

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791917

研究課題名(和文)再生医療におけるハイブリッド3次元培養法の開発

研究課題名(英文)Development of a Hybrid Three-Dimensional Culture Method in Regenerative Medicine

研究代表者

鈴木 輝久(SUZUKI, TERUHISA)

福島県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80508812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来幹細胞(ASC: Adipose Derived Stem Cells)、線維芽細胞はそれぞれ気管上皮層の再生を促進する。本研究では、ASCと線維芽細胞の長所を同時に生かすため細胞層状配列構造(3D Architecture of cell layered arrangement:3D-A)を作製した。ラットの気管傷害モデルに3D-Aを移植するとASC、線維芽細胞の単独移植より早期に正常形態に近く、機能的な気管上皮層を再生することが確認された。このハイブリッド3次元培養法の開発は気管再生医療に大いに貢献できる結果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Adipose Derived Stem Cells (ASC) and fibroblasts each promote the regeneration of the tracheal epithelial layer. In this study, we created a 3D Architecture of cell layered arrangement (3D-A) in order to simultaneously make use of the strong points of ASC and fibroblasts. Upon grafting of 3D-A into the tracheal injury model of a rat, we were able to confirm the regeneration of a functional tracheal epithelial layer to near its normal morphology in a shorter time than with grafting of ASC or fibroblasts alone. The development of this hybrid 3D culture method seems to be capable of contributing greatly to trachea regenerative medicine.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：移植 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

組織の再生において効率的に再生を促進するためには生体からいかに血管新生を誘導するかが重要であると多くの研究者が報告している。以前から血管新生を促す細胞として骨髄由来の幹細胞が注目され、その有用性が報告されている。われわれの研究グループは、骨髄以外に幹細胞を供給できる組織として、末梢脂肪組織由来の幹細胞である脂肪組織由来幹細胞 (Adipose Derived Stem Cells:ASC) に注目し、血管新生に対する有効性と ASC を採取する過程で得られる stromal vascular fraction(SVF) といわれる細胞群中の幹細胞にも気管上皮再生を促進させる作用があることを示した。繊維芽細胞にも気管上皮細胞の増殖・分化作用があり、それらの細胞群を組み合わせることでさらに気管再生に期待ができるものと考え、繊維芽細胞と ASC を組み合わせた細胞層状配列構造 (ハイブリッド 3 次元培養) の開発を行うこととした。

## 2. 研究の目的

気管の再建方法としてコラーゲンスポンジとコラーゲンメッシュからなる人工気管による再建を行い臨床応用に至っている。問題点は露出したコラーゲンスポンジ上での上皮化の遅延が挙げられる。気管再建部の上皮化促進と再生促進を図るため、臨床応用に問題が少ない自家細胞の線維芽細胞と脂肪組織由来細胞を使用する。それぞれの細胞を単独に移植した場合、気管再生を促進させるが、繊維芽細胞と脂肪組織由来幹細胞 (ASC) を組み合わせた場合の移植法と気管再生に及ぼす影響を調べる。患者に移植するため、移植方法の安全性と再現性の検討を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ラットから末梢脂肪組織を採取する。コラゲナーゼによる酵素分散法にて脂肪組織を分解後、遠心し上精の成熟脂肪細胞を除去、沈殿画分をセルストレーナーで濾過して得られた細胞が stromal vascular fraction(SVF) といわれる細胞群であり、この細胞群を 3 世代の継代培養を経て脂肪組織由来幹細胞(ASC)を得られる。

(2) ASC・SVF の多分化能を確認するため、誘導培地を用い軟骨細胞、神経細胞、脂肪細胞等に誘導分化させる。軟骨細胞誘導を行う場合は、Insulin、TGF-beta1 を使用。神経細胞誘導を行う場合は、beta-mercaptoethanol を使用。脂肪細胞誘導を行う場合は Insulin、dexamethasone、IBMX を使用する。

(3) ラットの歯肉粘膜下層から組織片培養にて線維芽細胞を単離、3 週間培養し、細胞数として  $4.8$  から  $7.5 \times 10^5/\text{ml}$  とする。

