

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792064

研究課題名(和文) ヒト脂肪組織幹細胞の扁平上皮癌細胞に対する影響

研究課題名(英文) The influence of human adipose-derived stem cells against Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

飛田 護邦 (Tobita, Morikuni)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10599038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、扁平上皮癌細胞に対する脂肪組織幹細胞移植の影響を検証するため、扁平上皮癌細胞及び脂肪組織幹細胞をマウス腹部皮下に移植し、癌細胞の生着及び腫瘍化を評価した。実験群として、実験群1：扁平上皮癌細胞単独移植、実験群2：扁平上皮癌細胞及び脂肪組織幹細胞を同部位へ混合移植、実験群3：それぞれの細胞を他部位(左右腹部皮下)へ移植、実験群4：扁平上皮癌を皮下移植し、さらに脂肪組織幹細胞を静脈内投与、を準備した。移植12週まで肉眼的観察及び画像撮影を実施し、腫瘍体積を各群間で比較検証した結果、脂肪組織幹細胞が扁平上皮癌細胞の生着及び腫瘍化を促進する所見は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：This research was to investigate the influence of adipose-derived stem cells (ASCs) against the tumor development of squamous cell carcinoma (SCC) cells. SCC cells with or without ASCs have been transplanted into the abdominal subcutaneous tissue of experimental animals. The experimental groups were prepared as follows; 1: SCC cells transplantation; 2: Co-transplantation of SCC cells with ASCs; 3: SCC cells and ASCs transplantation into different site; and 4: SCC cells transplantation and ASCs administration. After 12 weeks of cells injection, no significant differences for the tumor development were seen between the SCC cells transplantation and other co-transplantation groups.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：脂肪組織幹細胞 扁平上皮癌 動物実験

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞を用いた細胞治療は、様々な組織再生に応用できる可能性があり、とくに皮下脂肪中に存在する間葉系幹細胞 (Adipose-derived Stem Cells: ASCs) は、皮下脂肪組織から比較的容易にかつ低侵襲に採取でき、臨床に応用しやすい幹細胞として注目されている。これまでに ASCs は骨髄由来幹細胞と同様に、脂肪前駆細胞、軟骨芽細胞、骨芽細胞への分化能を有することが報告され (Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Tissue Eng 2001) さらに様々な成長因子等を産生することによるパラクライン効果を併せ持つことが解明されつつある (Mizuno H, Tobita M, Uysal AC, Stem Cells 2012)。

また近年、ASCs を用いた硬組織再生に関する臨床応用が報告され (Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J, et al. Int J Oral Maxillofac Surg 2009, Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, et al. J Craniofac Surg 2004) 顎顔面領域において、機能的な組織を再生させるための新しい手法になり得ると思われる。

しかしながら、臨床応用を目指す際には、組織再生能力の検証と同時に、細胞移植に対する「安全性の確保」は極めて重要であり、多角的な検討を要する。顎顔面領域、とくに口腔領域は扁平上皮癌の好発部位であることから、ヒト ASCs 移植による癌細胞への影響は重要な検証課題であるが、これまでに ASCs の扁平上皮癌細胞に対する基礎的研究は報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では ASCs 移植時に扁平上皮癌細胞を同時移植することで、ASCs が扁平上皮癌細胞の生着及び腫瘍化に対してどのように影響を及ぼすか実験動物を用いて検証した。

## 3. 研究の方法

本研究は、順天堂大学医学部研究等倫理委員会 (承認番号: 2012200) 及び順天堂大学医学部実験動物委員会 (承認番号: 240196、250132) の了承を得て実施し、遂行にはヘルシンキ宣言を遵守した。

### (1) ヒト脂肪組織幹細胞の採取・培養

形成外科疾患の手術を予定している患者のうち、術前にインフォームドコンセントが得られた患者から、手術時に発生した余剰皮下脂肪を採取した。皮下脂肪をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate

buffered saline: PBS) で洗浄し細切後、コラゲナーゼ含有 PBS にて震盪させ (45分 37℃) 組織を分解した。その後遠心分離 (120g/5分) により下層に蓄積された間質系細胞集団を回収し、100mm 培養ディッシュに  $5 \times 10^5$  細胞個を播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下にて初代培養を開始した。基本培地は 10% FBS (Fatal Bovine Serum) 及び 1% ABAM (Antibiotic-antimycotic) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を使用し、3日毎に培地交換を行い、第3継代まで培養増殖させた。

### (2) 扁平上皮癌細胞の培養

扁平上皮癌細胞株 (SCC-15: squamous cell carcinoma, tongue, human) を購入し、37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下にて培養・増殖させた。基本培地は 10% FBS 及び 1% ABAM を含む DMEM を用いた。3日毎に培地交換を行い、任意の細胞数まで増殖させた。

### (3) 移植実験

ヌードマウス (雌性、8~10週齢、n=16) 腹部皮下に扁平上皮癌細胞 ( $5 \times 10^5$  細胞個) 及び ASCs ( $1 \times 10^6$  細胞個) を 0.1cc Matrigel (#356234, Corning社) とともに移植した。

実験群として、実験群 1: 扁平上皮癌細胞単独移植する群、実験群 2: 扁平上皮癌細胞及び ASCs を同部位へ混合移植する群、実験群 3: それぞれの細胞を異なる部位 (左右腹部皮下) へ移植する群、実験群 4: 扁平上皮癌細胞を皮下移植し、さらに ASCs を生理食塩水とともに静脈内投与する群、を準備した。

