

平成 22 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19791220

研究課題名（和文） 気道領域におけるヒト組織の培養および再生に関する研究

研究課題名（英文） Resarch of the culture and regeneration in human tissue for the respiratory tract

研究代表者

横山 秀二（YOKOYAMA SHUJI）

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80381408

研究成果の概要（和文）：気道領域の変形・欠損に対し自己組織で再建すべく、基礎研究としてヒト皮下脂肪組織から得られたヒト脂肪組織由来幹細胞（ASCs）に対し Cell analyzer を用い細胞表面マーカーの解析および分化誘導を行った。その結果、ヒト ASCs は間葉系幹細胞の性格に類似することが確認され、また、ヒト ASCs の分化誘導により脂肪細胞および軟骨細胞への分化の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To reconstruct the transformation and defect for the respiratory tract by self-organizing, We used Cell analyzer for human adipose-derived stem cells (ASCs) obtained from a human subcutaneous fatty tissue as fundamental researches, and we induced the analysis of the cell surface marker and differentiation. As a result, it was confirmed that human ASCs resembled the character of mesenchymal stem cells, and possibility of the differentiation to fat cells and cartilage cells was suggested by differentiation instruction of human ASCs.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2009年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 480,000 | 3,580,000 |

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：耳鼻咽喉科学

1. 研究開始当初の背景

様々な領域における障害臓器に対する臓器再生の必要性は異論のないところである。耳鼻咽喉科領域においては、腫瘍や外傷、奇形による骨・軟骨組織、上皮組織、結合織、筋肉、唾液腺などの欠損に対し、これらの再生は重要な課題である。

現在に至るまで、気道領域の再建手術は、気管の腫瘍浸潤による切除、炎症や外傷などによる気管狭窄をきたした場合に行われている。その例として、甲状腺腫瘍の気管浸潤を認めた症例に対し二期的に局所皮弁を用いた気管再建を行い、術後経過は良好で気管狭窄は認めなかったものの、退院までに要し

た期間が初回手術からおよそ3ヶ月であった。従来行われている気道の再建手術は、術後内腔への痂皮付着、癒痕狭窄の可能性があり、追加手術が必要となる場合がある。また、DP皮弁や肋軟骨を用いて気道の再建を行うことは患者にとってさらなる手術侵襲を加えるばかりでなく、採取部位の癒痕拘縮による術後後遺症が出現する可能性もあり、術後のQOLへの影響が懸念される。

組織工学(Tissue Engineering)はVacantiとLangerらによって始められ、体外で細胞培養し、目的とした組織を作りこれを体内に移植する方法であるが、未だ実現には至っていない。当科において、これまでに京都大学再生医科学研究所で行われてきた人工気管の開発研究に関連して、同大学グループはコラーゲン被覆した人工材料を用いて犬の頸部気管、縦隔内気管、分岐部気管の再建実験を行い、いずれも安全に使用可能で、内腔は完全に上皮が再生することを確認している。これらのデータをもとに、当大学の倫理委員会の承認を受け(238番、2003年)、先天・後天性喉頭狭窄の症例に対して人工材料を用いた気管再建を実際の臨床で応用し、良好な結果を得ているが、長期予後に関しては今後の検討課題である。

2. 研究の目的

気道領域において、腫瘍、外傷、奇形により欠損した骨・軟骨組織、上皮組織、結合織、筋肉などを自己組織で再建すべく、ヒト組織の細胞を確実に培養し、生着・増殖可能な技術確立する。さらに再生組織を形態学的に評価する。本来の形状の組織を体外で作製することを目的とし、最終的には本来組織の持つ機能的な面も再生できることが期待される。

現在、気道領域において、組織欠損部位には人工材料が用いられているが、本研究により自己組織での再生が可能となれば、気道粘膜の肉芽形成・異物反応がなくなることに加え、美容的・機能的にも大幅な改善が見込まれる。

