

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27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：22791618

研究課題名（和文） 気道領域におけるヒト脂肪由来幹細胞と多血小板血漿を用いた臓器再生に関する研究

研究課題名（英文） Research of the regeneration with the human adipose derived mesenchymal stem cells and platelet rich plasma in 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・講師

研究者番号：80381408

研究成果の概要（和文）：気道領域における組織欠損や変形に対して、自己組織で再建すべく、ヒト皮下脂肪組織から得られたヒト脂肪由来幹細胞（ASCs）を用いて、様々な細胞への分化誘導を試みた。その結果、ヒト ASCs は軟骨様細胞や骨芽様細胞への分化を示し、さらに多血小板血漿（PRP）を添加することにより分化誘導が促進される傾向が確認された。

研究成果の概要（英文）：To reconstruct the organ defect and transformation in the respiratory tract by self-organization, we tried the inducing differentiation to various cells with the human adipose-derived stem cells (ASCs) obtained from a human subcutaneous fatty tissue. As a result, human ASCs showed the differentiation to a chondroid cells and a osteoblastic-like cells, and platelet-rich plasma (PRP) tends to accelerate the inducing differentiation of ASCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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管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 (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。しかし、問題点として気道の組織欠損部位の上皮化の遷延や人工材料を用いることによる異物反応の可能性が挙げられる。当科では動物実験において、創傷治癒促進のために自己の線維芽細胞や幹細胞の移植を同時に行うことにより、人工材料による気管再建部位の創傷治癒が促進されつつあるが、感染や壊死のリスクをより減少させるため、さらなる上皮化の促進と自己組織での気管再生が望まれる。

2. 研究の目的

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、唾液腺などの欠損は美容的・機能的障害を伴うため、これらの再生は重要な課題である。当科では、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、問題点として気道の組織欠損部位の上皮化の遷延や人工材料を用いることによる異物反応の可能性が挙げられる。そこで、当科では動物実験において、創傷治癒促進のために自己の線維芽細胞や脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cells、以下 ASCs) の移植を同時に行うことにより、人工材料による気管再建部位の創傷治癒が促進されることが確認しているが、感染や壊死のリスクをより減少させるため、さらなる上皮化の促進と自己組織での気管再生が望まれる。

一方、組織再生に関連し、多血小板血漿 (Platelet-Rich plasma、以下 PRP) がトランスフォーミング成長因子 (transforming

growth factor- β 、以下 TGF- β)、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor、以下 PDGF)、インシュリン様成長因子 I (insulin-like growth factor-I、以下 IGF-I) など多数の成長因子を含むことから、自己血由来の血液成分を用いて創部の治癒機構の促進に関与するとの報告があり、当科では、甲状腺外科手術後の創傷治癒過程の評価を行い良好な結果を得ている。

そのため、ヒト脂肪由来幹細胞を軟骨細胞に分化誘導したものを気管再建部位に移植し、さらに創傷治癒を促進させるものとして数多くの成長因子を含む PRP を用いることにより、気管再建部位の創傷治癒・上皮化促進に寄与する可能性について in vitro において明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 気道領域における脂肪由来幹細胞 (ASCs) の単離、培養技術の確立

研究参加に際し、予め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。

(2) 気道領域における脂肪由来幹細胞 (ASCs) を用いた分化誘導

① 軟骨細胞への分化誘導

培養して得られたヒト 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。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、細胞懸濁液を 6 well plate に入れ 10 分間室温で放置する。その後、DMEM で洗浄し、軟骨細胞誘導培地を 3ml 加え、インキュベーター内 (37°C、5%CO₂) で培養する。3 日おきに軟骨細胞誘導培地を交換し、2 週間後に得られた細胞を Alcian Blue 染色を行い、軟骨細胞への分化を組織学的に確認する。

② 気管軟骨組織添加による培養ヒトASCsの軟骨細胞への分化誘導促進効果に関する評価
手術に伴って切除された気管軟骨の一部を冷所保存し、同一個体の培養ヒトASCsを単離した後、培養ヒトASCs単独群、培養ヒトASCsにヒト気管軟骨組織を付加した群、ヒト気管軟骨単独群、の3群を作製する。各群をマトリゲル (BD社製) と十分混和し、Millicell (Millipore製) に充填し、12 well culture plate 上で37℃で4週間培養する。つづいて、3群各々に対して、STK-2無血清培地 (BD社製) 添加群と軟骨細胞誘導培地 (Cell Applications Inc. 製) 添加群に分け、ASCsの軟骨細胞への分化誘導の確認を組織学的に行う。

③ 骨芽細胞への分化誘導

培養ヒトASCsと市販ヒトASCs(DSファーマ社製)の2群を準備し、それぞれに多孔体ハイドロキシアパタイト (CELLYARD HA scaffold, PENTAX社) を添加し、12 well culture plate 上で37℃で4週間培養する。さらに各群を、STK-2無血清培地 (BD社製) 添加群と骨芽細胞誘導培地 (Cell Applications Inc. 製) 添加群の2つに分け、誘導開始2週間後に石灰化染色キット (Primary Cell社) にて骨芽細胞への分化誘導の確認を組織学的に行う。

(3) 多血小板血漿 (PRP) の採取・調整

充分量の血液 (約20ml) を血液パックあるいは採血管に採血する。採取した自己血液を遠心分離法により、血球層と血漿層の境界付近に血小板を集め、血小板層あるいは白血球沈層を回収する。分離された血小板と白血球層に、トランスフォーミング成長因子 (TGF-β)、血小板由来成長因子 (PDGF) など創傷治癒に関わる成長因子が濃縮された状態を作製する。得られた製剤と市販または自己トロンビン (採血の上調整) ・塩化カルシウム混合液と混合したものを準備する。

