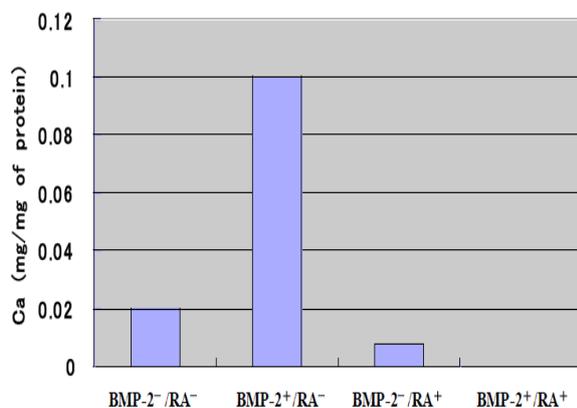
【増殖 2】FD20 培地および FL2 培地で、ともに良好な増殖を示したが、低血清の FL2 培地にて増殖速度はより速かった (下図)。



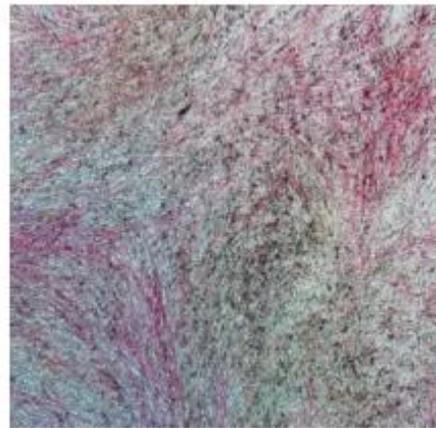
【脂肪分化】皮下脂肪と同様の方法で、脂肪分化誘導をかけた。誘導開始後 21 日で良好に細胞内に油滴を蓄積して脂肪細胞に分化した（下図）。



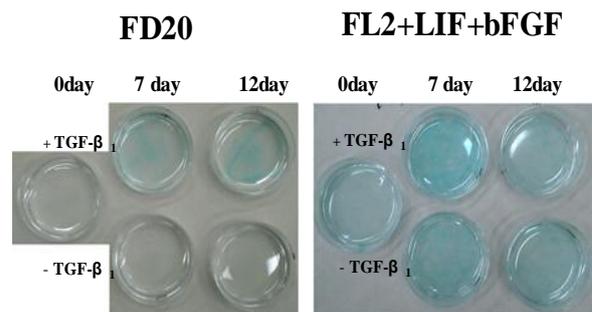
【骨分化 1】細胞外に析出したヒドロキシアパタイトのカルシウム量を測定したところ、BMP2-/RA-, BMP2+/RA-, BMP2-/RA+でカルシウムの生産がみられたが、BMP2-/RA-, BMP2-/RA+では生産量は極めて低かった。また、BMP2+/RA+は全く生産されなかった（下図）。つまり、大網では、BMP2 を添加したときのみ骨分化能を示した。



【骨分化 2】骨誘導 21 日後に、アルカリフォスファターゼ活性とヒドロキシアパタイトの沈着を調べた。BMP2+/RA-（下図）のみ両方で陽性反応を示した。BMP2-/RA-では両染色とも陽性だが反応が非常によわかった。BMP2-/RA+では部分的に陽性反応がみられた。また、BMP2+/RA+では、アルカリフォスファターゼ染色・コッサ染色ともに陰性反応であった。



【軟骨分化】FD20 培地では、TGF-β を添加した群（次図の左上）のみアルシアンブルー染色で陽性であった。また、FL2 培地+LIF では、TGF-β の有無に関わらず、アルシアンブルー染色陽性であった。特に、TGF-β を添加した群（次図の右上）で強陽性であった。



シャーレ上段は TGF-β 添加群

【結果まとめ】大網からの SVF は、皮下脂肪由来の SVF と同様に、脂肪・骨・軟骨へ分化できた。しかし、骨への分化は RA 非添加 BMP-2 添加時に効率的であった。また、軟骨への分化は TGF-β を FL2 培地+LIF に添加した時に良好であった。

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 3 件）

1. Takanari K, Kamei Y, Toriyama K,

Yagi S, Torii S. Differences in blood flow volume and vascular resistance between free flaps: assessment in 58 cases. J Reconstr Microsurg. 査読有. 25(1), 2009, 39-45

2. Iwashima S, Okazaki T, Maruyama S, Saka Y, Kobori M, Omae K, Yamagu

chi H, Niimi T, Toriyama K, Kamei Y, Torii S, Murohara T, Yuzawa Y, Kitagawa Y, Matsuo S. Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue.

Stem Cells Dev. 査読有. Dec. 4, 2008, Epub

3. Kamei Y, Toriyama K, Yagi S, Torii S. Analysis of 13 cases with g astroepiploic vessels used as graft s. J Reconstr Microsurg. 査読有. 24(7), 2008, 515-518

〔学会発表〕(計3件)

1. 鳥山和宏、亀井譲、八木俊路朗、高成啓介、佐藤秀吉、小栗雄介、鳥居修平 ラット頭蓋骨骨膜を大網上に移植したときの骨形成と軟骨形成 第17回日本形成外科学会基礎学術集会 2008年10月3日 東京

2. 鳥山和宏、亀井譲、八木俊路朗、鳥居修平 ラット頭蓋骨骨膜を大網上に移植したときの骨形成の長期経過 第16回日本形成外科学会基礎学術集会 2007年10月12日 神戸

3. 中里公亮、亀井譲、鳥山和宏、八木俊路朗、鳥居修平 ラット頭蓋骨骨膜を大網上に移植したときの早期骨誘導の検討 第16回日本形成外科学会基礎学術集会 2007年10月12日 神戸

6. 研究組織

(1)研究代表者

鳥山 和宏 (Toriyama Kazuhiro)
名古屋大学・医学部附属病院・講師)
研究者番号：40314017

(2)研究分担者

鳥居 修 (Torii Shuhei)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60115607

亀井 譲 (Kamei Yuzuru)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10257678

八木 俊路朗 (Yagi Shunjiro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助手
研究者番号：00378192

研究協力者

北川泰雄 (Kitagawa Yasuo)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：50101168