



Title	細胞増殖因子徐放粒子とインジェクタブルゲルを用いた脂肪由来幹細胞の筋組織内移植
Author(s)	三ツ井, 諒
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/76276">https://doi.org/10.18910/76276</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 ( 三 ッ 井 諒 )	
論文題名	細胞増殖因子徐放粒子とインジェクタブルゲルを用いた 脂肪由来幹細胞の筋組織内移植
論文内容の要旨	
<p>【背景】</p> <p>間葉系幹細胞は、脂肪や骨、筋肉などさまざまな組織に分化することができる多分化能と、周囲の組織修復を促すようなサイトカイン分泌能を持つ。幹細胞移植は、失われた組織の再生や周囲組織の機能を向上させる新たな治療法として期待されており、使用される幹細胞の中で脂肪組織由来幹細胞(ASCs)は、採取が容易で、免疫寛容性が高いため同種他家移植の供給源としても期待されている。</p> <p>幹細胞移植の治療効果を最大限引き出すには、組織修復のための幹細胞以外に、移植した細胞を局所に留めるための足場と、増殖能やサイトカイン分泌能、目的とする組織への分化を促すための細胞増殖因子(GF)を持続的に供給し、周辺の環境を整える必要がある。ゆえに、何の工夫もなく単に細胞懸濁液を組織内に注入するだけでは、移植した幹細胞が機能を果たすことなく、すぐに分散してしまう。組織内で速やかにゲル化するインジェクタブルゲル(IG)と、幹細胞の機能を向上させるGFを長期間徐放する粒子を用いることで、細胞周囲の環境を整えることができ、幹細胞移植の治療効率の向上が期待できる。</p> <p>本研究は、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)と多血小板血漿(PRP)の徐放粒子含有インジェクタブルゲル(IG+P(G))を用いることで、移植したASCsの歩留まりや治療効果に与える影響を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【材料・方法】</p> <p>(材料)</p> <p>徐放粒子は、牛骨ゼラチン（等電点5.0、平均分子量100,00、新田ゼラチン株式会社）の10%水溶液をオリーブオイル中で攪拌後にアセトンに置換して粒子化し、熱架橋後にEOG滅菌して作製した。</p> <p>IGは、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に、牛骨ゼラチン（等電点5.0、平均分子量100,00、新田ゼラチン株式会社）0.8%、アルギン酸ナトリウム（平均分子量2,300,000、株式会社キミカ）0.2%を溶解したインジェクタブルゲル溶液と、塩化鉄（Ⅲ）をPBSに5mMの濃度で溶解した塩化鉄溶液を、直前に混和することで作製した。</p> <p>PRPは、SD系ラットの血液からダブルスピン法にて作製し、2%CaCl<sub>2</sub>溶液で活性化しPRP抽出液を作製した。</p> <p>bFGFは、フィブラストスプレー®（科研製薬株式会社）を滅菌蒸留水で溶解(1μg/μl)したものを使用した。</p> <p>IG+P(G)は、徐放粒子5mgに細胞増殖因子（GF: PRP25μl、bFGF25μl）を完全に含浸させ、細胞増殖因子徐放化ゼラチン粒子(P(G))を作製し、これをIG溶液に分散させてゲル化させることで作製した。</p> <p>ASCsは、SD系ラット8週齢雄の鼠径部皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理後に遠心分離して幹細胞を単離し、事前に多分化能とフローサイトメーター（Becton Dickinson社）にて表面抗原を確認した3継代目を使用した。</p> <p>(実験1) IG+P(G)の分解反応およびGF徐放能の検証</p> <p>ゲル化させたIG+P(G)を、10μg/mlのコラゲナーゼ溶液によって分解することで、分解試験、薬剤徐放試験を行った。上清中のタンパク質濃度をBCAアッセイ（Thermo Fisher社）で、bFGFの濃度をELISA（R&amp;D Systems社）にて計測した。</p> <p>(実験2) GF(bFGF、PRP)の添加の有無がASCsに及ぼす影響</p> <p>GF(bFGF、PRP)を添加した培地で幹細胞を培養し、細胞増殖率をWST試薬（ナカライテスク）を用いた吸光度で、培地上清中のサイトカイン(HGF,VEGF)濃度をELISA（R&amp;D Systems社）で計測した。</p> <p>(実験3) 各移植媒体を用いた幹細胞移植がラット咬筋組織に及ぼす影響</p> <p>3種混合麻酔薬の腹腔内投与による全身麻酔下で、SD系ラット8週齢雌の咬筋への幹細胞他家移植を行った。注入する溶液は、PBSとIGをベースに、P(G)、徐放粒子単体、徐放粒子なしを組み合わせた6群を設定し、右側は幹細胞あり、左側は幹細胞なしとした。幹細胞にはPKH26にて細胞膜を標識した。注入後2、7、14、28日目でラットを安楽死させ、両側咬筋を摘出した。摘出した咬筋は、200μm間隔で断続的な凍結切片を合計20枚作製して切片上の移植細胞を計測した。また別の凍結を用いてHE染色、免疫組織化学染色による組織修復の評価を行った。</p>	

## 【結果】

(実験1) IG+P(G)の分解反応およびGF徐放能の検証

IG+P(G)は、コラゲナーゼ溶液中において7日程度で完全に分解され、同期間中、GFの徐放を認めた。

(実験2) GF(bFGF、PRP)の添加の有無がASCsに及ぼす影響

bFGFまたはPRPの単独添加培地は、基礎培地に比べて幹細胞の細胞増殖率と、上清内のサイトカイン濃度の有意な向上を認めた。bFGFとPRPを共に添加した培地は、基礎培地およびbFGFまたはPRPの単独添加培地よりも、幹細胞の細胞増殖率とサイトカイン濃度の有意な向上を認めた。