(4) ヒトASCs軟骨細胞分化誘導における多血小板血漿 (PRP) の促進効果に関する評価

培養ヒトASCsをマトリゲル (BD社) に十分混和したものを作製し、Millicell (Millipore製) に充填し、その中にコラーゲンスポンジを埋没させ37℃、30分保温庫に入れゲル化する。これを12 well culture plate 内に設置し、STK-2無血清培地 (BD社製) にて4週間培養した後、軟骨細胞誘導培地単独群と先のPRP添加軟骨細胞誘導培地群の2群に分け、軟骨細胞への分化誘導を行い、2週間後組織学的に評価する。

4. 研究成果

(1) 気道領域における脂肪由来幹細胞 (ASCs) の単離、培養技術の確立

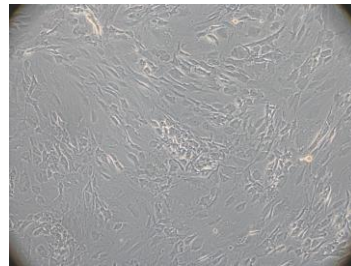
気道領域の手術により摘出された臓器に付随しているヒト皮下脂肪組織を採取した。得られた脂肪組織は平均5gであった。脂肪組織は直ちに生理食塩水に浸し、4℃の冷蔵庫内で保管、採取後6時間以内に先の方法に従いASCsの単離、培養を行った。その結果、ASCsを得るまでの期間として約2週間を要することが確認された。また、ASCsの単離、培養に際し、放射線化学療法に暴露した皮下脂肪組織はASCsの単離が不安定である傾向があったことから、放射線化学療法はASCsの単離に悪影響を及ぼすことが示唆された。

(2) 気道領域における脂肪由来幹細胞 (ASCs) を用いた分化誘導

① 軟骨細胞への分化誘導

培養ヒトASCsを軟骨細胞誘導培地にて2週間培養した細胞は、Alcian Blue染色にて青く染色される細胞集団を認め、軟骨様細胞への分化が示唆された。また、同様の期間において、維持培地のみコントロール群の細胞集団において、Alcian Blue染色では陰性所見を認めた。(図1a、b)

a



b



図1：培養ヒトASCsの軟骨様細胞への分化 (2週間後)

(a：コントロール群、b：軟骨細胞分化培地群)

② 気管軟骨組織添加による培養ヒトASCsの軟骨細胞への分化誘導促進効果に関する評価

培養ヒトASCs単独群、培養ヒトASCsにヒト気管軟骨組織を付加した群、ヒト気管軟骨単独 (図2) 群、の3群を作製し、ヒトASCsの軟

骨細胞への分化誘導の確認を行った結果、軟骨細胞誘導培地添加群において、培養ヒトASCs単独群に比べ、培養ヒトASCsにヒト気管軟骨組織を付加した群で軟骨様細胞への分化が促進される傾向が確認された。

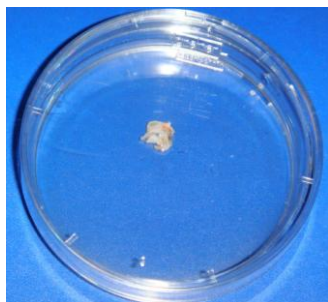


図2：採取したヒト気管軟骨組織

③ 骨芽細胞への分化誘導

培養ヒトASCsと市販ヒトASCs(DSファーマ社製)の2群を作製した。骨芽細胞への分化誘導開始2週間後において、いずれの群において骨芽様細胞への分化が確認され、さらに市販ヒトASCsと比較し培養ヒトASCsの骨芽様細胞への分化は、ほぼ同程度の傾向が確認され、遜色ない結果であった(図3a、b)

a



b



図3：ヒトASCsの骨芽様細胞への分化(2週間後)

(a: 培養ヒトASCs群、b: 市販ヒトASCs群)

(3) 多血小板血漿 (PRP) の採取・調整

市販ヒトO型全血液(コージンバイオ社)を用い、あらかじめ抗凝固剤であるCPDA液2mlを吸引したシリンジで血液を20ml採取し、1500rpmで10分間遠心した。血漿層(上層)と赤血球層(下層)とに分離し、上下の層の間にある細胞層を含めて上層の血漿を吸引採取した。つづいて、採取した血漿を3000rpmで15分間遠心し、下層の血漿を2ml残しつつ、上層の血漿を吸引除去

した。残った2mlの血漿をPRPとした。

(4) ヒトASCsの軟骨細胞分化誘導における多血小板血漿 (PRP) の誘導促進効果に関する評価

軟骨細胞誘導培地単独群とPRP添加軟骨細胞誘導培地群の2群を作製し、2週間軟骨細胞への分化誘導を行った結果、2群ともばらつきはあるものの、軟骨様細胞への分化が確認された。コラーゲンスポンジについては、数日で消失するものと2週間後まで残存するものがみられた。加えて、PRP添加軟骨誘導培地群においては、軟骨細胞誘導培地単独群に比べ軟骨様細胞への分化が促進される傾向が見られた。

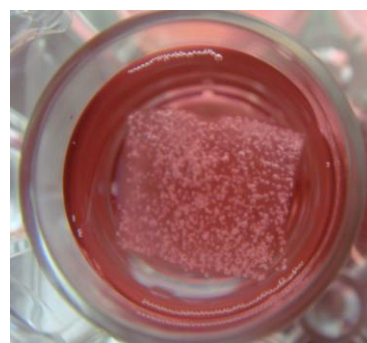


図4：ヒトASCsとコラーゲンスポンジを混合しゲル化させた状態

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、大森孝一、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、横浜市、2012年6月14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・講師
研究者番号：80381408

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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

鈴木 政博 (SUZUKI MASAHIRO)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・
助手
研究者番号：90513268