

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592628

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞を用いた気管軟骨再生法に関する研究

研究課題名(英文) Research on the regeneration of tracheal cartilage using adipose-derived stem cell

研究代表者

臼井 規朗 (USUI, NORIAKI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30273626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来幹細胞(ADSC)を分化させて軟骨細胞シートとし、回転培養により軟骨管状構造体を作製することを目的とした。

家兔皮下脂肪組織からADSCを採取し、継続培養して細胞シートを形成後に回転培養を行った。当初は軟骨細胞への分化が不十分であったが、分化因子と培養条件の調整により軟骨細胞シートが形成された。しかし軟骨基質の産生が不足するためシートに十分な強度がなく回転培養による軟骨管状構造体の作製は困難であった。

ADSCを軟骨細胞に分化させることは可能であるが、細胞シートのみで軟骨構造体を作製することは困難で、幹細胞からの気管再生では細胞外マトリックスなどの適切な足場が不可欠であると結論した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to fabricate a cylindrical cartilage using cartilaginous cell sheets that were made by differentiated adipose-derived stem cells (ADSC). ADSCs were harvested from the subcutaneous adipose tissue of white rabbits and cultured in order to promote a formation of cartilaginous cell sheet. Although a differentiation from the ADSC to the cartilaginous cell was initially unsatisfactory, cartilaginous cell sheets were finally formed by the addition of several growth factors and the adjustment of culture conditions. However it was difficult to fabricate a cylindrical cartilage by a rotational incubation of cartilaginous cell sheets due to a lack of abundant cartilage matrix. It was concluded that a fabrication of a scaffold-free cylindrical cartilage using cartilaginous cells originated from the ADSCs was extremely difficult and adequate scaffold, such as extracellular matrix, was essential to a regeneration of tracheal cartilage from the stem cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：気管軟骨 再生医療 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

気管無形成や広範囲型先天性気管狭窄症、高度の気管・気管支軟化症など、小児における気管・気管支の先天異常は極めて重篤な呼吸困難症状を呈する。食道による代用気管や心膜グラフト、肋軟骨グラフトなどの利用、あるいは外科的成形術によって再建された気管や気管支は、内腔を保持し得る十分な強度を持たないことが多いえ、肉芽の形成や再狭窄が発生し易く呼吸管理に難渋する。このような理由から小児呼吸器外科領域では気管・気管支に関する再生医療の発展が期待されてきた。臨床応用が始まっている成人領域における気管の再生<sup>1)</sup>では、近年良好な治療成績が得られはじめている。これらの再生気管は悪性腫瘍の治療のために部分切除を余儀なくされた気管・気管支の代用として用いられるためのもので、生体非分解性素材を足場として周囲からの結合組織の浸潤や気管粘膜上皮の再生を促すことによって形成されている。成人の場合、再生気管は成長の必要がないため生体非分解性足場が残存しても問題にならず、また必要とされる長さが比較的短い再生気管自体に柔軟性を持たせる必要はない。しかし、これに対して小児に必要な再生気管は将来的に径や長さが成長する必要があり、その範囲も成人に比べて非常に広い。従って、小児における気管の再生に際しては、1)成長に備えて生体非分解性素材の足場を用いないこと、2)広範囲の再生を行うための安全な細胞源を多量に確保することが要件と考えられる。すなわち、小児の広範囲に及ぶ気管の骨格である気管軟骨の再生においては、生体非分解性素材を用いずに十分な強度と弾性を保つ必要がある、そのための多量の細胞源を確保しなければならない。

生体分解性素材を足場に用いた気管軟骨の再生実験では、足場周囲に炎症反応が起きたり、足場周囲の軟骨細胞が壊死したりする

ため軟骨組織が退縮することが報告されてきた。<sup>2)</sup>これに対して、足場を用いない軟骨細胞シートによる気管軟骨再生法が近年開発された<sup>3)</sup>。足場を用いずに再生された軟骨の組成や強度は、*in vitro*において力学的負荷をかけることで正常軟骨に近い組成や強度を持つことが示された。

そこで我々はこれらの方法を参考に、家兎耳介軟骨細胞から作製した軟骨細胞シートを *in vitro* で回転培養することで管状軟骨構造体を作製する新たな方法を考案した<sup>4)</sup>。すなわち、家兎耳介軟骨を採取して高密度培養し、軟骨細胞シートを作製したのち、シリコンチューブに巻いて形成し、6週間回転培養を継続したところ、管状軟骨構造体が再生された。この軟骨構造体は圧迫に対しても十分な弾性を保持し、気管軟骨輪を模してリング状にしてもその形状を保てるだけの強度を有していた。また、耳介軟骨と同程度のグリコサミノグリカンが生成されていることも示された。しかし、本法においては管状軟骨構造体を作製するために多量の軟骨細胞を必要とするため、臨床応用するには十分量の細胞源を確保する必要があった。

