The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://doi.org/10.18910/76276
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

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

2020 年 3 月

大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻
顎口腔病因病態制御学講座
口腔外科学第一教室
三ツ井　諒

緒言

間葉系幹細胞（以下、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[1-3]と、周囲の組織修復を促すようなサイトカインの分泌能[2,4]を持ち、失われた組織に対する再生が期待できる。幹細胞移植は、幹細胞を組織内に移植することで、失われた組織の再生や、周囲組織の機能を向上させることを期待した新たな治療法[4,5]である。幹細胞は骨髄や脂肪などさまざまな組織から単離することが可能であるが、中でも脂肪組織由来間葉系幹細胞（以下、ASCs）は採取が容易であり、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[4,5]。

口腔領域においては、辺縁性歯周炎や顎骨腫瘍切除後の骨欠損に対するASCs移植[6,7]が報告されており、本邦では歯周炎に対するASCs移植の臨床研究[8]も行われている。しかし、いずれも骨の再生を目指したもので、筋への分化・再生の研究は進んでいない。ASCsが筋肉への分化能を有するのであれば、軟口蓋に存在する筋肉の機能不全によって生じる鼻咽腔閉鎖不全症など、口腔領域における筋組織の疾患に対する再生も期待できる。

幹細胞移植には細胞懸濁液を局所に注入する方法[9]、細胞シートにして組織に貼り付ける方法[10,11]、細胞を足場材料に播種して組織内に埋入する方法[12,13]、点滴で全身投与する方法[14]などがある。しかし、細胞シートや足場材料を組織内に留置する方法は、材料が露出する恐れがあるため、骨格筋などの薄い組織や脆弱な組織に使用することは困難である。また、全身投与は局所的な組織修復を期待するには極めて非効率である。それに対して、

細胞懸濁液を局所に注入する方法は、これらの問題点を解決できる汎用性の高い移植方法であり、広く利用されている[9,15,16]。

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、幹細胞が持つ増殖能やサイトカインの分泌能、目的とする組織への分化を促すための細胞増殖因子（以下、GF）を持続的に供給し、周辺の環境を整える必要がある[17]。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[18,19]。

そこで注入法で移植した幹細胞を局所に留めるために、組織内で速やかにゲル化するインジェクタブルゲル（以下、IG）が開発された[20,21]。従来の IG は合成高分子の共有結合を用いた強固な架橋のため、生体内でのゲルの分解消失期間が 3 週間以上と長く、ゲル内部での細胞の生存や増殖を妨げるという問題があった[22-24]。一方、その後開発された新しい IG は、生体親和性の高いゼラチンとアルギン酸を鉄イオンで架橋させてゲル化させるため、生体内での分解が 1 週間程度と早く、細胞生存率が高いという特徴がある[25]。

私はさらに細胞生存率の高い IG によって局所に留めた幹細胞に GF を供給することで、幹細胞移植の治療効率が向上できると考えた。しかし、単に IG に GF を添加するだけでは GF はすぐ分散、消失するため、GF を幹細胞に長期的に供給するための工夫が必要である。薬剤を取り込み生体内で分解されていく中で徐々に放出する材料には、ゼラチン[26-28]やポリエチレングリコール[29]を原料としたものがあるが、中でも等電点 5.0 のゼラチンを

粒子化した徐放粒子は塩基性線維芽細胞増殖因子（basic Fibroblast Growth Factor: bFGF）と多血小板血漿（Platelet Rich Plasma: PRP）の良好な徐放能を示す[27]ため、IG に添加する GF の徐放媒体として期待できる。

本研究は、採取が容易で他家移植も期待できる ASCs の移植媒体として、GF 徐放粒子を添加した IG を用いて、ASCs の歩留まりや幹細胞移植が周囲組織に与える影響を明らかにすることを目的とした。

方法

本研究における実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定（動物実験委員会承認番号：動歯-30-020-0）と動物の愛護および管理に関する法律を遵守して行った。

1．材料

1-1）徐放粒子の作製

徐放粒子は、田畑らの方法[28]を一部改変して作製した。具体的には、40℃の恒温槽で温めたフラスコ内でオリーブオイル（富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本）600ml と 10%の牛骨ゼラチン水溶液 30 ml（等電点 5.0、平均分子量 100,000）（新田ゼラチン株式会社、大阪、日本）を混和し、300 rpm にて 1 時間攪拌した。攪拌を継続しながらフラスコを 4℃まで冷却し、4℃のアセトン 200 ml を添加してさらに 30 分間攪拌し、ファルコンチューブに分注した。4℃、5000 rpm にて 10 分間遠心分離し、オリーブオイルとアセトンの混合上清を廃棄し、ペレットになったゼラチンの粒子をアセトンで再懸濁する作業を二度繰り返した。アセトンで懸濁された粒子の溶液を、20、32、50、100、300 μm のマイクロシーブ（大阪ケミカル株式会社、大阪、日本）に通してふるいにかけ、粒径が 32-50 μm の粒子のみを採取した。真空乾燥装置（AURORA DN-30: 佐藤真空機械工業、埼玉、日本）を用いて 160℃、72 時間の熱架橋を行った。エッペンチューブに分注した粒子を EOG（ethylene oxide gas）滅菌し、残留したガスは室温、72 時間、吸引脱気によって除去した。

1-2）インジェクタブルゲル（IG）の作製

IG は、穴水らの方法 [25] を一部改変して作製した。具体的には、リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline: PBS）に、牛骨ゼラチン（等電点 5.0、平均分子量 100,000）（新田ゼラチン株式会社）0.8 %、アルギン酸（平均分子量 2,300,000）（株式会社キミカ、千葉、日本）0.2 %を溶解し、インジェクタブルゲル溶液（IG 溶液）を作製した。次に塩化鉄（III）を PBS に 5 mM の濃度で混和して塩化鉄溶液を作製し、IG 溶液とこの塩化鉄溶液を等量混和してインジェクタブルゲル（IG）を作製した。動物実験で使用する際は 2 つの溶液を等量混和することができる二液混和型シリンジ（ニプロ株式会社、大阪、日本）を使用した。

1-3）活性化 PRP 溶液の作製

生物学的製剤基準血液保存液 A 液（ACD-A 液®）（テルモ株式会社、東京、日本）をあらかじめ 1 ml 含んだ 10 ml シリンジを用いて、Sprague-Dawley 系成獣ラット 8 週齢雄（体重 170~190 g: 日本エスエルシー株式会社、静岡、日本）の腹腔内門脈から 10 ml の採血を行った。4℃、800 G にて 10 分間遠心分離し、血漿と Buffy Coat のみを採取した。4℃、2100 G にて 10 分間遠心分離し、合計量が 1.4 ml になるように上清の血漿のみ除去し、PRP 原液を作製した。その後、松井らの方法 [27] に準じて PRP 原液を活性化させた。具体的には、PRP 原液に 2 %塩化カルシウム溶液 0.2 ml を混和し、37℃、1 時間インキュベートして活性化させ、活性化 PRP 溶液を採取した。

1-4）bFGF 溶液の作製

bFGF 溶液は、トラフェルミン（遺伝子組み換え）噴霧剤（フィブラストスプレー®）（科研製薬株式会社、東京、日本）500 μg を、注射用滅菌水（大塚製薬、東京、日本）を用い、1 μg/μl の濃度で溶解して作製した。

1-5）GF 徐放粒子添加 IG（IG+P(G)）の作製

徐放粒子 5 mg に、GF として活性化 PRP 溶液、bFGF 溶液を 25 μl ずつ滴下した。4℃、5000 rpm にて 5 分間遠心分離し、粒子と溶液をなじませたのち、4℃、24 時間インキュベートして、完全に粒子内に溶液を含浸させた。徐放粒子に薬液が完全に取り込まれたものを、細胞増殖因子徐放粒子（P(G)）とした。

P(G)を IG 溶液 200 μl に分散させ、合計量 250 μl とした。塩化鉄溶液 250 μl と混和して、500 μl の GF 徐放粒子添加 IG（IG+P(G)）を作製した。

2．細胞

2-1）ASCs の単離

Sprague-Dawley 系成獣ラット 8 週齢雄（体重 170g~190g: 日本エスエルシー株式会社）に 3 種混合麻酔薬（ミダゾラム（ドルミカム 5 mg/ml: アステラス製薬、東京、日本）2 mg/kg、メデトミジン（ドミトール 1 mg/ml: 日本全薬工業、福島、日本）0.375 mg/kg、ブトルファ

ノール（ベトルファール 5 mg/ml: Meiji Seika ファルマ株式会社、東京、日本）2.5 mg/kg）の腹腔内投与による全身麻酔下で No.15 メスにて鼠径部に皮切を加え、ハサミにて鼠径部皮下脂肪を採取した。

採取した脂肪組織を 1%Penicillin-Streptomycin 添加 PBS にて二度洗浄し、ハサミにて細かく刻んだ。これを 0.25%コラゲナーゼ（富士フィルム和光純薬株式会社）・PBS の中で 40℃、1 時間振盪し分解した後、10% fetal bovine serum（FBS）添加、および 1%Penicillin-Streptomycin 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）（以下、基礎培地）にて中和し、1500 rpm にて 10 分間遠心分離した。浮遊した脂肪組織を含む上清溶液を吸引除去し、細胞ペレットを 15 ml の基礎培地で懸濁した。幹細胞と血球成分を分離するため、密度が 1.083 g/ml に調節された Histopaque-1083®（Sigma Aldrich、ミズーリ、アメリカ合衆国）15 ml の上に細胞懸濁液を浮かべて段階的に加速していき、最終速度は 1800 rpm にて 20 分間遠心分離を行った。細胞層のみを採取、基礎培地で再懸濁し、1500 rpm にて 5 分間の遠心分離と細胞ペレットの再懸濁を二度行った。40 μm のフィルターに通した細胞を 0 継代 ASCs として、10 cm Dish に播種した。基礎培地は 3 日ごとに交換した。2 継代目 ASCs を、10% Dimethyl sulfoxide（DMSO）、20%FBS を添加した基礎培地で凍結保管した。細胞を融解、再播種して培養し、80%コンフルエントとなった 3 継代目 ASCs を 0.25% トリプシン- ethylenediaminetetraacetic acid（EDTA）溶液で回収し、実験に使用した。

2-2）ASCs の多分化能の検証

ASCs を脂肪、骨、軟骨の 3 種類へ分化誘導を行い、多分化能を有するかどうかの検証を行った。脂肪分化誘導、骨分化誘導は 6 well dish に 1.0×10^5 cells/well で播種した通常の培養、軟骨分化誘導は 2.5×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を 15 ml チューブに 1 ml 加えて遠心分離したペレット培養にて行った。各分化誘導培地または基礎培地に変更し、3 日ごとに培地交換して、3 週間培養した。

脂肪分化誘導培地は、基礎培地にデキサメタゾン（1 μM）、イソブチルメチルキサンチン（500 μM）、インシュリン（10 μM）、およびインドメタシン（200 μM）を添加して作製した。

骨分化培地は、基礎培地にデキサメタゾン（100 nM）、L-アスコルビン 2 リン酸（100 μM）、および β グリセロリン酸（10 mM）を添加して作製した。

軟骨分化培地は、基礎培地にデキサメタゾン（100 nM）、TGF-β3（10 ng/ml）、L-アスコルビン 2 リン酸（200 μM）、ITS+premix（BD biosciences、ニュージャージー、アメリカ合衆国）（1 vol%）、およびピルビン酸（2 mM）を添加して作製した。

各分化誘導培地または基礎培地で 3 週間培養した後、脂肪分化誘導はオイルレッド O 染色、骨分化誘導はアリザリンレッド染色、軟骨分化培地はアルシアンブルー染色にて染色を行った。基礎培地で培養した群と比較したところ、分化誘導培地群にのみ染色を認めたことから、3 継代目 ASCs は、脂肪、骨、軟骨への分化能を認め、多分化能を示した。（図 1）

2-3）ASCs のフローサイトメトリーの検証

ASCs の表面抗原を確認するため、フローサイトメーター（BD biosciences）を用いて検証を行った。使用した抗体は、抗ラット CD29 アメリカンハムスターモノクローナル抗体-FITC（10 μg/ml）、抗ラット CD45 マウスモノクローナル抗体-ALEXA FLUOR® 647（2.5 μg/ml）、抗ラット CD90 マウスモノクローナル抗体-FITC（0.6 μg/ml）（Biolegend、カリフォルニア、アメリカ合衆国）、抗ラット CD34 ラビットポリクローナル抗体-FITC（10 μg/ml）、抗ラット CD73 ラビットポリクローナル抗体- ALEXA FLUOR® 647（10 μg/ml）、抗ラット CD105 ラビットポリクローナル抗体- ALEXA FLUOR® 647（10 μg/ml）（Bioss Antibodies、マサチューセッツ、アメリカ合衆国）であり、イムノブロック（ケーエーシー、京都、日本）で希釈して使用した。コントロールはイムノブロックのみとした。

