

論文の内容の要旨

1 目的

脂肪組織由来幹細胞(adipose-derived stem cells: ASCs)は、多分化能を有し、各種サイトカインを分泌する。また、血漿は血小板を含有しており、その血小板中に多種のサイトカインを含んでいる。ASCs および血漿は低侵襲で採取可能であり、再生医学の分野で多くの基礎研究および臨床応用が報告されている。一方、これらのサイトカインの活用に関しては、活性半減期が短く、効果の長時間持続が難しいという欠点もある。我々のグループでは、これらの欠点を改善するため、その活性を維持、増強するドラッグデリバリーシステム (drug delivery system: DDS) として、フラグミンとプロタミンから作成する微粒子 (fragmin/protamine microparticles: F/P MPs) の研究を進めてきた。

また、近年、形成外科領域では、糖尿病や末梢動脈疾患 (peripheral arterial disease: PAD) などによる難治性潰瘍の患者がますます増加をしている。

本研究は、低侵襲に採取可能な ASCs および血漿と DDS としての F/P MPs を組み合わせた再生医療を難治性潰瘍に臨床応用する前段階として、動物実験において理論的に同一とみなせる系にて基礎的データを得ることを目的としている。

2 対象並びに方法

(1) ASCs の 3 次元培養に関する基礎的研究

DMEM 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium) と近交系ラットの血漿 (inbred rat plasma: IRP) を併用して作成した血漿ゲル (IRP-DMEM gel) を用い、*in vitro* において、近交系ラットの ASCs (inbred rat ASCs: IR-ASCs) を 3 次元的に培養した。そして、*in vivo* において、ラット背部皮下にそれらを局所投与することにより、その組織形成効果を検討した。さらに、F/P MPs との併用効果を検討した。

(2) ASCs の 3 次元培養の創傷治癒への応用

F/P MPs 含有 IRP-DMEM gel を用いて IR-ASCs を 3 次元培養し (IR-ASCs + IRP-DMEM gel + F/P MPs)、これを糖尿病難治性潰瘍モデルラットに移植した。そして、糖尿病性難治性潰瘍に対する創傷治癒促進効果を検討し、さらに臨床応用への可能性を検証していった。

3 結果

(1) ASCs の 3 次元培養に関する基礎的研究

In vitro において、IRP-DMEM gel を用い、ウシ胎児血清 (FBS) を全く使用せず、IR-ASCs を 3 次元的に培養することができた。F/P MPs を併用することで、より効果的な IR-ASCs の増殖がみられた。*In vivo* において、IRP-DMEM gel を用いて 3 次元培養した IR-ASCs の投与部位で、血管数の増大を認め、肉芽組織の形成も良好であった。F/P MPs を併用した群では、さらに高い組織形成効果を認めた。

(2) ASCs の 3 次元培養の創傷治癒への応用

糖尿病難治性潰瘍モデルラットの潰瘍部に IR-ASCs + IRP-DMEM gel + F/P MPs を移植

した群では、他の実験群と比較し、より多くの血管を認め、肉芽組織の形成も良好であった。また、創閉鎖に要した時間も早かった。移植された IR-ASCs はほとんど血管内皮細胞に変化せず、多くは肉芽組織形成に寄与していた。

4 考察

IR-ASCs + IRP-DMEM gel + F/P MPs を使用した実験群では、IR-ASCs の autocrine および paracrine の作用、IRP-DMEM gel 中のサイトカイン、DDS としての F/P MPs の効果が複合的に合わさり、高い組織形成効果が得られたと考えられた。さらに、正常な創傷治癒機転の働きにくい糖尿病性難治性潰瘍創では、不足するサイトカイン等の機能性タンパク質や細胞成分が補われ、創傷治癒が促進されたと考えられた。

5 結論

IRP と DMEM 培地を使用して作成した血漿ゲル (IRP-DMEM gel) と F/P MPs を併用して ASCs を 3 次元培養し、ラットに移植したところ、高い組織形成効果、創傷治癒促進効果を認めた。

F/P MPs 含有 IR-ASCs + IRP-DMEM gel は FBS を使用せず安全であり、IRP および IR-ASCs とともに低侵襲な採取方法により得ることができる。特に、創傷治癒機転が阻害されている糖尿病性潰瘍などの難治性潰瘍治療に有効であると考えられる。また、出血や感染の合併症もなく、安全な細胞移植方法として臨床応用も可能であることが示唆された。