3. 研究の方法

(1) ヒトでの脂肪由来幹細胞(ASCs)の単離、培養技術の確立

事前に患者さんの承諾を得た上で、手術に伴い切除・摘出された脂肪組織を採取する。抗生物質を含むPBSでよく洗浄した脂肪組織から結合組織・リンパ節を除き、残った脂肪組織をメスにて細切する。細切した脂肪組織は、collagenase II 溶液で酵素処理し細胞懸濁液の状態にする。得られた細胞懸濁液を遠心分離し脂肪細胞と脂肪滴を分離する。沈殿した脂肪細胞群をセルストレーナーで濾過し、通過画分を脂肪由来細胞画分として10%FBSを含むDMEMに懸濁し、dish内

に細胞を播種する。2時間後dish内をPBSで洗浄し、dishに接着した細胞群に10%FBS/DMEMを加え、37°Cで培養する。コンフルエントになったら3継代培養し、得られた細胞群を脂肪由来幹細胞(ASCs)とする。さらに、フローサイトメトリー(FACS)を用いて、単離直後と培養後のASCsを用いて表面抗原マーカーの発現量を解析し、多分化能の有無について確認する。抗体は間葉系幹細胞由来のCD90やCD105をはじめ、血管内皮細胞由来のCD34、CD45などを用いて検討する。

(2) 脂肪由来幹細胞(ASCs)を用いた脂肪細胞および軟骨細胞への分化誘導

培養して得られたASCsを、10mlの脂肪前駆細胞培養用培地が入った遠沈管に移し遠心する。上清を取り除き、脂肪前駆細胞培養用培地を2mL添加し細胞懸濁液を調製する。細胞懸濁液を少量とり、トリパンブルーで染色したあと細胞数を計測する。遠心管中の細胞懸濁液を10mLの脂肪前駆細胞培養用培地で懸濁し再度遠心する。上清を取り除き、細胞を 4×10^6 cells/mlの濃度になるように調製する。

分化誘導を開始する前に、コントロール群としてASCsの維持培地でのwellを準備し、分化誘導したwellと比較する。

① 脂肪細胞への分化誘導

得られたASCsを6wellプレートに播種し、その中に脂肪前駆細胞培養用培地(DSファーマバイオメディカル、カタログ番号:PM-1)を3.0ml/well添加する。つづいてインキュベーター内(37°C、5%CO₂)で培養し、コンフルエントに達したことを確認する。次に、先の脂肪前駆細胞培養用培地を脂肪細胞分化培地(DSファーマバイオメディカル、カタログ番号:F-DM-2)に全量交換し、分化誘導を開始する。分化誘導開始から7日目に脂肪細胞分化培地を1.8mL/well取り除き、脂肪細胞培養用培地(DSファーマバイオメディカル、カタログ番号:F-AM-1)を同量加え、その後3日おきに脂肪細胞培養用培地を半量ずつ交換する。分化誘導開始2週間後にOil Red O染色を行い、ASCsの脂肪細胞への分化能をコントロール群と比較し、評価する。

② 軟骨細胞への分化誘導

得られたASCsを6wellプレートに播種し、その中に軟骨細胞分化培地(CELL Application, INC、カタログ番号:411D-250)を3.0ml/well加え、インキュベーター内(37°C、5%CO₂)で培養する。3日おきに軟骨細胞分化培地を交換し、2週間後にAlcian Blue染色を行い、ASCsの軟骨細胞への分化能についてコントロール群と比較し、評価する。

4. 研究成果

(1) ヒトでの脂肪由来幹細胞(ASCs)の単離、培養技術の確立

手術に伴い摘出された気道領域のヒト皮下脂肪組織から複数のASCsの分離・培養を行った。得られた脂肪組織は、行われた術式によって差はあるものの、平均5gであった。脂肪組織は直ちに生理食塩水に浸し、培養処理までの間、4℃の冷蔵庫内で保管した。採取後6時間以内に先の培養方法に従いASCsの単離、培養を行った結果、ASCsを得るまでに約2週間を要することが確認できた(図1)。