1.0×10^{6} cells/ml の濃度で PBS に懸濁し、1 ml ずつエッペンチューブに分注し、200 G で遠心分離を行った。上清を吸引し、希釈した抗体溶液 100 μl で懸濁して 1 時間静置した後、PBS を加えて 400G で遠心分離を二度行った。1.0×10^{6} cells/ml の濃度で PBS に懸濁し、フローサイトメーター（BD biosciences）を用いて検証した。

フローサイトメトリーの結果、3 継代目 ASCs は、造血系マーカーである CD34,45 が陰性、間葉系マーカーである CD29,73,90,105 で陽性であり、表面抗原としては間葉系幹細胞であることが明らかとなった。（図 2）

3. 研究

3-1）IG+P(G)の分解反応および GF 徐放能の検証

この検証は、ゲル化させた IG+P(G)を PBS 中に浸漬して、架橋に関与していないゼラチンや徐放粒子の内部に取り込まれていない GF を回収した後、コラゲナーゼ溶液中に浸漬して分解試験を行う、松井らの方法[27]を一部改変して行った。具体的には、ゲル化させた 500 μl の IG+P(G)を 500 μl の PBS 中に浸漬した。3 時間後に上清を回収し、回収した上清と等量の PBS を添加した。6 時間後にも同様に回収と添加を行った。24 時間後に上清を回収し、以後は添加する溶液を PBS からコラゲナーゼ D（Sigma Aldrich）（10 μg/ml）・PBS に変更し、9 日間繰り返し試験を行った。コラゲナーゼ D・PBS に変更してからは、1、3、6、12、24、36、48、72、120、168、216 時間で上清を回収し、採取した上清はそれぞれサンプルとして 4℃で保管した。1 度の検証で行う試料数は 5 とし、同じ実験を 3 度行った。

これらのサンプル中に含まれるゼラチンの濃度を BCA タンパク質アッセイ（Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、アメリカ）にて、また bFGF の濃度を Enzyme-linked immuno-sorbent assay（ELISA）キット（R&D systems、ミネソタ、アメリカ合衆国）にて測定した。全てのサンプルに含まれるゼラチンおよび bFGF の濃度から、それぞれの量を計測し、その合計を 100%分解量、100%徐放量とした。各サンプルに含まれるゼラチンおよび bFGF の量を計測することで、PBS またはコラゲナーゼ D・PBS に浸漬してから回収するまでに分解された IG+P(G)の割合、徐放された GF の割合を調べた。

3-2）GF 添加の有無が ASCs に及ぼす影響

3 継代目 ASCs を 3.0×10^4 cells/ml で基礎培地に懸濁した。96 ウェルプレートを使用して、64 ウェルに対して 100 µl ずつ細胞懸濁液を分注し、細胞を播種した。37℃、5%二酸化炭素環境下で 2 時間静置した。その後 16 ウェルごとに、基礎培地（コントロール群）、bFGF 溶液（1 vol%）単独添加培地（bFGF 群）、活性化 PRP 溶液（1 vol%）単独添加培地（PRP 群）、bFGF 溶液（1 vol%）+活性化 PRP 溶液（1 vol%）添加培地（bFGF+PRP 群）の 4 種類に培地を交換し、37℃、5%二酸化炭素環境下で ASCs を 48 時間培養した。

GF 添加の有無が、ASCs の細胞増殖能に及ぼす影響を検証するため、全てのウェルの上清を回収し、ウェルに残った細胞に対して WST 試薬（10 vol%）（ナカライテスク、京都、日本）添加基礎培地を用いて 2 時間呈色反応を行い、マイクロプレートリーダー（Thermo Fisher Scientific）を用いて検査波長 450 nm、対照波長 630 nm の吸光度（OD）を測定した。

また GF 添加の有無が、ASCs のサイトカイン分泌能に及ぼす影響を検証するため、採取した全ての上清に対して、ELISA キット（R&D systems）を用い、Hepatocyte growth factor（HGF）および Vascular endothelial growth factor（VEGF）の濃度を測定した。GF（bFGF、PRP）添加培地にもともと含まれていた HGF、VEGF の量を検証するため、細胞を増殖していない GF 添加培地に対しても、ELISA キットで HGF および VEGF の濃度を測定した。

3-3）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

実験には Sprague-Dawley 系成獣ラット 8 週齢雌（体重 170-190g：日本エスエルシー株式会社）を 96 匹用いた。実験動物は温度 20-22℃、湿度 40-50%、12 時間ごとの明期、暗期に管理された環境下で、水流ケージ内で飼育され、飼料および飲料水は十分に与えられた。

3 種混合麻酔薬の腹腔内投与による全身麻酔下で、IG+P(G)による注入法を用いたラット咬筋への幹細胞同種他家移植を行った。

注入する溶液は、計 6 群とし、IG をベースとした GF 徐放粒子群（IG+P(G)群）（n=16）の他に、コントロールとして GF の代わりに PBS を含侵させた徐放粒子 P(P)群（IG+P(P)群）（n=16）、および徐放粒子なし群（IG 群）（n=16）の 2 群と、PBS をベースとした GF 徐放粒子群（PBS+P(G)群）（n=16）、PBS 徐放粒子群（PBS+P(P)群）（n=16）、徐放粒子なし群（PBS 群）（n=16）の 3 群を設定した。注入点は、再現性を担保するために、眼窩と耳孔の中心と下顎角を結んだ中点とした。注入には 2 液混和型シリンジを用いて、25 G の針を使用した。左右とも同じ溶液を 500 μl ずつ注入し、右側を「幹細胞あり側」、左側を「幹細胞なし側」とした。穴水らの方法[25]と同様に、3 継代目 ASCs を PKH26（Sigma Aldrich）にて標識した後、5.0×10^5 cells を、500 μl の PBS または 250 μl の IG 溶液で懸濁した。

咬筋への幹細胞移植後 2、7、14、28 日目で、イソフルラン（富士フィルム和光純薬工業株式会社）吸入麻酔によりラットを安楽死させ、両側咬筋を摘出した。

3-3-1）幹細胞移植前後の体重変化の検証

術後 28 日目に安楽死させる予定の 6 群のラット（各 n=4）計 24 匹に対して、術前、術後 7、14、21、28 日目に体重測定を行い、術前からの体重変化量を測定した。

3-3-2）組織内に残存した移植幹細胞数の検証

摘出した咬筋を 4%パラホルムアルデヒド溶液（富士フィルム和光純薬株式会社）で固定し、段階的にスクロース溶液に置換した。咬筋の筋線維走行を横断するように 3 mm 間隔で分割し、注入点に近い 4 つの標本をティシューテック O.C.T.コンパウンド(サクラファインテック、東京、日本)で包埋し、凍結ブロックを作製した。クレストコートガラス®（CRE-03、松浪硝子工業、大阪、日本）を用いて 200 μm 間隔で 8 μm の薄切切片を 5 枚ずつ作製し、合計 20 枚の断続的な凍結切片を作製した。

20 枚の凍結切片を蛍光顕微鏡（BZ-X700: KEYENCE、大阪、日本）を用いて観察し、撮影を行った。撮影時は TRITC 用フィルター（励起波長 545 nm、吸収波長 605 nm）を使用し、倍率 40 倍、露光時間は 0.5s の統一条件下で撮影した。40 倍ではすべてが映らない切片に関しては、画像構築（BZ-X analyzer: KEYENCE）を用いて撮影した。計測には画像処理ソフト（ImageJ: National Institutes of Health、メリーランド、アメリカ合衆国）を用いた。

3-3-3）組織学的検討

a）Hematoxylin-Eosin 染色（HE 染色）

3-2 で作製した凍結切片の HE 染色を行い、筋腹、筋線維など筋線維の形態学的評価、筋組織内に残存している IG や GF 徐放粒子とその周辺の形態学的評価、炎症細胞浸潤程度の評価など、組織学的な評価を行った。

b）免疫組織化学染色

別の凍結切片を用いて免疫組織学的検討を行い、血管内皮細胞のマーカーである CD31 の発現を観察した。まず切片を 0.3%過酸化水素水添加メタノールにより内因性ペルオキシダーゼ活性のブロッキングを行った。PBS で洗浄し、イムノブロックを用いて室温下で 20 分ブロッキングし、抗ラット CD31 ラビットポリクローナル抗体（Bioss Antibodies）をイムノブロックで 200 倍希釈し、各切片に滴下して 4℃で一晩静置した。PBS で洗浄し、ビオチン標識抗ラビット IgG 抗体（VECTOR、カリフォルニア、アメリカ合衆国）をイムノブロックで 200 倍希釈し、各切片に滴下して室温下で 1 時間静置した。PBS で洗浄し、VECTASTAIN Elite ABC®（VECTOR）キット内の A 液（Avidin 溶液）50 µl と B 液（Biotinylated HRP 溶液）50 µl を PBS 5 ml に混和し、各切片に滴下して室温下で 1 時間静置した。PBS で洗浄し、DAB 基質（Dako、カリフォルニア、アメリカ合衆国）にて発色させ、ヘマトキシリン溶液で対比染色を行った。免疫染色の切片は光学顕微鏡を用いて観察し、撮影を行った。

c）免疫蛍光染色

別の凍結切片を用いて、免疫蛍光染色を行い、筋芽細胞のマーカーである Myo-D の発現を確認した。まず切片を PBS で洗浄し、イムノブロックを用いて室温下で 20 分ブロッキングし、抗ラット Myo-D ラビットポリクローナル抗体（Bioss Antibodies）をイムノブロックで 100 倍希釈し、各切片に滴下して 4℃で一晩静置した。PBS で洗浄し、抗ラビット IgG 抗体- ALEXA FLUOR® 488（Thermo Fisher Scientific）をイムノブロックで 1000 倍希釈し、各切片に滴下して室温下で 1 時間静置した。PBS で洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）入り封入材（VECTASHIELD H-1500)（VECTOR）を各組織に滴下して 30 分静置した。免疫染色の切片は蛍光顕微鏡を用いて観察し、撮影を行った。撮影時は TRITC 用フィルター（励起波長 545 nm、吸収波長 605 nm）、green fluorescent protein（GFP）用フィルター（励起波長 470 nm、吸収波長 525 nm）および DAPI 用フィルター（励起波長 360 nm、吸収波長 460 nm）を使用し、倍率 200 倍で撮影した。

4. 統計学的解析

実験結果は平均値±標準偏差（S.D.） の形で表示した。全ての統計分析には Statcel4（オーエムエス出版、東京、日本）を用い、統計学的に比較検討した。研究 2 の「GF 添加の有無が ASCs に及ぼす影響」および研究 3 の「動物実験における各群の切片上平均細胞数の比較」といった、独立した多群の差の検定には Bartlett test と single-factor ANOVA にて分散分析を行い、群間比較は Tukey-Kramer 法を用いて post hoc test を行った。独立した 2 群の差の検定は、Mann-Whitney's U test を用いて統計学的解析を行った。なお、各検定の有意水準は 5%または 1%とした。

結果

3-1）IG+P(G)の分解反応および GF 徐放能の検証

PBS を加えるだけで溶出してきた、架橋に関与しないゼラチンは全体の 25%程度であり、コラゲナーゼ D・PBS に変更して 1 日（24 時間）で全体の約 70%が分解された。IG+P(G)はコラゲナーゼ D・PBS 中で 7 日程度で完全に分解された。（図 3）

PBS を加えるだけで溶出してきた、粒子に取り込まれていない bFGF は全体の 25%程度であり、コラゲナーゼ D・PBS に変更して 1 日（24 時間）で全体の約 75%が放出された。IG+P(G)に含まれる bFGF はコラゲナーゼ D・PBS 中で 7 日程度徐放された。（図 4）

3-2）GF 添加の有無が ASCs に及ぼす影響

基礎培地に bFGF や PRP を単独で添加した群は、基礎培地のみのコントロール群と比較して、吸光度が有意に高い値を示した。また、bFGF と PRP を共に添加した群は、コントロール群や bFGF 群、PRP 群と比較して、吸光度が有意に高い値を示した。（図 5）

bFGF 群や PRP 群は、コントロール群と比較して、培養上清内に含まれる HGF、VEGF の濃度が有意に高い値を示した。また、bFGF＋PRP 群は、コントロール群や bFGF 群、PRP 群と比較して、培養上清内に含まれる HGF、VEGF の濃度が有意に高い値を示した。培地にもともと含まれていた GF の濃度は、PRP 群の HGF が 72 pg/ml、VEGF が 15 pg/ml 未満、PRP+bFGF 群の HGF が 117 pg/ml、VEGF が 15 pg/ml 未満であった。（図 6、図 7）

