TITLE:

Adipogenesis induced by human adipose tissue-derived stem cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Tsuji, Wakako

CITATION:

Tsuji, Wakako. Adipogenesis induced by human adipose tissue-derived stem cells. 京都大学, 2009, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2009-09-24

URL:

http://hdl.handle.net/2433/126447

RIGHT:

京都大学学術情報リポジトリ
KURENAI 紅
Kyoto University Research Information Repository

京都大学	博士（医学）	氏　名	・　和香子
論文題目	Adipogenesis induced by human adipose tissue-derived stem cells (ヒト脂肪組織由来幹細胞に誘導される脂肪組織再生)		

（論文内容の要旨）

緒言

乳癌手術により乳房は変形するため患者の QOL は著しく損なわれる。欠損部の再建のために脂肪組織再生が期待される。組織再生には、①細胞源、②足場、③増殖因子などの微小環境が必要である。脂肪組織由来幹細胞（ASCs)は脂肪組織をコラゲナーゼ処理して得られる細胞群であり、脂肪、筋、骨、軟骨等へと分化する。自己脂肪組織から分離した ASCs であれば免疫拒絶を起こさず、組織再生に理想的な細胞源である。繊維芽細胞増殖因子(bFGF)は *in vivo* でも *in vitro* でも脂肪組織再生に有効であることが分かっている。当研究では、bFGF 存在下・非存在下での ASCs の至適継代数(*in vitro*)、徐放化 bFGF 存在下・非存在下に ASCs をタイプ I コラーゲンスポンジを足場に移植後 12 週間および 24 週間の再生脂肪組織および至適移植細胞数(*in vivo*)について検討した。

材料と方法

京都大学医の倫理委員会の承認を得て、インフォームド・コンセントを得た乳癌患者から乳癌手術後に通常廃棄する脂肪組織を用いて ASCs を得た。(*in vitro*)ASCs を bFGF 添加群と非添加群とに分けて 10 継代まで培養した。継代して 1 週間後に cell count および MTT assay を行い増殖能について評価した。また分化培地で 3 週間培養したものを GPDH(グリセロール - 3 - リン酸脱水素酵素)活性測定を行い脂肪分化能について評価した。(*in vivo*)動物実験は京都大学医学部附属動物実験施設のガイドラインに従って行った。*in vitro* での結果を踏まえて 3 継代までの ASCs を 0, 5×10^5, 2×10^6, 8×10^6cells に分け、タイプ I コラーゲンスポンジを足場に徐放化 bFGF 有・無群に分けて 6 週齢・雌のヌードマウス背部皮下に移植した。移植後 12 週・24 週後にマウスを安楽死させ得た標本を H-E 染色、oil red o 染色、抗ヒトビメンチン染色を行い、再生脂肪面積について画像解析ソフトを用いて解析した。

結果

(*In vitro*)10 継代を通じて cell count でも MTT assay でも ASCs の増殖能は保たれていた。Basic FGF 添加群の方が非添加群よりも 1.6 - 4.0 倍増殖能が高かった。Basic FGF を添加すれば 4 継代目で細胞数は播種時の 1000 倍になった。分化能に関しては bFGF 添加群の方が非添加群よりも高く、1 - 3 継代で高く、4 継代以降減少した。

(*In vivo*) 移植後 12 週後・24 週後の標本ではいずれの群でも再生脂肪組織を認めた。2×10^6ASCs と徐放化 bFGF とを移植した群が 12 週後でも 24 週後でも再生脂肪面積が最大であった。移植後 12 週に比し 24 週では、ほとんどの群で再生脂肪面積が増加していた。また、ASCs を移植したすべての群でヒトビメンチン陽性細胞が見られた。8×10^6ASCs と徐放化 bFGF とを移植した群でのヒト由来再生脂肪面積が最大であった。移植後 24 週では、すべての ASCs 移植群でヒト由来再生脂肪面積は増加していた。

まとめ

成熟脂肪細胞への分化能を保持した ASCs を得るには bFGF 添加培地で 3 継代まで *in vitro* で増殖させるのがよい。3 継代まで増殖させた至適な細胞数のヒト ASCs を徐放化 bFGF とともにタイプ I コラーゲンスポンジに移植すれば、*in vivo* で最大 24 週間にわたって機能的な脂肪組織を再生することがわかった。

（論文審査の結果の要旨）

脂肪組織由来幹・前駆細胞は脂肪組織再生における重要な細胞源である。しかし、脂肪組織から得られる細胞数は限られており、組織再生に応用するには脂肪細胞への分化能を維持した細胞を*ex vivo*で増殖させる必要がある。

本研究では、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）存在下での脂肪組織由来細胞の培養における継代回数と増殖能・脂肪分化能の関係、培養後bFGFとコラーゲンスポンジ（足場）を用いてマウス皮下へ移植した際の脂肪組織再生能を検討した。ヒト乳房脂肪組織片から分離した接着細胞を1週間毎に継代培養すると、bFGF存在下で総細胞数の増殖能は第10継代まで、脂肪分化能は第3継代まで維持された。次に、第3継代まで培養した細胞と徐放化bFGFを足場と移植すると、再生脂肪組織はヒトおよびマウス由来脂肪組織から構成され、徐放化bFGFの有無、移植細胞数、移植後の期間により、総再生脂肪面積、これに占めるヒト由来再生脂肪面積の比は異なった。ヒト由来再生脂肪面積は移植細胞数に比例し$8x10^6$個を移植した場合に最大となったが、総再生脂肪面積は$2x10^6$個の細胞を徐放化bFGFと共に移植した場合に最大となり、さらに移植細胞数を増加させると減少した。本研究により、脂肪組織から分離した接着細胞は週毎に3回継代培養しても脂肪分化能を維持すること、移植後の再生脂肪面積を最大にする至適細胞数が存在することが新たに見出された。

以上の研究はヒト脂肪組織由来細胞を用いた脂肪組織再生法の開発に貢献し、乳腺外科学、再生医療の発展に寄与すると考えられる。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成21年8月21日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降