上記実験では、組織由来の分化細胞である軟骨細胞を細胞源として用いたが、臨床応用上は、免疫反応を回避できる多量の自己軟骨細胞を用いることは困難であり、自己由来の幹細胞を利用することが望ましい。そこで我々は、自己組織の中でも比較的容易に採取可能で、骨髄などに比して幹細胞の存在比率が高く、かつ増殖力にも優れた脂肪組織由来幹細胞(ADSC)に着目した。ADSCは脂肪吸引などの方法で採取した脂肪組織からも低濃度コラゲナーゼ処理にて採取でき、凍結保存が可能である。自己由来のADSCを増殖させて軟骨細胞へと分化を促進させた後に、我々の足場を用いない軟骨構造体の再生を応用すれば、ヒトにおいても臨床応用可能な自己組織由来の管状軟骨構造体の作製が可能と

考えられた。

ADSC は、これまで *in vitro* において脂肪、骨、軟骨、筋、神経などの多様な組織に分化可能なことが示されており<sup>5)</sup>、*in vivo* においても ADSC を用いた軟骨再生の研究が行われてきた。それらの研究結果から ADSC を軟骨細胞へと分化させる因子として FGF-2、TGF-<sub>1</sub>、TGF-<sub>2</sub>、TGF-<sub>3</sub> などが明らかとなっており<sup>6)</sup>、軟骨再生を促進させる条件として高密度培養に加えて、低酸素状態<sup>7)</sup>、少量の軟骨細胞の添加、ヒアルロン酸など軟骨基質の添加<sup>8)</sup>などが有効と報告されてきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、実験動物及びヒトの ADSC を軟骨細胞に分化せしめ、管状軟骨構造体を再生させることである。すなわち、まず動物実験によって家兔の ADSC を幹細胞源として採取し、高密度培養を行いながら様々な因子 (FGF-2、TGF-<sub>1</sub>、TGF-<sub>2</sub>) の添加や、低酸素濃度などの条件下に軟骨細胞への分化、軟骨細胞シートの培養、回転培養による管状軟骨構造体の形成を行う。管状軟骨構造体が形成されたところで家兔頸部に自家移植し、強度および軟骨基質の維持を検討する。動物実験により上記を確認したのち、ヒト ADSC を幹細胞源として用いて同様の実験を行う。

## 3. 研究の方法

家兔 ADSC の採取および保存：

実験動物には New Zealand White Rabbit を用いた。全身麻酔下に頸部、腋窩および腹部から皮下脂肪組織を採取した。PBS を用いて脂肪組織を洗浄の後細切し、0.25% コラゲナーゼ type II を添加して 37℃ にて 60 分間攪拌して脂肪組織を融解した。70 μm ナイロンメッシュで細胞を分離し、遠心分離後沈殿物を再浮遊して 10%FBS 入り DMEM 中で 37℃ にて 2 時間培養した。さらに遠心分離後 10%FBS、抗生剤、2.8g/l NaHCO<sub>3</sub> 入り DMEM

中で 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養器に接着した細胞のみを選択的に培養した。培養液は 1 日おきに交換し、confluent になったところで継体し、2-passage で分離させた ADSC を 1 × 10<sup>6</sup>/ml の濃度として -80℃ で凍結保存した。凍結保存した ADSC は、解凍後に 10%FBS 入り DMEM 中で 3-passage の ADSC として培養可能であることを確認した。

家兔 ADSC から軟骨細胞シートの作成：

解凍した ADSC を 10%FBS 入り DMEM 中で培養して増殖させ、トリプシン処理して細胞を回収し、1.0 × 10<sup>6</sup>/ml、2.0 × 10<sup>5</sup>/ml、4.0 × 10<sup>4</sup>/ml の細胞密度として培養器に播種し、4 週間培養を継続して軟骨細胞シートを作製した。培養液として 1) DMEM + 10%FBS に加えて、2) DMEM + 1%FBS に TGF-<sub>1</sub> (10ng/ml)、transferrin(6.25 μg/ml)、dexamethasone (10<sup>-8</sup>M) を添加したもの、3) DMEM + 5%FBS に TGF-<sub>1</sub> (50 ng/ml)、insulin(6.25 μg/ml)、transferrin(6.25 μg/ml)、dexamethasone (10<sup>-8</sup>M) を添加したものをを用いた。また培養環境における酸素の条件は、通常室内空気 (O<sub>2</sub> 21%) と、5% O<sub>2</sub> の低酸素条件を用いた。