3-3）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

3-3-1）幹細胞移植後の平均体重変化量の検証

各測定日における、体重変化量は各群で有意な差は認められなかった。（図 8）

3-3-2）組織内に残存した移植幹細胞数の検証

術後 2 日目時点での切片上の平均細胞数は、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。（図 9）

術後 7 日目時点での切片上の平均細胞数は、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た。また 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。（図 10）

術後 2 日目と 7 日目の切片上の平均細胞数の比較において、IG+P(G)群では細胞数の増加傾向を示したが、有意な差は認められなかった。IG 群、PBS 群では有意に減少し、IG+P(P)群、PBS+P(G)群、PBS+P(P)群では有意な差は認められなかった。（図 11）

3-3-3）組織学的検討

a）HE 染色

術後 2 日目の HE 染色では、軽度の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。（図 12-A）

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。（図 12-B）

ラット咬筋に注入した IG+P(G)群、IG+P(P)群の経時的変化では、術後 2、7 日目では徐放粒子はまだ残存していたが、術後 14 日目で消失していた。術後 7 日目において 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」では術後 2、7 日での炎症所見や術後 14、28 日での組織修復の傾向に明らかな違いは認めなかった。（図 13）

b）免疫組織化学染色

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。（図 14）

c）免疫蛍光染色

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。（図 15）

術後 14 日目での 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。（図 16）

考察

本研究は、GF 徐放粒子を添加した IG を幹細胞移植に応用し、移植後の幹細胞の歩留まりや移植治療効果の検証を行ったものである。

幹細胞移植には自家移植と他家移植があり、ASCs のように組織採取が容易で採取部位への侵襲が少ないものに対しては、自家移植を選択されることが多い[30,31]。一方 ASCs は、免疫寛容性を持つため他家移植での実験も多数行われており[4,5,32]、他家移植を目的とした ASCs 製剤による第I／II相臨床試験も行われている[33]。このことから、より臨床化へ応用しやすい他家移植を選択している。

bFGF 溶液と活性化 PRP 溶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早いのは、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。アルギン酸と鉄イオンによってできるアルギン酸塩は、それを分解するためのアルギン酸リアーゼが生体内で合成されることはないため、マクロファージなどの貪食細胞によって予測できない速度で分解される[34]とされている。動物実験では術後 1 か月時点において残存するアルギン酸塩による炎症所見は認められていないことから、組織内で親和性を保ちながら最終的には分解されることが予想される。

今回の実験では、PRP の徐放能は検証できていないが、松井らの報告[27]によると、bFGF と

PRP を含浸させた徐放粒子が、コラゲナーゼ溶液中での分解反応と bFGF、PRP の徐放能が同じカーブを描いていたことから、IG に添加された状態でも、PRP が分解反応や bFGF の徐放能と同じような徐放カーブを描くことが予想される。

GF の添加の有無が ASCs の細胞増殖能やサイトカイン分泌能に与える影響に関しては、コントロールである基礎培地群に比べ、bFGF 溶液や活性化 PRP 溶液を培地に加えた群の方が細胞増殖能、HGF、VEGF のサイトカイン分泌能を有意に向上させる結果となった。bFGF と PRP 溶液を共に添加した群は、単独添加群よりもさらに増殖能や、HGF、VEGF のサイトカイン分泌能の向上を認めた。これは、bFGF や PRP に含まれる Platelet Derived Growth Factor（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が報告[26,35]されており、過去の報告と同じような傾向を示したことになる。今回の実験では、ASCs に bFGF や PRP などの GF を単独で添加した群、共に添加した群を比較することで、単独添加群よりもどちらも添加した方が細胞機能を向上させる働きが期待できることが明らかとなった。

研究 3 では、IG、PBS をベースとして、GF 徐放粒子あり群、PBS 徐放粒子あり群、徐放粒子なし群の 3 群を設け、合計 6 群で比較検討を行った。各群において、体重変化量の有意な差が認められなかったことから、IG や徐放粒子を注入の媒体として使用することで、咬筋組織への影響が生じ食事量低下や体重減少等を引き起こす、という可能性は否定的であったと考えられる。

組織内に残存した移植細胞数の検証では、術後 2 日の平均移植細胞数においては PBS 単独群にのみ残存細胞が低下し、その他の群間では有意な差は認めなかったことから、IG または徐放粒子によって細胞の歩留まりが向上したことが示唆された。一方術後 7 日の平均細胞数において、IG+P(G)群が他群よりも有意に残存し、PBS 群は他群よりも有意に減少した以外には、各群間に有意な差を認めなかったことから、IG と GF 徐放粒子の組み合わせにより移植した幹細胞の歩留まりがより改善した可能性や、細胞増殖が促された可能性が示唆される。術後 2 日から 7 日における細胞残存数の推移では、IG+P(G)群のみ有意差はないものの細胞数の増加傾向を認め、歩留まり向上に関して有用な移植媒体であることが示唆された。

HE 染色による組織学的検討では、術後 7 日時点でも徐放粒子が筋組織内に残存していたため、筋組織内のコラゲナーゼ濃度が *in vitro* の実験系よりも低く、分解反応が遅延した可能性が示唆される。しかし、術後 14 日では筋組織内に徐放粒子は認められなかったため、7 日目以降も組織内で分解反応が進んでいたと考えられる。また IG+P(G)群の術後 7 日では筋腹の中央が空胞化し、挫滅している像を認めるが、術後 14 日には同部位に改善傾向を認め、術後 28 日には組織修復がみられた。

免疫組織化学染色では、術後 2 日目、7 日目のいずれにおいても、幹細胞の残存部周囲及び GF 徐放粒子の残存部周辺に血管内皮細胞のマーカーである CD31 の発現を認めた。これは幹細胞が分泌した HGF や VEGF などのサイトカイン、GF 徐放粒子が徐放した PRP や

bFGF などの GF によって血管新生が亢進したことが示唆される。また、幹細胞なし側でも GF 徐放粒子が含まれている群では CD31 の発現を強く認めたことから、GF の徐放が、移植幹細胞のサイトカイン分泌能よりも、周囲の組織修復能や血管新生能に強く作用した可能性が示された。

また免疫蛍光染色では、術後 14 日目において、IG+P(G)群および PBS+P(G)群の ASCs 残存部位に一致して幼若な筋芽細胞のマーカーである Myo-D の発現を認めた。これは、移植した ASCs が、組織内で筋芽細胞へ分化した可能性を示唆している。

また細胞なし側では、GF 徐放粒子の注入相当部においても Myo-D の発現が認められなかった。また GF を添加していない群では、幹細胞の有無に関わらず Myo-D の発現は認められなかった。したがって筋組織内に移植した幹細胞が筋芽細胞へ分化するには、GF が必要であることが示唆された。PRP は様々な GF が混合されており [27]、中に含まれる PDGF-BB、Transforming Growth Factor-β_1（TGF-β_1）、HGF は間葉系幹細胞の筋原生分化を促すという報告 [36-38] もあるが、PDGF-BB は骨、TGF-β_1 は軟骨などほかの様々な組織へ分化誘導するという報告 [39,40] もあり、PRP がどのような挙動を示すのか統一した見解は得られていない。一方、筋分化誘導培地の環境下で、間葉系幹細胞と筋芽細胞を共培養することによって、幹細胞の筋芽細胞への分化がより促されたという報告 [38,41,42] もある。したがって、徐放された PRP に含まれる PDGF-BB や TGF-β_1、HGF の働きと、筋組織内の筋芽細胞の存在によって、移植された ASCs が筋芽細胞へ分化した可能性が示唆される。

しかし、ASCs が筋芽細胞に分化したからといって、すぐに筋組織として機能するとは考えにくい。幼若な筋芽細胞が筋分化誘導培地による環境下で、筋管細胞を経て、配向性を含めた成熟した筋線維としての機能を果たすためには、同一方向への張力が細胞に対して断続的に加えられる必要がある[43-45]。ASCs が筋芽細胞に分化した後、機械的な刺激が継続的に加わることで、多数の細胞が配向性を伴った筋線維を形成し、収縮力を得ることにつながると考えられる。

研究 3 では摂食行動によって筋組織に張力が加わることを期待して、咬筋に ASCs を移植したが、成熟した筋線維への分化の確認は行っておらず、また再生した筋に対する筋電図、張力測定などによる機能評価も困難であったため、実際に筋力が増強したかの確認までは行えていない。幹細胞移植によって実際に筋組織を増強できるのかどうかを検証するためには、機能評価が可能な筋の選定が重要であり、今後の課題と考えられる。

幹細胞注入によって筋組織の増強を図ることが可能となれば、口腔領域において鼻咽腔閉鎖不全症への治療に応用できる。鼻咽腔閉鎖不全症は口蓋裂術後患者の約 10%に出現するが、その原因は軟口蓋の筋の再構成不良や元々の組織量の少なさ、手術瘢痕による軟口蓋の運動性低下等によるものである[46,47]。鼻咽腔閉鎖不全症によって生じた構音障害に対して、現在ではスピーチエイドや咽頭弁形成術を行うのが一般的[47]だが、幹細胞移植によって軟口蓋の筋組織の再生が可能になれば、口腔内装置や手術が不要となり、根本的な治療が可能となる。

今回の研究では、注入による幹細胞移植を効率的に行うための移植媒体を考案し、これによって筋組織内に移植された幹細胞の体内生存率を高め、注入した組織の血管新生を促し、幹細胞が筋芽細胞に分化するのを促したことが示唆された。今後は筋線維の成熟評価、機能評価を行い、幹細胞移植が筋力向上に寄与できるのかの検証をしていきたい。

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、移植幹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を促し、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。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を受け賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の立案ならび進行にあたり、終始御教示、御指導いただきました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）磯村恵美子講師、京都大学ウイルス・再生医科学研究所（生体材料学分野）田畑泰彦教授に深甚なる謝意を表します。

本研究は、研究資金の一部を 2019 年度「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」共同研究課題から提供していただき、研究機材を京都大学ウイルス・再生医科学研究所にて使用させていただきました。また、研究材料の一部を新田ゼラチン株式会社、株式会社キミカから提供して頂きました。特別な御配慮、御協力に対し、深甚なる謝意を表します。

最後に本研究の円滑な進展のため、特別な御配慮、御協力を頂きました京都大学ウイルス・再生医科学研究所（生体材料学分野）桑原寿江様、大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）中川記世子先生、松川誠先生ならびに教室員諸兄に深甚なる謝意を表します。

引用文献

1. Zuk, P.A., *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**, 211-228 (2001).
2. Dubey, N.K., *et al.* Revisiting the advances in isolation, characterization and secretome of adipose-derived stromal/stem cells. *Int J Mol Sci* **19**,2200(2018).
3. Gimble, J.M., *et al.* Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration. *Front Biosci (Schol Ed)* **3**, 69-81 (2011).
4. Rivera-Izquierdo, M., *et al.* An updated review of adipose derived-mesenchymal stem cells and their applications in musculoskeletal disorders. *Expert Opin Biol Ther* **19**, 233-248 (2019).
5. Qazi, T.H., *et al.* Cell therapy to improve regeneration of skeletal muscle injuries. *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* **10**, 501-516 (2019).
6. Lemaitre, M., *et al.* Periodontal tissue regeneration using syngeneic adipose-derived stromal cells in a mouse model. *Stem Cells Transl Med* **6**, 656-665 (2017).
7. Mesimaki, K., *et al.* Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* **38**, 201-209 (2009).
8. Murakami, S., et al. An exploratory open trial to examine the safety of transplantation of autologous adipose tissue-derived stem cells for periodontal regeneration. UMIN000007698
9. Pers, Y.M., *et al.* Adipose mesenchymal stromal cell-based therapy for severe osteoarthritis of the knee: a phase I dose-escalation trial. *Stem Cells Transl Med* **5**, 847-856 (2016).
10. Miyahara, Y., *et al.* Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* **12**, 459-465 (2006).
11. Takemura, S., *et al.* Transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cell sheets directly into the kidney suppresses the progression of renal injury in a diabetic nephropathy rat model. *J Diabetes Investig* (2019).
12. Lipner, J., *et al.* In vivo evaluation of adipose-derived stromal cells delivered with a nanofiber scaffold for tendon-to-bone repair. *Tissue Eng Part A* **21**, 2766-2774 (2015).
13. Tateno, A., *et al.* Transplantation of dedifferentiated fat cells combined with a biodegradable type I collagen-recombinant peptide scaffold for critical-size bone defects in rats. *J Oral Sci* **61**, 534-538 (2019).
14. Perlee, D., *et al.* Intravenous infusion of human adipose mesenchymal stem cells modifies the host response to lipopolysaccharide in humans: A randomized, single-blind, parallel group, placebo controlled trial. *Stem Cells* **36**, 1778-1788 (2018).

