

2020年4月16日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
2019年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属： 大阪大学大学院歯学研究科
口腔外科学第一教室

職名： 講師

氏名： 磯村 恵美子

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：組織注入可能な形で3次元培養させた幹細胞による筋力増強効果に関する検討
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者： 田畑泰彦
3. 研究期間：2019年4月1日～2020年3月31日
4. 研究経過及び研究成果：

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、移植する脂肪由来幹細胞(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。

まず、ゲル化させたIG+P(G)を、10 μ g/mlのコラゲナーゼ溶液によって分解させ、分解試験・薬剤徐放試験を行った。その結果、IG+P(G)は、コラゲナーゼ溶液中において7日程度で分解され、同期間中、GFの徐放を認めた。

次にGF(bFGF、PRP)を添加した培地でラットの腹部より採取した脂肪由来幹細胞を培養し、細胞増殖率をWST試薬を用いた吸光度で、培地上清中のサイトカイン(HGF、VEGF)濃度をELISA(R&D Systems社)で計測した。結果、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。

最後にSD系ラット8週齢雌の咬筋への脂肪由来幹細胞他家移植を行い、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を検討した。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。結果、切片上の平均移植細胞数は、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た。またHE染色では、術

後 7 日目でも、筋組織内に徐放粒子が残存しており、IG+P(G)群、PBS+P(G)群は、GF 徐放粒子の周囲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。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。蛍光免疫染色では、術後 28 日目の IG+P(G)群および PBS+P(G)群において、移植した ASCs の残存部位に、Myo-D の発現を認めた。

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、幹細胞の体内生存率を高め、移植治療効率の向上に有効であることが示唆された。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。

5. 研究成果の公表

口頭演題発表：「細胞増殖因子徐放化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」
三ツ井諒,磯村恵美子,松川誠,中川記世子,古郷幹彦,田畑泰彦
(第 9 回 DDS 再生医療研究会、2019.12.22 京都)