軟骨細胞シートから管状軟骨構造体の作成：

形成された軟骨細胞シートを培養器から剥離し、シリコンチューブに巻き付けて、同じ培養液に浸漬した状態で 37℃ にて回転培養を行った。

## 4. 研究成果

実験結果 1：

培養液 1) を用いた場合、1.0 × 10<sup>6</sup>/ml では中央値 4.5 日、2.0 × 10<sup>5</sup>/ml では中央値 6 日で confluent に達した。しかし、それ以降 21 日以上培養を継続しても sphere の形成は認められなかった。2) の培養液を用いた場合、confluent に達したのち、14 日までに軟骨細胞に分化途上と考えられる sphere の形成が認められた。sphere は多数発生して上方へと

成長したが、細胞は不均一に重合するのみで、21日までに軟骨細胞シートを形成することなくディッシュより自然剥脱を生じた。細胞シート形成の前に脱分化を生じていると考えられた。軟骨細胞への分化を促進するため酸素濃度を21%から5%に変更しても、同様に軟骨細胞シートは形成されなかった。

#### 実験結果 II :

次に軟骨細胞への分化を促進するため、培養液中に insulin を添加し、TGF- $\beta$ 1 と FBS の濃度を高くした 3) の培養液を用いた。軟骨細胞への分化が継続され、細胞は重合傾向を示してシート状となった。細胞播種後、14日および21日間培養したシート状の細胞を剥離し、シリコンチューブに巻き付けて 3) の組成の培養液中で回転培養を行ったが、家兎耳介軟骨細胞による軟骨細胞シートに比較して強度が劣り、回転培養を継続してもシリコンチューブ上では円筒形状を維持できなかった。分化が不十分で軟骨基質の産生が不足していたためと考えられた。

#### 実験結果 III :

軟骨基質の産生を促進するために 3) の培養液の中に FGF-2(10ng/ml)、TGF- $\beta$ 2(10ng/ml)、TGF- $\beta$ 3(10ng/ml)をそれぞれ添加して、同様の方法で細胞シートの形成と細胞シートを用いた回転培養を行った。しかし、形成された細胞シートは、同様に強度が不十分でシリコンチューブ上で回転培養を継続できなかった。

#### 結論 :

脂肪組織由来幹細胞 (ADSC) を軟骨細胞に分化させることは可能であったが、軟骨基質の産生が不足し、細胞シートのみで軟骨管状構造体を作製ことは困難であった。幹細胞からの気管再生においては、足場を用いずに軟骨構造体を作製することは困難で、細胞外マトリックスなどの適切な足場の存在が不可欠と考えられた。

#### [参考文献]

- 1) Omori K, et al. Regenerative medicine of the trachea: the first human case. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 114;429-433, 2005
- 2) Wang X, et al. Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds: an in vitro study. *Biomaterials* 25; 3681-3688, 2004
- 3) Weidenbecher M, et al. Fabrication of a neotrachea using engineered cartilage. *Laryngoscope* 118; 593-598, 2008
- 4) Tani G et al. In vitro construction of scaffold-free cylindrical cartilage using cell sheet-based tissue engineering. *Pediatr Surg Int* 26; 179-185, 2010
- 5) Zuk PA et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biol Cell* 13; 4279-4295, 2002
- 6) Schaffler A et al. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cell* 25; 818-827, 2007
- 7) Merceron C et al. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298; C355-C364, 2010
- 8) Wu SC et al. Enhancement of chondrogenesis of human adipose derived stem cells in a hyaluronan-enriched microenvironment. *Biomaterials* 31;631-640, 2010

#### 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

白井規朗 . 小児呼吸器外科・新生児外科

-臨床と研究 最近 10 年の歩み. 小児外科創立 30 周年記念講演会. 大阪市, 4.21, 2012

〔図書〕(計 1 件)

臼井規朗. 上気道の先天異常. 系統小児外科. 福澤正洋、中村哲郎、窪田昭男編 第 3 版 永井書店, 大阪: pp422-424, 2013.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

臼井 規朗 (USUI Noriaki)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：3 0 2 7 3 6 2 6

### (2)研究分担者

神山 雅史 (KAMIYAMA Masafumi)

近畿大学・医学部奈良病院・診療講師

研究者番号：2 0 4 0 3 0 7 4