15. Watanabe, T., *et al.* Increased urethral resistance by periurethral injection of low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells in rats. *Int J Urol* **18**, 659-666 (2011).
16. Zhou, X., *et al.* Multiple injections of autologous adipose-derived stem cells accelerate the burn wound healing process and promote blood vessel regeneration in a rat model. *Stem Cells Dev* **28**, 1463-1472 (2019).
17. Chen, Y., *et al.* Sustained release SDF-1alpha/TGF-beta1-loaded silk fibroin-porous gelatin scaffold promotes cartilage repair. *ACS Appl Mater Interfaces* **11**, 14608-14618 (2019).
18. Young, S.A., *et al.* Mechanically resilient injectable scaffolds for intramuscular stem cell delivery and cytokine release. *Biomaterials* **159**, 146-160 (2018).
19. Laurila, J.P., *et al.* Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stromal cell transplantation in a rat hind limb injury model. *Cytotherapy* **11**, 726-737 (2009).
20. Foster, A.A., *et al.* Protein-engineered hydrogels enhance the survival of induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells for treatment of peripheral arterial disease. *Biomater Sci* **6**, 614-622 (2018).
21. Seo, J.Y., *et al.* Electrostatically interactive injectable hydrogels for drug delivery. *Tissue Eng Regen Med* **15**, 513-520 (2018).
22. Niu, H., *et al.* Thermosensitive, fast gelling, photoluminescent, highly flexible, and degradable hydrogels for stem cell delivery. *Acta Biomater* **83**, 96-108 (2019).
23. Nguyen, M.K., *et al.* Bioactive factor delivery strategies from engineered polymer hydrogels for therapeutic medicine. *Prog Polym Sci* **39**, 1236-1265 (2014).
24. Dimatteo, R., *et al.* In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair. *Adv Drug Deliv Rev* **127**, 167-184 (2018).
25. Anamizu, M., Y. Design of injectable hydrogels of gelatin and alginate with ferric ions for cell transplantation. *Acta Biomater* **100**, 184-190 (2019).
26. Horikoshi-Ishihara, H., *et al.* Coadministration of adipose-derived stem cells and control-released basic fibroblast growth factor facilitates angiogenesis in a murine ischemic hind limb model. *J Vasc Surg* **64**, 1825-1834. (2016).
27. Matsui, M., Enhanced angiogenesis by multiple release of platelet-rich plasma contents and basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogels. *Acta Biomaterialia* **8**, 1792-1801 (2012).
28. Tabata, Y., *et al.* Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng* **5**, 127-138 (1999).
29. Grossen, P., *et al.* PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application. *J Control Release* **260**, 46-60 (2017).

30. Yoshimura, K., *et al.* Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: Efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg* **34**, 1178-1185 (2008).
31. Lendeckel, S., *et al.* Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: Case report. *J Craniomaxillofac Surg* **32**, 370-373 (2004).
32. Lin, P.C., *et al.* A proposed novel stem cell therapy protocol for liver cirrhosis. *Cell Transplant* **24**, 533-540 (2015).
33. Terai, T., *et al.* A Phase 1/2 Study of ADR-001 in Patients with Liver Cirrhosis. UMIN000028521
34. Balakrishnan, B., *et al.* Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials* **26**, 3941-3951 (2005).
35. Lai, F., *et al.* Platelet-rich plasma enhances the proliferation of human adipose stem cells through multiple signaling pathways. *Stem Cell Res Ther* **9**, 107 (2018).
36. Tian, H., *et al.* Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into bladder cells: potential for urological tissue engineering. *Tissue Eng Part A* **16**, 1769-1779 (2010).
37. Wu, R., *et al.* Isolation and myogenic differentiation of mesenchymal stem cells for urologic tissue engineering. *Methods Mol Biol* **1001**, 65-80 (2013).
38. Sassoli, C., *et al.* Combined use of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) and platelet rich plasma (PRP) stimulates proliferation and differentiation of myoblasts in vitro: new therapeutic perspectives for skeletal muscle repair/regeneration. *Cell Tissue Res* **372**, 549-570 (2018).
39. Ma, Q., *et al.* Functionalization of a clustered TiO2 nanotubular surface with platelet derived growth factor-BB covalent modification enhances osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **230**, 191650(2020).
40. Askari, M., *et al.* Sustained release of TGF-beta1 via genetically-modified cells induces the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells encapsulated in alginate sulfate hydrogels. *J Mater Sci Mater Med* **30**, 7 (2018).
41. Choi, J.S., *et al.* Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *J Control Release* **222**, 107-115 (2016).
42. Milner, D.J., *et al.* Myogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from porcine adipose tissue. *Cell Tissue Res* **372**, 507-522 (2018).
43. Andersen, J.I., *et al.* Uniaxial cyclic strain enhances adipose-derived stem cell fusion with skeletal myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **450**, 1083-1088 (2014).

44. Bayati, V., *et al.* The evaluation of cyclic uniaxial strain on myogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Tissue Cell* **43**, 359-366 (2011).
45. Helms, F., *et al.* Complete myogenic differentiation of adipogenic stem cells requires both biochemical and mechanical stimulation. *Ann Biomed Eng* ,913-926(2019).
46. Brown, A.S., *et al.* Levator muscle reconstruction: does it make a difference? *Plast Reconstr Surg* **72**, 1-8 (1983).
47. Remacle, M., *et al.* The use of injectable collagen to correct velopharyngeal insufficiency. *Laryngoscope* **100**, 269-274 (1990).

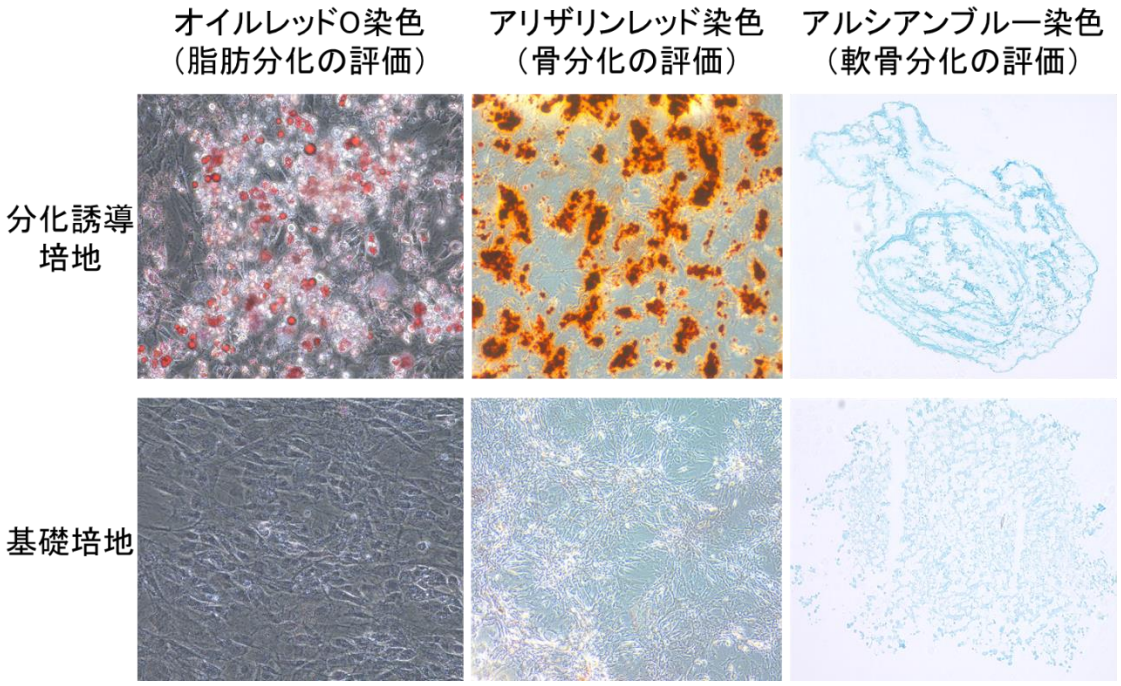

図 1　本研究で使用した ASCs の多分化能の検証

脂肪分化誘導培地、骨分化誘導培地、軟骨分化誘導培地で 3 週間培養した、それぞれの細胞をオイルレッド O 染色、アリザリンレッド染色、アルシアンブルー染色によって評価した。

脂肪分化誘導培地で培養した細胞は、オイルレッド O 染色で陽性だった。

骨分化誘導培地で培養した細胞は、アリザリンレッド染色で陽性だった。

軟骨分化誘導培地でペレット培養した細胞は、アルシアンブルー染色で陽性だった。

以上より、3 継代目 ASCs は、脂肪、骨、軟骨への分化能を認め、多分化能を示すことが確認できた。

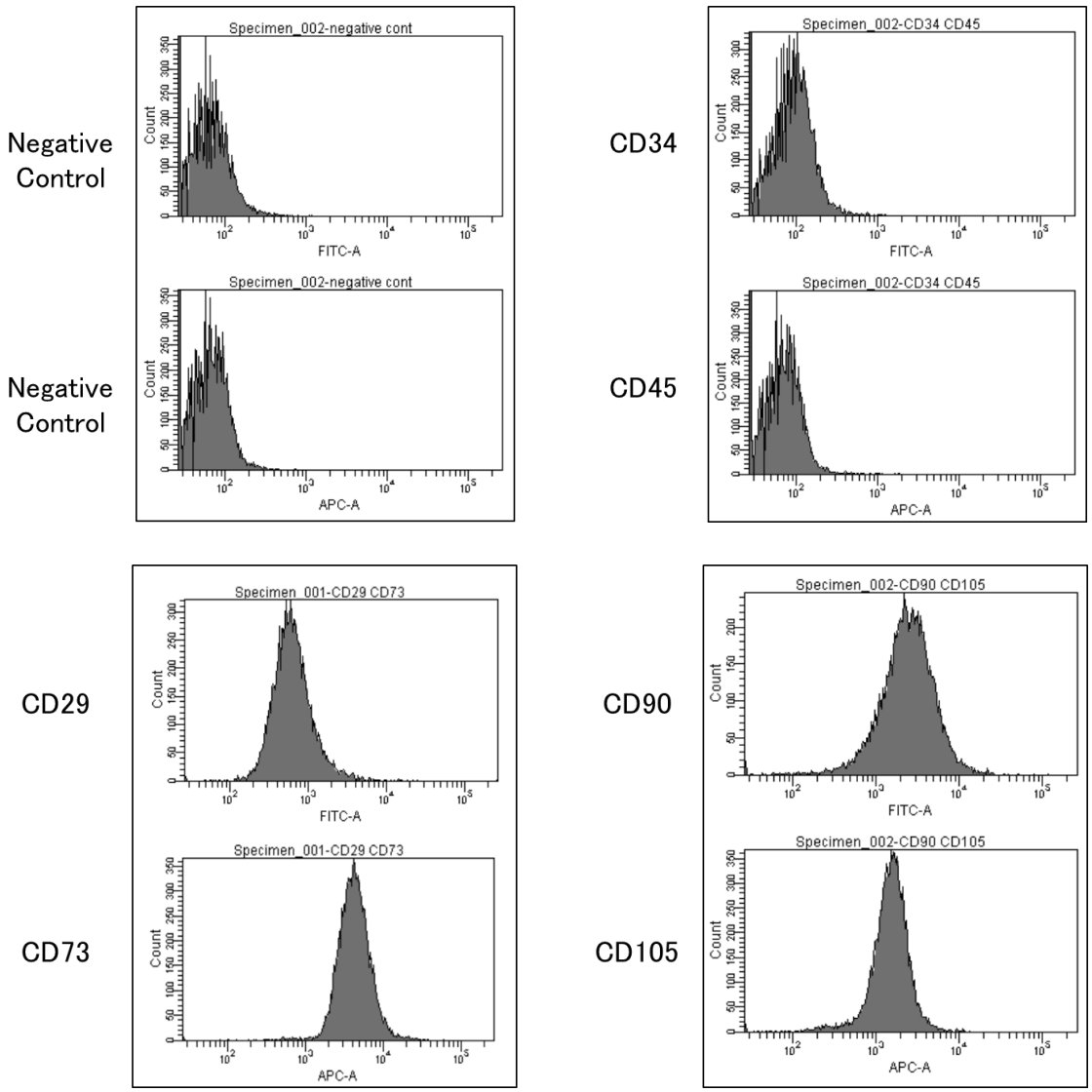

図 2　本研究で使用した ASCs のキャラクタリゼーション

造血系マーカーである CD34、45 が陰性、間葉系マーカーである CD29、73、90、105 で陽性であったことから、使用した細胞が間葉系幹細胞であることが確認された。