(4) ラットの気管内腔面よりプロテアーゼによる酵素分散法にて上皮細胞を採取する。

(5) ASC と線維芽細胞を 型コラーゲン溶液に懸濁しゲル化させる。前記細胞を含むゲル上に上皮細胞を播種し、上皮細胞がコンフルエントに達するまで通常培養する。コンフルエント到達後は、上皮の形態形成を促進するため空気暴露培養を行う。

(6) ASC と線維芽細胞が上皮細胞の増殖に及ぼす影響は、線毛細胞、杯細胞および基底細胞に特異的な  $\alpha$ -tubulin IV、MU5AC および keratin14 の遺伝子発現量を RT-PCR で調べる。

(7) 気道の再生組織の枠組みとしては、生体適合性のあるポリプロピレンメッシュにコラーゲンを付加した材料を用

い、線維芽細胞とASCの2種の細胞層状配列構造（ハイブリッド3次元培養）を開発し移植用再生組織を作成する。実験動物として線維芽細胞、ASC・SVFを採取したラットを用い、頸部外切開の後に高周波メスで組織を切除・凝固することによって気管の傷害モデルを作製する。欠損部に再生組織を移植する。移植細胞は自家移植となる。

(8)傷害モデルに対して、移植した細胞によって組織修復過程における気管の再生、特に上皮の再生と血管新生について、どのような影響を受けているかを免疫組織学的に、また、走査型電子顕微鏡を用いて形態的に評価する。

(9)臨床導入するため、効率よく、ヒトより安全衛生的に移植細胞を回収し、細胞回収において酵素分散法を使用するため、酵素の濃度、反応温度、時間を評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1)ASC・SVFの多分化能の確認

脂肪組織からSVFを回収後、軟骨誘導培地(DMEM、6.25 μg/ml insulin、10 ng/ml、TGF-β1)を用い軟骨細胞への分化が確認できた。脂肪細胞誘導培地(DMEM、1% FBS、10 μM insulin、1 μM dexamethasone、0.5mM isobutyl-methylxanthine)を用い脂肪細胞への分化が確認できた。SVFを3世代の継代培養を経て脂肪組織由来幹細胞(ASC)を回収し、神経細胞誘導培地(DMEM、20%FBS、1mM β-mercaptoethanol)を用い神経細胞への分化が確認できた。また、軟骨誘導培地を用い軟骨細胞への分化、そして、脂肪細胞誘導培地を用い脂肪細胞への分化が確認できた。

##### (2)ASC・線維芽細胞と気管上皮細胞の共培養

ラットの歯肉粘膜下層から組織片培養にて線維芽細胞を単離し培養を行った。ASC

と線維芽細胞を型コラーゲン溶液に懸濁しゲル化させる。そのゲル上にラット気管内腔面よりプロテアーゼによる酵素分散法にて得られた気管上皮細胞を播種し、通常培養後、空気暴露培養を行うことができた。

##### (3)共培養における気管上皮細胞への影響(図1)

共培養10日後には線維芽細胞と共培養した際には上皮細胞は線毛細胞や杯細胞も観察され、正常気管に近い偽多列線毛上皮層が形成された。ASCと共培養した場合、偽多列線毛上皮層は形成されず、上皮細胞が厚く重層した上皮層が確認された。線維芽細胞は形態的に気管上皮細胞を正常に近く分化させ、ASCは気管上皮細胞を線維芽細胞に比べ優位に増殖させることが判明した。また、RT-PCRにてβ-tubulin IV、keratin14およびMUC5ACの遺伝子発現量を調べると、ASCはkeratin 14の発現量を増加させ、線維芽細胞はtubulinやMUC5ACの発現量を増加させた。このことから、線毛・杯細胞への分化誘導に関しては、線維芽細胞がASCよりも有効であり、上皮細胞の増殖に関してはASCが優れていることが示された。(図2)