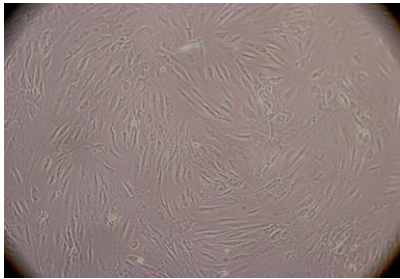


図1 コンフルートに達したASCs

またASCsの培養にあたり、原疾患に対する手術前治療(放射線治療)の範囲に気道領域が含まれていた脂肪組織では、放射線治療を受けていない脂肪組織に比べてASCsの培養が不安定であった。また、放射線治療終了後から脂肪組織を採取するまでに要した時期は最低でも2週間以上経過していた。このことから、放射線は皮下脂肪組織におけるASCsの培養の可否に影響を与える可能性が示唆された。

次に、得られたASCsに対しCell analyzerを用いて、ASCsの細胞表面マーカーの解析を行った結果、造血幹細胞マーカーであるCD34、CD45に対しては陰性であり、間葉系幹細胞マーカーであるCD90(図2)、CD105(図3)、CD29(図4)、CD166は陽性所見を示した。

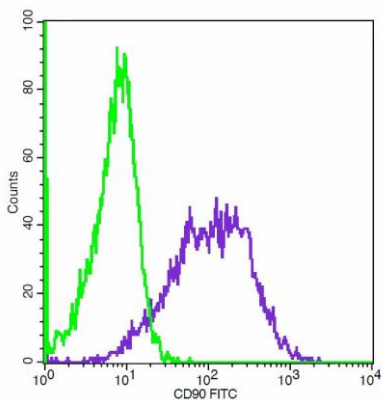


図2 ASCsの表面抗原(CD90)：陽性率83.3%

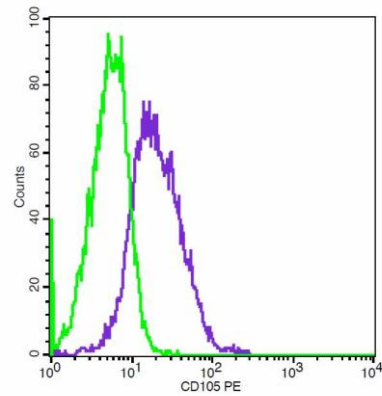


図3 ASCsの表面抗原(CD105)：陽性率65.6%

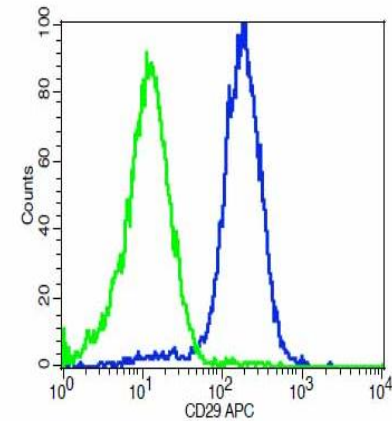


図4 ASCsの表面抗原(CD29)：陽性率66.9%

(2) 脂肪由来幹細胞(ASCs)を用いた脂肪細胞および軟骨細胞への分化誘導

① 脂肪細胞への分化誘導

ASCsを脂肪分化誘導培地にて培養させた結果、平均5日目頃から小型の脂肪滴様のものが出現し、これをOil red O染色にて染色したところ、赤色に変化したことより脂肪滴であることが確認された(図5)。

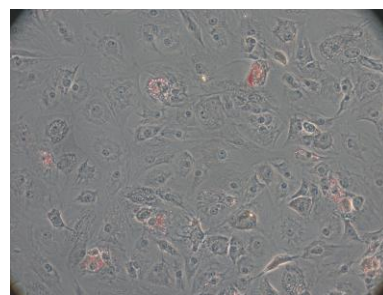


図5 ヒトASCsの脂肪様細胞への分化(5日後)