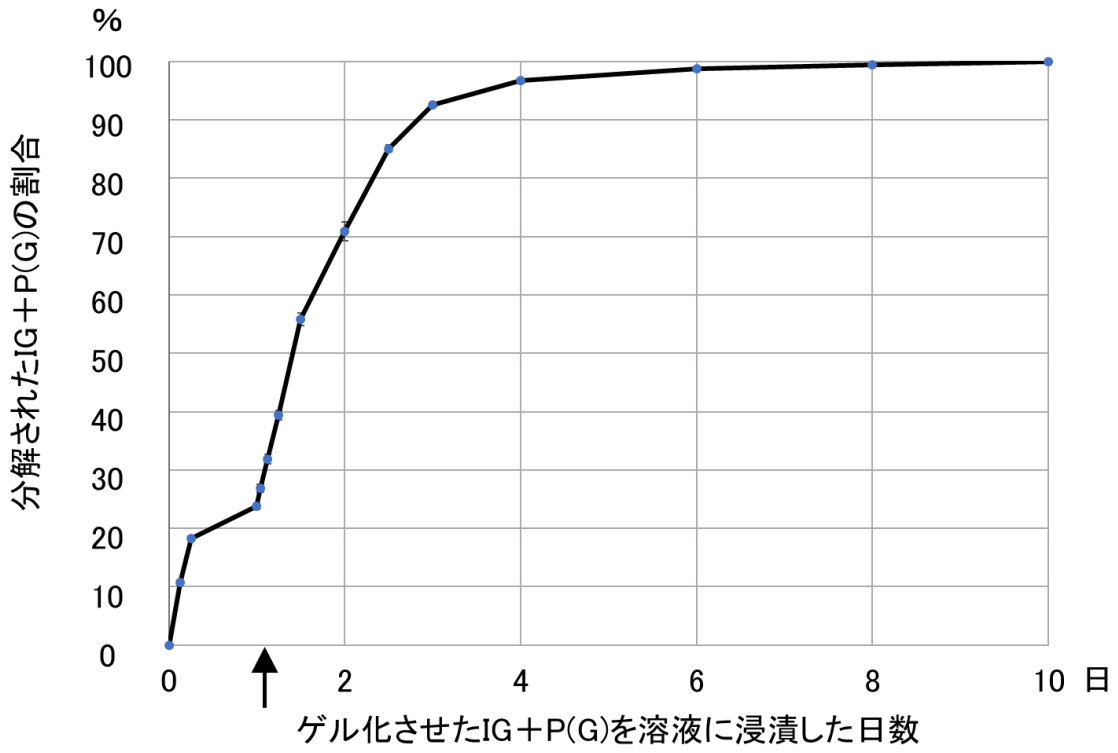

図 3　IG+P(G)の分解試験

ゲル化させた IG+P(G)を PBS 中に浸漬して、架橋に関与しないゼラチンを取り除いた後、コラゲナーゼ溶液中に浸漬して分解試験を行った。矢印は PBS からコラゲナーゼ D・PBS に切り替えた時期を示す。（浸漬から 24 時間後）

全てのサンプルに含まれるゼラチンの濃度から、ゼラチンの量を計測し、その合計を 100%分解量とした。各サンプルに含まれるゼラチンの量を計測することで、PBS またはコラゲナーゼ D・PBS に浸漬してから回収するまでに分解された IG+P(G)の割合を調べた。

PBS に浸漬するだけで溶出してきた、架橋に関与しないゼラチンは全体の 25%程度であり、コラゲナーゼ D・PBS に変更して 1 日（24 時間）で全体の約 70%が分解された。IG+P(G)はコラゲナーゼ D・PBS 中で 7 日程度で完全に分解された。

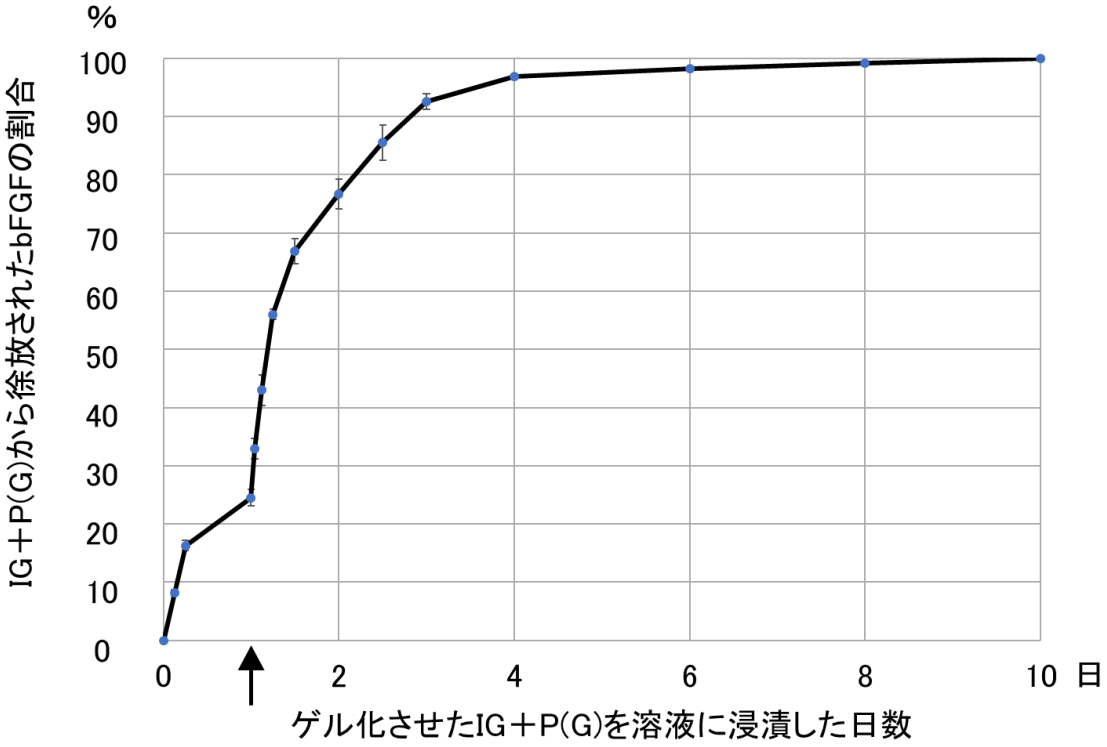

図 4　IG+P(G)の bFGF 徐放試験

ゲル化させた IG+P(G)を PBS 中に浸漬して、徐放粒子の内部に取り込まれていなかった GF を回収した後、コラゲナーゼ溶液中に浸漬して分解試験を行った。矢印は PBS からコラゲナーゼ D・PBS に切り替えた時期を示す（混和から 24 時間後）。

全てのサンプル中に含まれる bFGF の濃度から、bFGF の量を計測し、その合計を 100%徐放量とした。各サンプルに含まれる bFGF の量を計測することで、PBS またはコラゲナーゼ D・PBS に浸漬してから回収するまでに徐放された bFGF の割合を調べた。

PBS に浸漬するだけで溶出してきた、粒子に取り込まれていない bFGF は全体の 25%程度であった。コラゲナーゼ D・PBS に変更して 1 日（24 時間）で全体の約 75%が徐放された。IG+P(G)に含まれる bFGF はコラゲナーゼ D・PBS 中において 7 日程度徐放された。

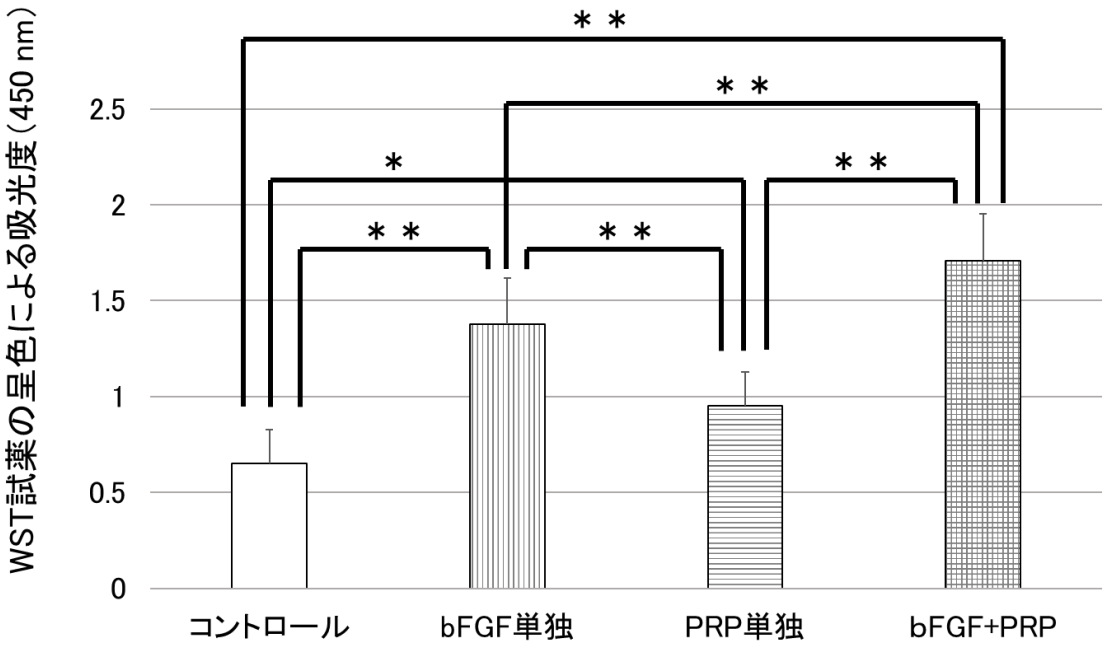

図 5　GF 添加の有無が、ASCs の細胞増殖能に及ぼす影響

基礎培地（コントロール）または GF を添加した各培地で ASCs を 48 時間培養した後の、WST 試薬の呈色反応による吸光度（450 nm）を比較した。

基礎培地に bFGF や PRP を単独で添加した群は、基礎培地のみのコントロール群と比較して、吸光度が有意に高い値を示した。

また、基礎培地に bFGF と PRP を共に添加した群は、コントロール群や、bFGF 群、PRP 群と比較して、吸光度が有意に高い値を示した。

* P<0.05, ** P＜0.01 (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

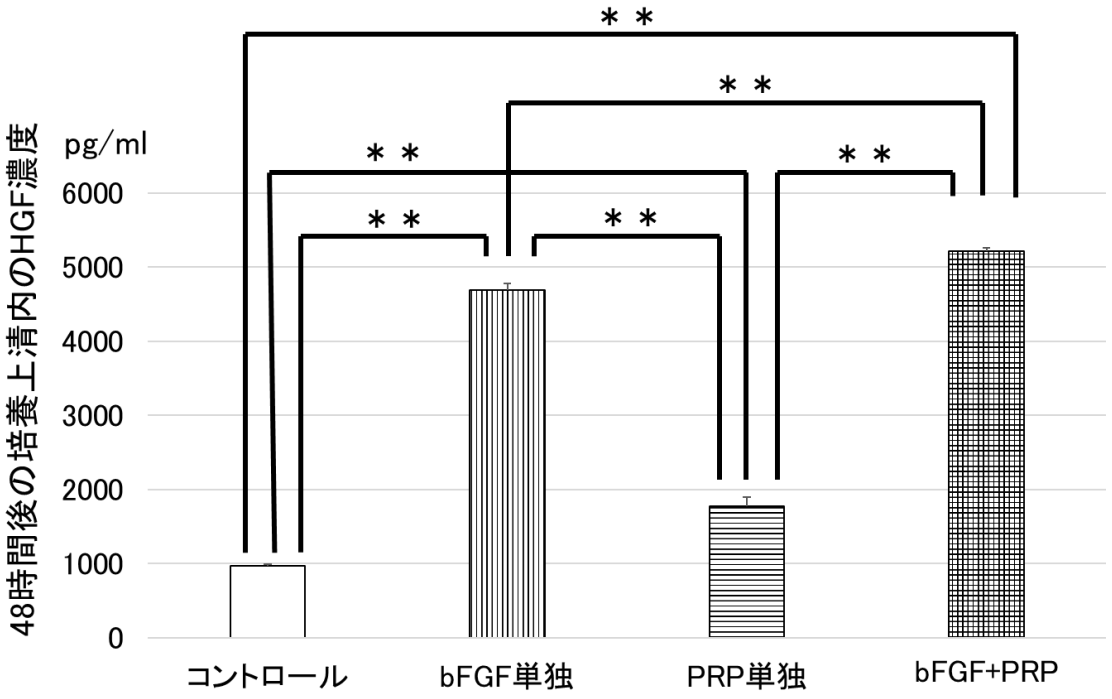

図 6　GF 添加の有無が、ASCs の HGF 分泌能に及ぼす影響

基礎培地に bFGF や PRP を単独で添加した群は、基礎培地のみのコントロール群と比較して、培養上清内に含まれる HGF の濃度が有意に高い値を示した。

また、基礎培地に bFGF と PRP を共に添加した群は、コントロール群や、bFGF 群、PRP 群と比較して、培養上清内に含まれる HGF の濃度が有意に高い値を示した。