(実験3) 各移植媒体を用いた幹細胞移植がラット咬筋組織に及ぼす影響

切片上の平均移植細胞数は、術後2日目においてPBS群がその他の群と比較して有意に低い値を示した。その他の群間では有意な差は認められなかった。また、術後7日目においてIG+P(G)群がその他の群と比較して有意に高い数値を示し、PBS群はその他の群と比較して有意に低い値を示した。その他の群間では有意な差は認められなかった。

HE染色では、術後2日時点で軽度炎症細胞浸潤を認め、筋組織内に徐放粒子の残存を認めた。術後7日目のHE染色では、筋組織内に徐放粒子がまだ残存していた。PBS群では正常な筋組織像を認めたが、その他の群では炎症細胞浸潤が残存していた。IG+P(G)群、PBS+P(G)群は、GF徐放粒子を取り囲むように細胞の増殖を認めた。また、IG+P(G)群ではゲル注入部位周囲に一部空胞化した筋線維像を認めたが、術後14日目で改善傾向を示し、術後28日目では組織修復を認めた。また「細胞あり側」と「細胞なし側」では組織像に明らかな違いは認めなかった。

免疫組織化学染色では、術後2、7、14日目において、移植した幹細胞が残存している周囲や、GF徐放粒子の周囲に、血管内皮細胞のマーカーであるCD31の発現を認めた。また、幹細胞なし側においても、GF徐放粒子残存部ではCD31の発現を認めた。

免疫蛍光染色では、術後14日目でのIG+P(G)群細胞あり側の、移植したASCsの残存部位に、筋芽細胞のマーカーであるMyo-Dの発現を認めた。細胞なし側の注入相当部には、Myo-Dの発現は認められなかった。またIG+P(P)群細胞あり側の、移植したASCsの残存部位に、Myo-Dの発現は認められず、細胞なし側の注入相当部にも、Myo-Dの発現は認められなかった。PBS+P(G)群細胞あり側は、IG+P(G)群と同様、移植したASCsの残存部位に、Myo-Dの発現を認めた。術後28日目でのIG+P(G)群およびPBS+P(G)群においても、移植したASCsの残存部位に、Myo-Dの発現を認めた。

## 【考察】

bFGFとPRP抽出液を取り込んだ徐放粒子は、IGに添加された状態でもコラゲナーゼ溶液中で持続的に分解反応を示し、7日程度の分解反応および含浸させたbFGFの徐放能を示した。従来の合成高分子を利用したIGと比べて分解速度が速いのは、架橋の主体であるゼラチンと鉄イオンが組織内のコラゲナーゼによって分解されたことが原因と考えられる。

bFGFやPRP中のPDGF-BB等がASCsの細胞増殖能やサイトカイン分泌能に影響を与えることはすでに報告されているが、bFGFとPRPを共に添加することで、細胞増殖能やHGF、VEGFなどのサイトカイン分泌能といった幹細胞がもつ機能を、さらに向上させるということが明らかとなった。

動物実験では、IGは幹細胞の歩留まりを向上し、P(G)はGFを徐放して幹細胞のサイトカイン分泌能を向上することから、IG+P(G)は、幹細胞の体内生存率を高めることにに関して有用であることが示唆された。免疫組織化学染色では、注入したゲル周囲にCD31陽性細胞が多くみられたことから、幹細胞が分泌したHGFやVEGF、粒子による持続的なGFの徐放によって、血管新生が促されていたことが示唆された。また免疫蛍光染色では、IG+P(G)群、PBS+P(G)の幹細胞あり側のみ、幹細胞と同部位にMyo-D発現を認めたことから、徐放されたPRPに含まれるPDGF-BBやTGF- $\beta$ 1、HGFが筋組織内における幹細胞の筋分化を促した可能性が示唆された。

幹細胞注入によって筋組織の再生が図れるようになれば、筋肉損傷に対する画期的な治療法になると考えられ、口腔顎顔面領域においては鼻咽腔閉鎖不全症に対する治療などへの応用が期待できる。本研究では、筋組織の再生に関して、機能評価ができていないが、今後さらなる研究で検討していきたい。

## 【結語】

細胞増殖因子徐放粒子含有インジェクタブルゲルは、細胞増殖因子の持続的な供給と、移植細胞の歩留まりを向上させることで、筋組織内での移植幹細胞の体内生存率を高め、注入した組織の血管新生の促し、移植した幹細胞が筋芽細胞に分化するのを促すことが示唆された。しかし移植した幹細胞が、将来的に成熟した筋線維へ分化し、筋力を増強できるのかについては、機能評価を含めたさらなる検討が必要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 三 ツ 井 諒 )			
	(職) 氏 名		
論文審査担当者	主 査	教授	古郷 幹彦
	副 査	教授	野田 健司
	副 査	准教授	北村 正博
	副 査	講師	佐々木 淳一
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>本研究は、注入による脂肪由来幹細胞移植の治療効率の向上を目的とし、細胞増殖因子徐放粒子を添加したインジェクタブルゲルが、筋組織内に移植された幹細胞の生存率や周囲組織に及ぼす影響を検討したものである。</p> <p>その結果、細胞増殖因子徐放粒子を添加したインジェクタブルゲルが、移植幹細胞の体内生存率を高め、移植細胞の筋芽細胞への分化と、周囲組織の血管新生を促したことを示した。</p> <p>この結果は、注入による細胞移植治療を行う際に、細胞増殖因子徐放粒子を添加したインジェクタブルゲルが有効であることを示した点で有意義であり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>			