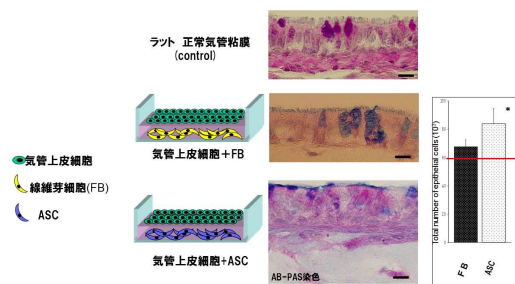


図1 線維芽細胞、ASCとの共培養における気管上皮細胞への影響

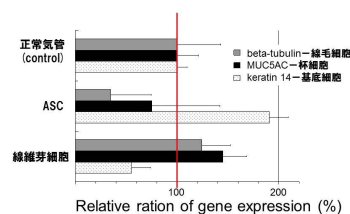


図2 線維芽細胞、ASCとの共培養における気管上皮細胞の影響(RT-PCR)

#### (4)ハイブリッド3次元培養の開発

線維芽細胞とASCの長所を同時に生かすためポリプロピレンメッシュにコラーゲンを付加した材料上にASCを含むコラーゲンを被覆し、その上に線維芽細胞を含むコラーゲンを重層することで2種の細胞層状配列構造を作製した(3D architecture of cell layered arrangement:3D-A)。その際、高い血管新生能をもつASCを新生血管を誘導しやすい下側に、高い上皮分化能をもつ線維芽細胞を上皮層側にすることとした。

#### (5)傷害モデルを作製し3D-Aを移植

実験動物として線維芽細胞、ASC・SVFを採取したラットを用い、頸部外切開の後に高周波メスで組織を切除・凝固することによって気管の傷害モデルを作製した。気管欠損部分に3D-Aを移植した。移植1、2週間後に再生気管を摘出し、組織学的・免疫組織学的に評価を行い、また、走査型電子顕微鏡を用いて形態的に評価した。移植1週間後では、3D-Aでは、線維芽細胞、ASCを単独で用いた場合よりも発達した上皮細胞層が形成され、上皮細胞の増殖を高める結果であった。同標本に関して血管新生について評価すると移植1週間後では、3D-Aの血管新生能は、ASC単独移植よりも発達している様子が観察された(図3上段)。移植2週間後には線維芽細胞、ASC、3D-A移植群に血管形成にはほとんど差がなく、3D-Aは移植の早い段階で血管新生を促進すると考えられた。また、移植2週間ではどの移植群も偽多列線毛上皮を再生していたが、走査型電子顕微鏡による観察ではASC、線維芽細胞単独の移植に比べ、3D-Aでは、発達した線毛を有する細胞がより密度高く存在していた(図3下段)。

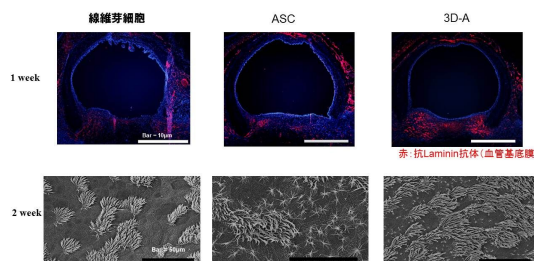


図3 3D-Aの気管への移植

#### (6)細胞群の効率的回収

線維芽細胞を移植に必要な4.8から7.5×10<sup>5</sup>/mlほど回収する場合、条件変更を試みたが、細胞の質の低下が見られ、3週間は必要となる結果であった。脂肪組織からの酵素分散法を使用しASC、SVFを回収する場合は、反応温度を高めにするこで大幅に細胞回収時間を短縮することができた。

(7)以上の結果から、線維芽細胞、ASCを単独で移植するより、その2つの細胞群を用い細胞層状配列構造を作製した3D-Aを移植することにより早期に正常形態に近く、機能的な気管上皮層を形成することが確認され、気管再生医療に大いに貢献できる結果と考えられた。

#### 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, ノ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 輝久 (SUZUKI TERUHISA)  
福島県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号：80508812

研究者番号：

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

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