

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791617

研究課題名（和文） ヒト脂肪由来幹細胞の培養法の確立および組織再生技術の研究開発

研究課題名（英文） Establishment of the culture method, and research and development of the anagenesis technology of human adipose derived stem cells

研究代表者

鈴木 政博（SUZUKI MASAHIRO）

福島県立医科大学・医学部医学研究科・助手

研究者番号：90513268

研究成果の概要（和文）：

動物（ラット）において安定した脂肪由来幹細胞の採取，培養技術が確立した上で、ヒトの脂肪由来幹細胞の安定した培養技術を確立できたことを確認した。また、培養したヒトの脂肪由来幹細胞を用いて、創傷治癒に対する影響を、ヌードラットを用いて実験した。その結果、ヌードラットの頸部皮膚欠損部において、皮膚の再生を含め早期から創傷治癒を促進させる可能性を示すことを確認した。

研究成果の概要（英文）：

We confirmed that we were able to establish the stable culture technology of human adipose derived stem cells, after culture technology established it in a rat.

In the cervical cutaneous defect part of the nude rat, we confirmed that we showed possibility to promote wound healing by cultured human adipose derived stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：脂肪組織由来細胞，創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

組織工学（Tissue Engineering）とは Vacanti や 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成し、これを生体内に移植して、環境適合・組織のリモデリングと

機能化を実現させる技術であるが、最近大きな期待が寄せられている。

当科においては、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

いて犬の気管の再建実験を行い、その安全性を確認している。これらのデータをもとに福島県立医科大学の倫理委員会の承認を受け(238番, 2003年)、喉頭狭窄の症例に対し、人工材料を用いた気管再建を臨床応用し、概ね良好な結果を得ている。(Omori K, et al .Ann Otol Rhinol Laryngol 2008)

しかし、問題点として、組織欠損部位の上皮化の遷延が挙げられる。創傷治癒の促進のために、当科では、動物実験において、自己の培養された線維芽細胞や幹細胞の移植が同時に行われ、気管においては、人工材料による再建部位の創傷治癒が促進されることを証明しつつある。高い増殖能と多分化能から、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞が最近注目されているが組織幹細胞に比して腫瘍形成のリスクが高いとされていることをふまえ、再生医療の開発においては初期段階にあると認識し、間葉系幹細胞である脂肪由来幹細胞を用いて研究開発を進めることとした。

2. 研究の目的

骨髄由来の間葉系幹細胞に比べ採取が容易であり、倫理面からも安全性が高いヒト由来の脂肪由来幹細胞を用いて、その特性や多分化能を確認する。脂肪由来幹細胞の安定した培養方法を確立させ、保存状態の異なる脂肪組織からの培養の可能性についても追及する。最終的には培養されたヒト由来の脂肪由来幹細胞が創傷治癒の促進に貢献することへの関与をヌードマウスを用いて検証することを目的とする。

3. 研究の方法

動物(ラット)での脂肪由来幹細胞が単離、培養技術の確認を行い、その細胞を用

いて、多分化能の確認や幹細胞の表面抗原解析を行う。動物での培養法をヒトでも応用させ、ヒトの脂肪由来幹細胞を単離、培養する。安定した培養技術を確立させ、ラットと同様に多分化能の確認や幹細胞の表面抗原解析を行うことで得られる細胞が幹細胞由来であることを確認する。更に、異なる保存条件下でも脂肪由来幹細胞が培養可能か確認し、ヌードマウスの頸部皮膚及び皮下への移植し組織学的に評価する。

4. 研究成果

動物(ラット)での脂肪由来幹細胞の単離、および培養を行った。採取した脂肪組織はコラゲナーゼ処理して分解し、脂肪組織由来の細胞群を採取することが可能であった。この細胞群を培養させることも可能であった。動物での安定した採取、培養技術が確立したことを確認した上で、培養法をヒトでも応用させた。我々は説明と同意の上で、実際にヒトの手術標本から不要となった脂肪組織を採取した。同様な方法でヒトでの脂肪由来幹細胞の単離および培養が可能であることを確認した。この培養したヒトの細胞特性に関して、フローサイトメトリーを用いて調べた。間葉系幹細胞に関連した細胞表面マーカーであるCD29,CD90,CD105の発現率を調べた結果、CD29, CD90, CD105の発現率が66.9%, 83.3%, 65.6%となり、得られた細胞が幹細胞の性質を有している可能性が高いことを確認することができた。

我々は、ヒトでの例数を重ね、ヒトの脂肪由来幹細胞の安定した培養技術を確立できたことを確認した。

培養したヒトの脂肪由来幹細胞を用いて、創傷治癒に対する影響を、ヌードラットを用いて実験した。耳鼻咽喉科での手術検体からのヒトの脂肪組織を

得るには、安定した供給が困難であったため、実際には販売されているヒトの脂肪由来幹細胞 (Invitrogen) を培養し、使用した。方法としては、生後 9 週から 10 週のヌードラットの後頸部に直径 10mm の全層性皮膚欠損部を作製した。皮膚欠損部は人工皮膚 (テルダーミス真皮欠損用グラフト®、オリンパステルモバイオマテリアル) で被覆、縫合した。この人工皮膚内に、培養したヒト脂肪由来幹細胞を懸濁した Matrigel™ (BD) を注入、移植した。コントロールとして PBS を混合した Matrigel™ を人工皮膚内に注入したモデルを作成した。創傷治癒の過程を肉眼的に比較、評価した。肉眼的には、1 週間後の時点で、ヒト脂肪由来幹細胞を移植したモデル (ASC 群) ではコントロールモデル (Control 群) に比べて、創部の縮小傾向を認めていた。2 週間後の時点では、いずれのモデルでも創部は上皮化していたが、例数を重ね定量的な検討も行った。創部の 1 週後の創部の上皮化率は、Control 群で 57% (n=10) ASC 群で 73% (n=10) であった。p<0.005 で統計学的な有意差を認めていた。次に、2 週間後のみではあるが、上皮化した創部の表皮層の面積 (mm²) とその構造について病理組織学的に検討した。その結果、Control 群で 0.084 mm² (n=5) ASC 群で 0.128 mm² (n=5) であった。p<0.05 で統計学的な有意差を認めていた。また、再生表皮の構造は ASC 群では正常な表皮層を形成していたが、control 群では有棘層の形成が未熟であった。

以上の結果から、ヒト由来の脂肪由来幹細胞が頸部皮膚欠損部において、皮膚の再生を含め早期から創傷治癒を促進

させる可能性を示していると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

鈴木 政博, ヌードラットの頸部皮膚欠損部に対するヒト脂肪由来幹細胞の創傷治癒効果,

第 11 回日本再生医療学会総会,

平成 24 年 6 月 12 日~14 日, 横浜市 パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

鈴木 政博 (SUZUKI MASAHIRO)

福島県立医科大学・医学部医学研究科・助手

研究者番号: 90513268

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：