その後、培養2週間、3週間において、Oil red O染色下に観察すると、細胞質内にみられた脂肪滴が経時的に増加することが確認され、脂肪組織様細胞への分化が確認された。一方で、コントロール群(維持培地)は

細胞形態の変化はみられず、Oil red O染色にて赤色に染色される脂肪滴は認めなかった(図6)。

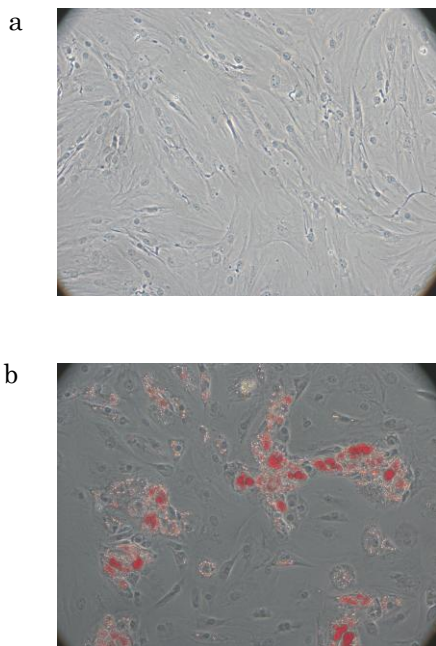


図6 ヒトASCsの脂肪様細胞への分化(2週間後)
(a: コントロール群、b: 脂肪細胞分化培地群)

② 軟骨細胞への分化誘導

ASCsを軟骨分化誘導培地にて培養させた細胞は、2週間後には軟骨細胞への分化を示す Alcian Blue 染色にて青く染色された細胞集団を認めた。また、コントロール群の細胞では Alcian Blue 染色で陰性所見を認めた。

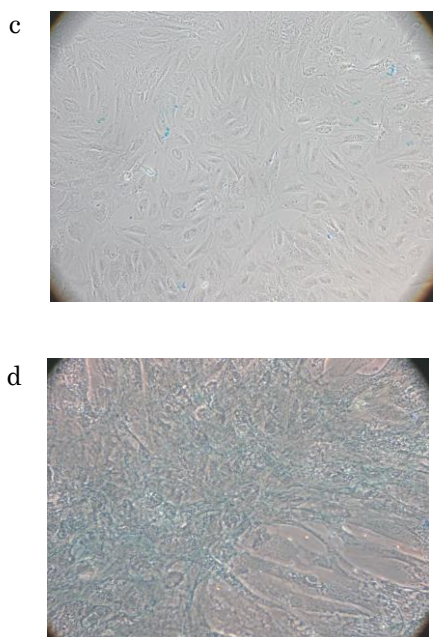


図7 ヒトASCsの軟骨様細胞への分化(2週間後)
(c: コントロール群、d: 軟骨細胞分化培地群)

本研究において、気道領域の皮下脂肪組織から得られたヒトASCsは間葉系幹細胞の性格に類似することが確認され、また、ヒトASCsの分化誘導により脂肪細胞および軟骨細胞への分化の可能性が示唆された。今後、ヒトASCsの安定した分化誘導を目指し、誘導細胞の動物モデルへの移植を進めていく予定である。

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)

[学会発表] (計1件)

- ① 鈴木政博、横山秀二、大森孝一：脂肪由来幹細胞に対する細胞表面マーカーの発現解析．第7回福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科学教室講演会，福島，2009年12月12日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 秀二 (YOKOYAMA SHUJI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80381408

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

- ① 大森 孝一 (OMORI KOICHI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10233272

- ② 鈴木 政博 (SUZUKI MASAHIRO)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90513268

- ② 鈴木 輝久 (SUZUKI TERUHISA)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80508812