### (4) 評価方法

移植後 12 週までの間、肉眼的観察及び画像撮影を実施し、1 週間毎に腫瘍径を経時的に計測した。腫瘍体積は長径 × 短径 / 2 の計算式にて算出した。

また移植 12 週後に実験動物から採取した肺組織にインディアインクを気管支部より注入し、白色となる肺転移箇所を計測した。

## 4. 研究成果

近年の再生医学において、幹細胞を用いた細胞治療の基礎研究の発展は目覚ましく、とくに間葉系幹細胞による組織再生やこれまでに確立された治療法が存在しなかった疾患への応用が強く期待されている。その中でも ASCs は皮下脂肪組織から

大量かつ安全に採取可能である点は、他の間葉系幹細胞と比較し、臨床応用上の利点を多く有する細胞と考えられている (Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Discov Med 2011)。

このような細胞を利用した治療分野の一つとして、顎顔面領域の骨組織再生があげられる。すでに諸外国では ASCs を用いた頭蓋骨や顎骨の再生に関する臨床研究等が報告され、これまでの治療法では成し得なかった質の高い自己組織による組織再生が行われるようになってきた。もちろんこれらの治療法はまだ発展途上であり、今後、治療の再現性や予知性を改善させていかななくてはならない。

しかしながら、このような幹細胞治療は既存の治療法以上の組織再生効果を有し高い有効性が期待されている反面、いかに治療の安全面に配慮し臨床研究等を進めていくかはより重要であり、慎重な検証が必要である。これまでに間葉系幹細胞の癌細胞に対する影響について、Breast cancer など様々な種類の癌細胞を用いた基礎研究が行われているが (Karnoub AE1, Dash AB, Vo AP, et al. Nature 2007) その機序については明確に理解されていない。

一方で、顎顔面領域の組織再生を目指した幹細胞治療においては、幹細胞の扁平上皮癌への影響を検証することは極めて重要である。このような背景から本研究では、ASCs と扁平上皮癌細胞を用いた動物実験計画を立案し、ASCs 移植時における扁平上皮癌の動向を検証した。

本研究結果から、実験群 1 (  $5 \times 10^5$  細胞個の扁平上皮癌細胞を単独で移植した群 ) では、癌細胞の生着が見られず、明らかな腫瘍化を確認しなかった。一方で  $1 \times 10^6$  細胞個の ASCs を様々な方法で同時に移植した実験群では、実験群 2 (扁平上皮癌細胞及び ASCs を同部位へ混合移植)、実験群 3 (それぞれの細胞を異なる部位 (左右腹部皮下) へ移植) 及び実験群 4 (扁平上皮癌を皮下移植し、さらに ASCs を生理食塩水とともに静脈内投与) のいずれにおいても肉眼的に明らかな腫瘍化を認めなかった。よって本実験で用いた ASCs 及び扁平上皮癌細胞の移植細胞数においては、ASCs には扁平上皮癌細胞の生着及び腫瘍化に対する促進効果は確認されなかった。しかしながら今回の検証は、扁平上皮癌細胞の細胞数及び ASCs の細胞数を固定した研究計画であったため、今後、異なる細胞数を用い、より移植細胞数が多い状態での検証も必要である。さらに ASCs には優れた血管新生効果があるといわれており、癌細胞を生着させた後の ASCs の影響についても臨床応用の前には十分に精査をすべきであろう。また本研究からは扁平上皮癌細胞の肺転移に対する ASCs の影響は確認されなかったが、組織学的検証を加えより詳細

な検証が必要である。

本研究では顎顔面領域への ASCs 移植の安全性に関する検証を実施するため、扁平上皮癌細胞を用いた腫瘍化の影響を実験動物を用いて評価した。本研究成果として、扁平上皮癌細胞の生着に対しては影響を示唆する所見は得られなかったが、今後さらなる基礎解析を実施し、幹細胞移植の安全性を評価していく予定である。

## 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)

[雑誌論文](計 6 件)

Tobita M, Mizuno H. Adipose-derived stem cells and periodontal tissue engineering. Int J Oral Maxillofac Implants, 査読有り, 28, 2013, pp e487-493.

Tobita M, Mizuno H. Adipose-derived Stem Cells and Platelet-Rich Plasma: The Keys to Functional Periodontal Tissue Engineering. Curr Stem Cell Res Ther, 査読有り, 8, 2013, pp 400-406.

Josh F, Tobita M, Tanaka R, Orbay H, Ogata K, Suzuki K, and Mizuno H. Concentration of PDGF-AB, BB and TGF-1 as valuable human serum parameters in adipose-derived stem cell proliferation. J Nippon Med Sch, 80, 2013, pp 140-147.

Josh F, Kobe K, Tobita M, Tanaka R, Suzuki K, Ono K, Hyakusoku H and Mizuno H. Accelerated and safe proliferation of human adipose-derived stem cells in medium supplemented with human serum. J Nippon Med Sch, 79, 2012, pp 444-452.

Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. Stem Cells Int, 2012, 2012, 461718.

Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. Stem Cells, 30, 2012, pp 804-810.

[学会発表](計 4 件)

飛田護邦. 歯周病予防対策としての歯槽骨再生治療の最前線. 第 15 回日本骨粗鬆症学, 2013 年 10 月 12 日, 大阪

田島聖土、飛田護邦、水野博司．硬組織再生における脂肪組織幹細胞と多血小板血漿混合物の相乗効果．第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会，2013 年 11 月 8 日，新潟

飛田護邦、Fonny Josh、田中里佳、緒方花澄、水野博司．新鮮ヒト血清と保存ヒト血清を用いたヒト脂肪組織幹細胞の培養時における細胞増殖能の比較検証．第 42 回日本創傷治癒学会，2012 年 12 月 5 日，札幌

飛田護邦．脂肪組織幹細胞の歯科領域への応用．第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会，2011 年 10 月 1 日，岐阜

## 6．研究組織

### ( 1 ) 研究代表者

飛田 護邦 ( TOBITA Morikuni )  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号：10599038