培地にもともと含まれていた HGF の濃度は、PRP 群が 72 pg/ml、PRP+bFGF 群が 117 pg/ml であった。

** P＜0.01 (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

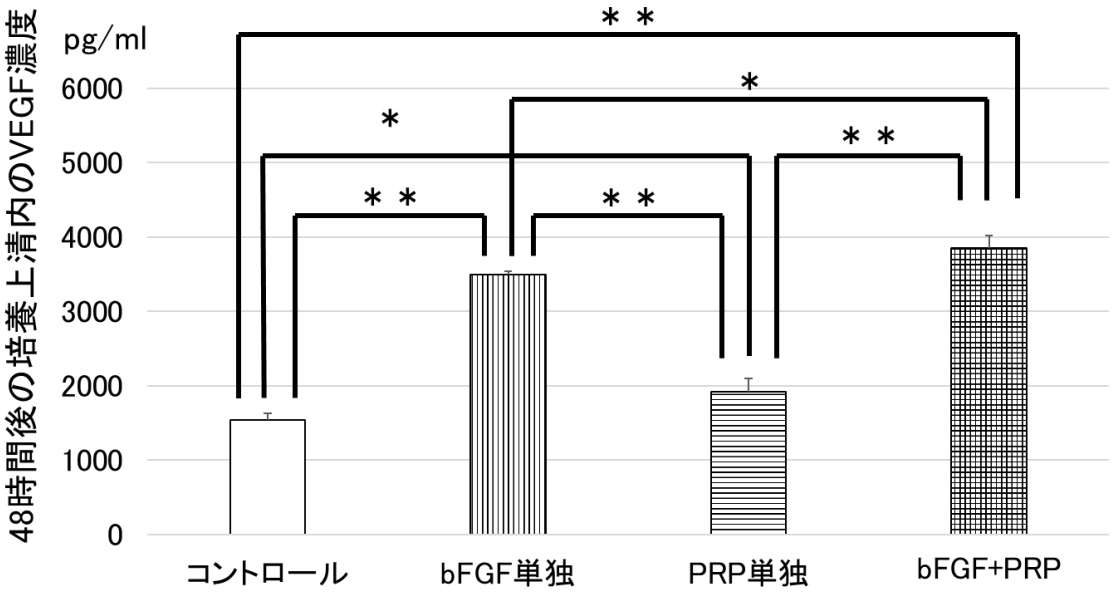

図 7　GF 添加の有無が、ASCs の VEGF 分泌能に及ぼす影響

基礎培地に bFGF や PRP を単独で添加した群は、基礎培地のみのコントロール群と比較して、培養上清内に含まれる VEGF の濃度が有意に高い値を示した。

また、基礎培地に bFGF と PRP を共に添加した群は、コントロール群や、bFGF 群、PRP 群と比較して、培養上清内に含まれる VEGF の濃度が有意に高い値を示した。

培地にもともと含まれていた VEGF の濃度は、PRP 群、PRP+bFGF 群ともに 15 pg/ml 未満であった。

* P<0.05, ** P＜0.01 (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

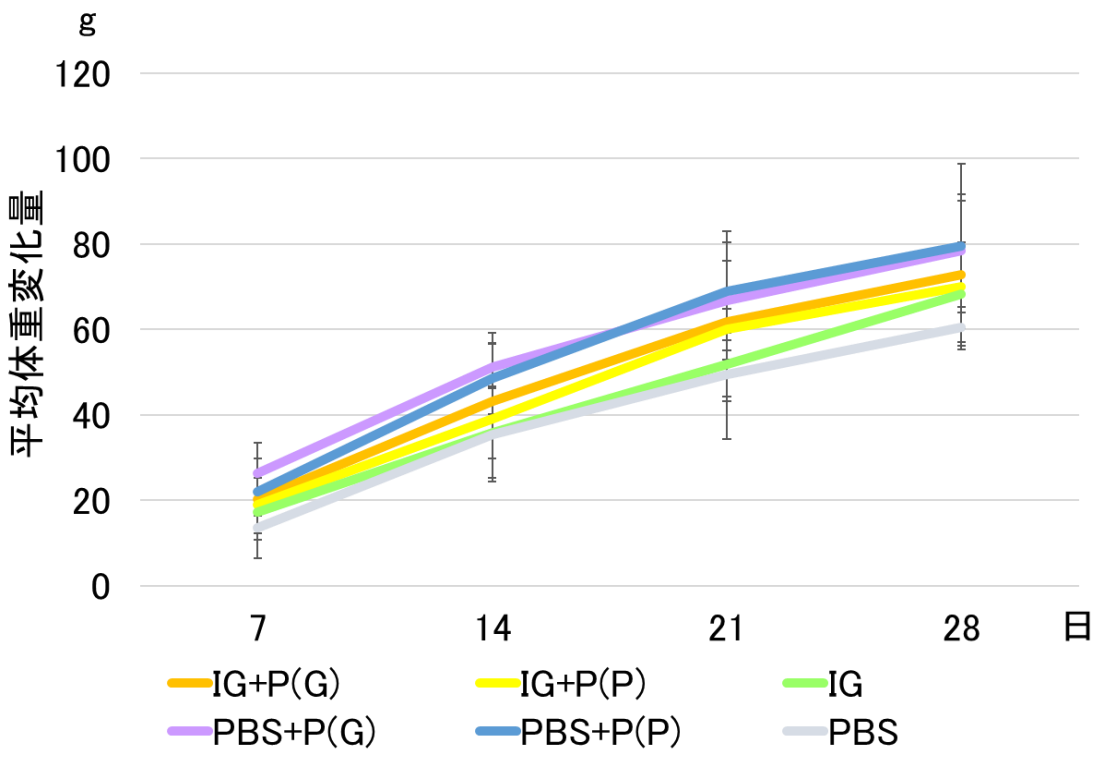

図 8　幹細胞移植後の平均体重変化量

術後 7、14、21、28 日目における術前からの体重変化量を示す。

各測定日における、体重変化量は各群で有意な差は認められなかった。

(Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

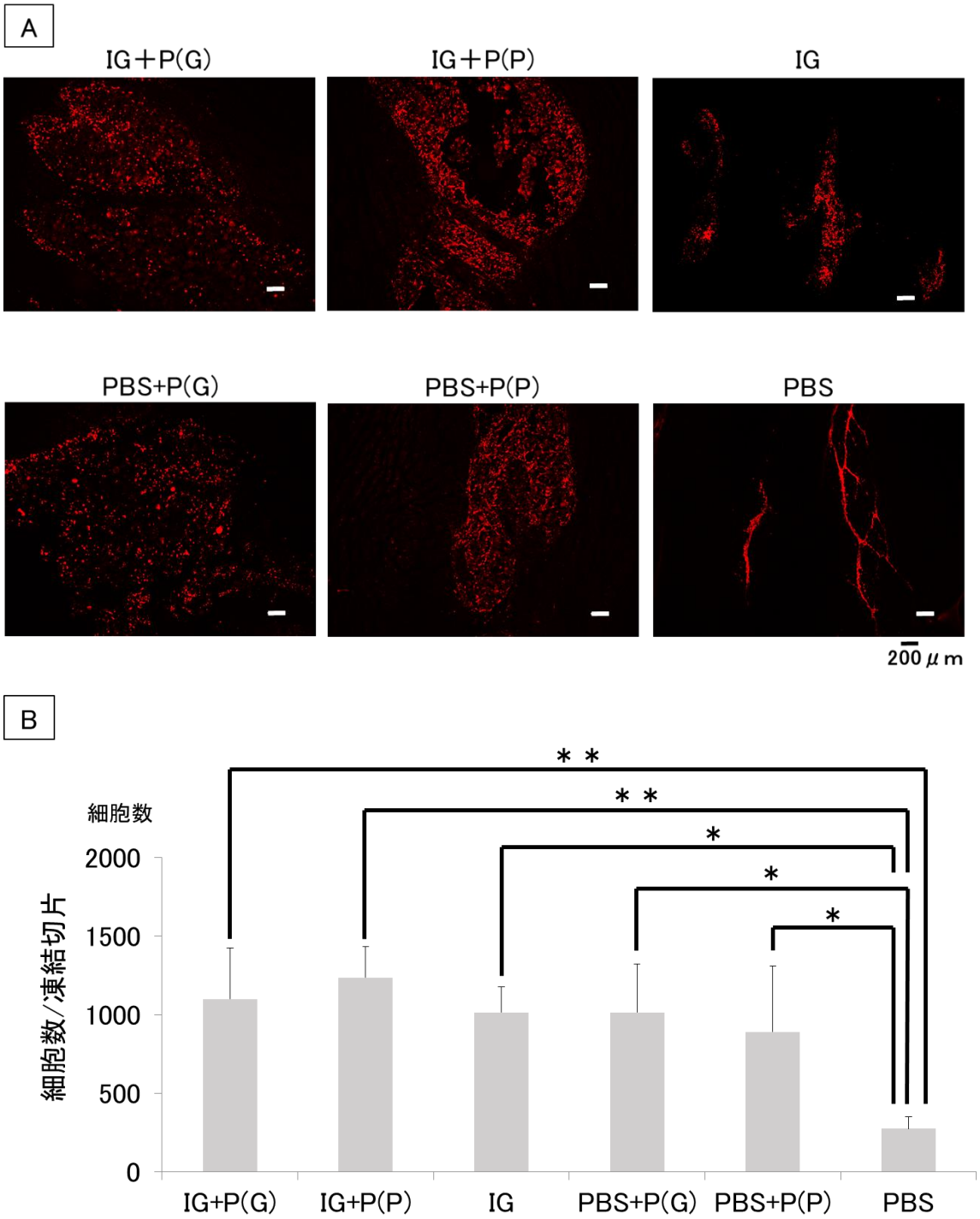

図 9　術後 2 日目時点での切片上の平均細胞数（PKH26 標識）の比較

A.術後 2 日目時点での蛍光顕微鏡（TRITC 用フィルター）画像を示す。どの群も PKH26 で標識された ASCs を認めるが、IG+P(P)群の切片が、平均細胞残存数が最も多かった。

B.術後 2 日目時点での切片上の平均細胞数の比較をグラフに示す（各群 N=4）。

PBS 群の切片上の平均細胞数が、その他の群と比較して有意に低い値を示した。

* P＜0.05, ** P＜0.01 (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

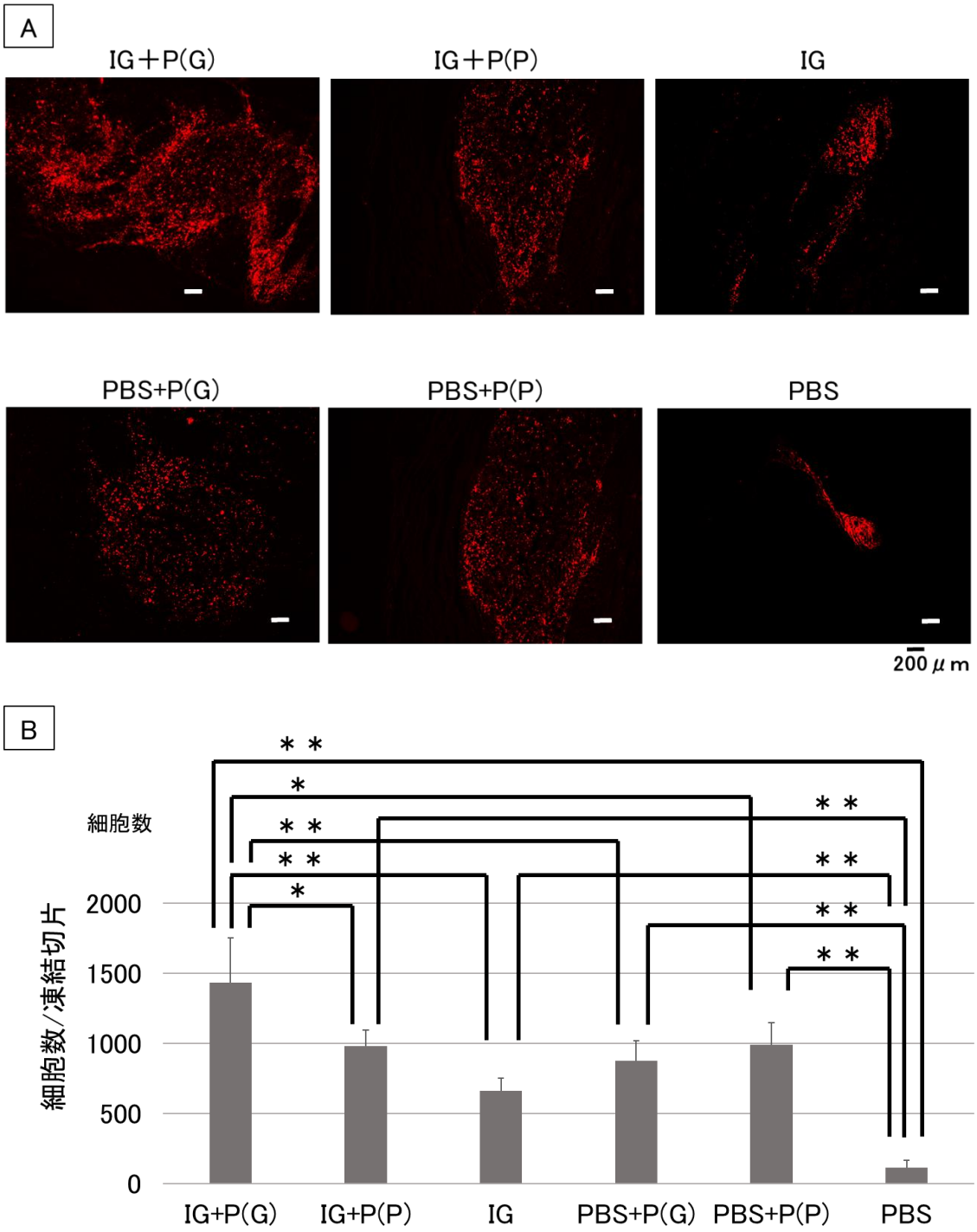

図 10　術後 7 日目時点での切片上の平均細胞数（PKH26 標識）の比較

A.術後 7 日目時点での蛍光顕微鏡（TRITC 用フィルター）画像を示す。どの群も PKH26 で標識された ASCs を認めるが、IG+P(G)群の切片が、平均細胞残存数が最も多かった。

B.術後 7 日目時点での切片上の平均細胞数の比較をグラフに示す（各群 N=4）。

IG+P(G)群の切片上の平均細胞数が、その他の群と比較して有意に高い数値を示した。

* P＜0.05, ** P＜0.01 (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

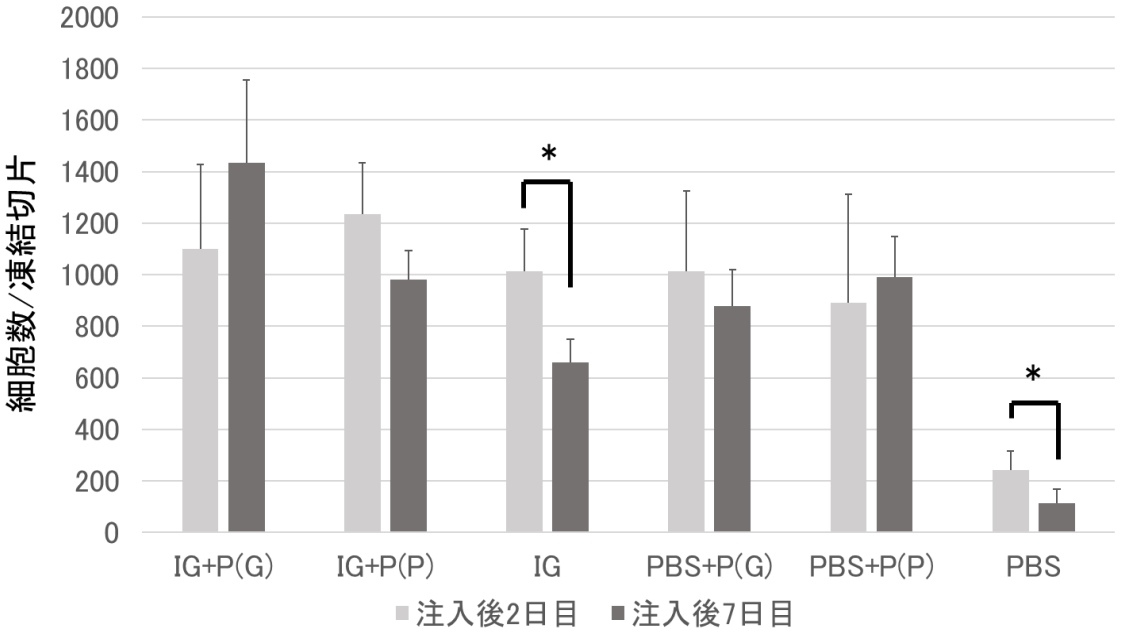

図 11　術後 2 日目と 7 日目の切片上の平均細胞数の比較

術後 2 日目と 7 日目の、各群の切片上の平均細胞数の比較をグラフに示す（各群 N=4）。IG+P(G)群では細胞数の増加傾向を示したが、有意な差は認められなかった。IG 群、PBS 群では有意に減少し、IG+P(P)群、PBS+P(G)群、PBS+P(P)群では有意な差は認められなかった。
* P＜0.05 (Mann-Whitney's U test)

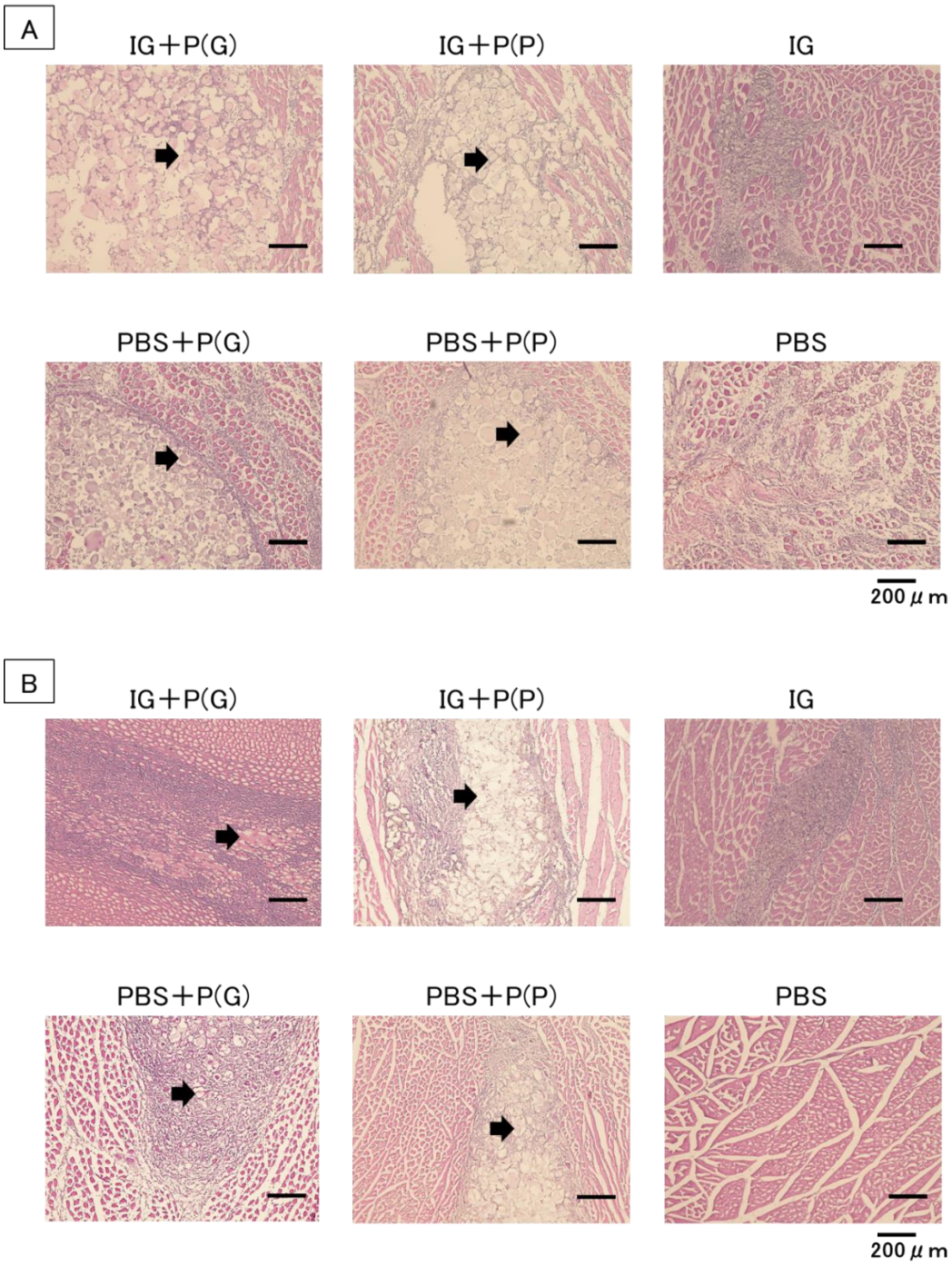

図 12　術後 2、7 日目時点でのラット咬筋の幹細胞あり側における HE 染色

A：術後 2 日目の HE 染色像を示す。全ての群において軽度の炎症細胞浸潤を認め、筋組織内に徐放粒子（➡）が残存していたことがわかる。

B:術後 7 日目の HE 染色像を示す。筋組織内の徐放粒子（➡）はまだ残存していたことがわかる。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。

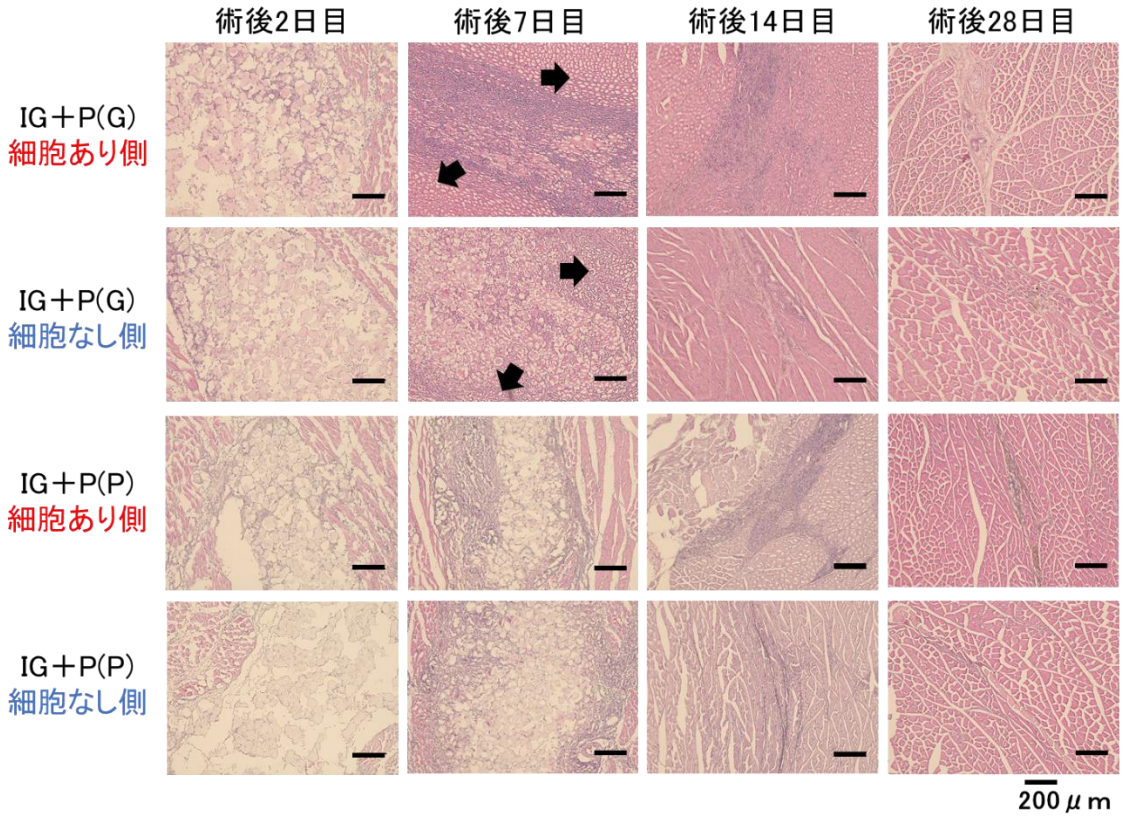

図 13　ラットの咬筋に注入した IG+P(G)群、IG+P(P)群の経時的変化（HE 染色）

術後 2、7 日目では徐放粒子はまだ残存していたが、術後 14 日目で消失していた。術後 7 日目において 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」では術後 2、7 日での炎症所見や術後 14、28 日での組織修復の傾向に明らかな違いは認めなかった。

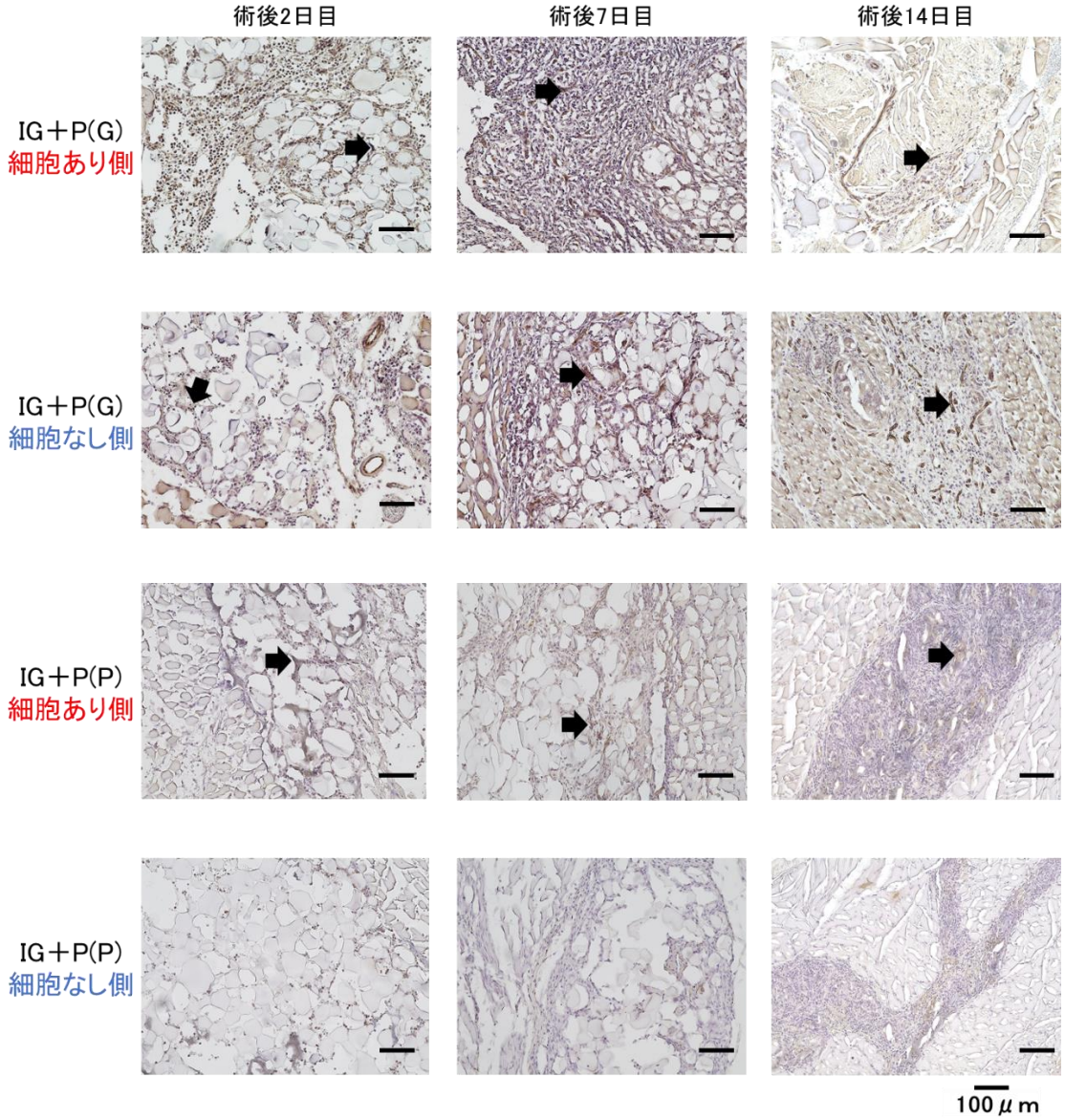

図 14　ラットの咬筋に注入した IG+P(G)群、IG+P(P)群の CD31 の免疫組織化学染色

IG+P(G)群、IG+P(P)群の幹細胞の有無による術後 2、7、14 日目の CD31 免疫染色像を示す。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。

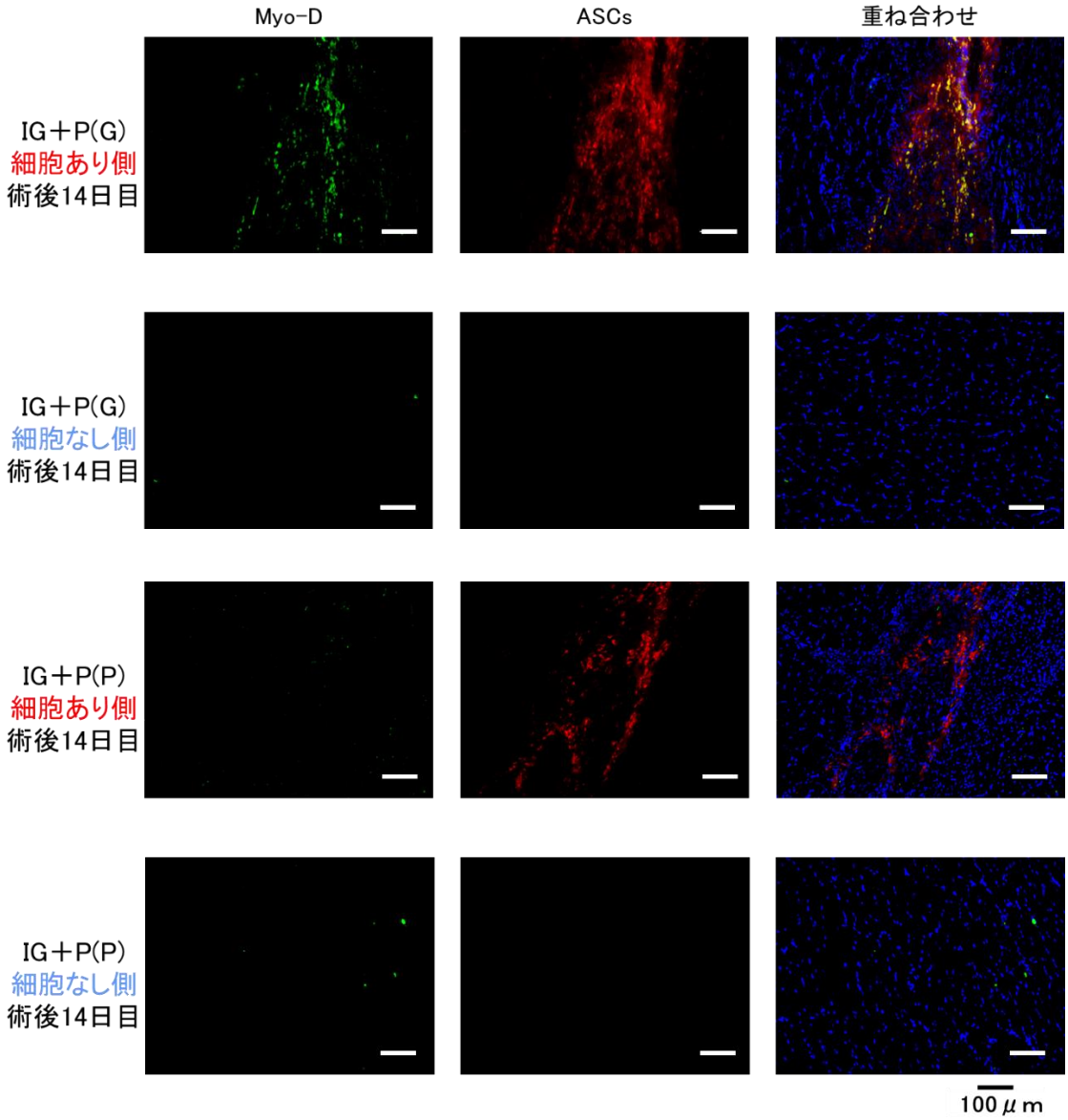

図 15　IG+P(G)群、IG+P(P)群の免疫蛍光染色（Myo-D）

IG+P(G)群、IG+P(P)群の幹細胞の有無による術後 14 日目の Myo-D 免疫蛍光染色像を示す。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)群の細胞あり側の、移植した ASCs 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。

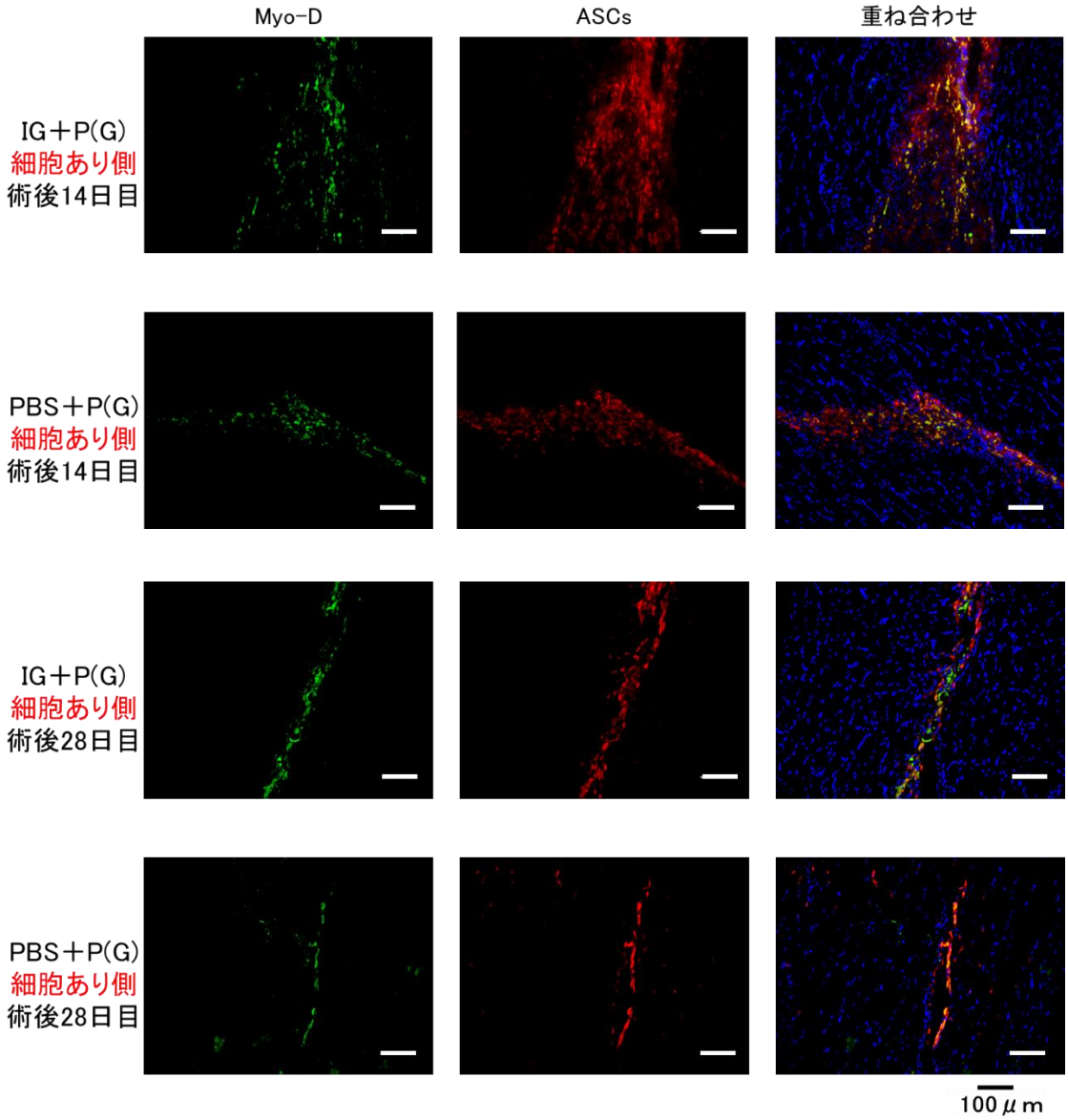

図 16　IG+P(G)群、PBS+P(G)群の免疫蛍光染色（Myo-D）

術後 14 日目での 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。