

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10552

研究課題名(和文) 乳腺幹細胞を用いた乳汁産生機能を有する乳腺の再生

研究課題名(英文) Generation of functional mammary glands by mammary stem cells

研究代表者

森本 雅美 (MORIMOTO, Masami)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：90563817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞ソースとして、8週齢マウス乳腺から乳腺幹細胞(Mammary stem cells:MaSCs)を単離した。MaSCsはCD29hiCD24+の細胞群を含むpopulationであり、約2.5%の割合で再現性をもって得ることができた。足場としてMammary fat pads(MFPs)を用い、MaSCsを含む細胞群を3週齢マウスの左右のMFPsに移植した。4週後には移植した細胞群が生着し、管状の組織を形成していることを確認した。移植8～12週後には、連続した管状様構造を呈する部分とともに、筋上皮様の薄い細胞構築を認める部分も一部確認でき、乳汁の分泌を思わせる領域を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌の罹患率は増え、若年乳癌患者も増えている。若年乳癌患者の問題点としては、乳房切除によって乳汁分泌機能が失われることにある。乳汁産生機能を有する乳腺を再生することができれば非常に有意義であると考えた。そこで今回、われわれは、乳腺局所の幹細胞である乳腺幹細胞(Mammary stem cells: MaSCs)に着目した。まずマウスの乳腺からMaSCsを含む細胞の集団を単離し、マウスの乳腺近傍にある脂肪組織に移植した。移植4週後には細胞群が生着し、移植8～12週後には、一部で乳腺様の構造部分が確認できるとともに、乳管内に乳汁滴と思われる部分を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：To generate the functional mammary gland, we focused on mammary stem cells (MaSCs) which are the local stem cells, and can differentiate to myoepithelial and luminal cells constructing the mammary gland. We could isolate the cell populations including 2.5% MaSCs from mammary glands of 8 weeks female mice. And then, we implanted these cells including MaSCs to mammary fat pads of 3 weeks female mice. After 4 weeks, the implanted cells could survive in the mammary fat pad. After 8 to 12 weeks, the implanted cells could form the mammary gland-like structures, and myoepithelial cells were recognized in some areas. Moreover, there were milk drop-like lesions produced inside the mammary gland-like structure.

研究分野：医歯薬学 乳腺外科学

キーワード：乳房再建 乳腺幹細胞 乳汁分泌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国での乳癌罹患率は 30 歳代から増加をはじめ 40 歳代後半でピークを迎え、特にこの世代の乳癌患者では乳房切除後の body image の変化に対する抵抗感、性生活に与える影響が大きい。加えて、乳癌の 5-10%は遺伝性を有しており、原因遺伝子の 1 つである BRCA1/2 に遺伝子変異を有する女性では乳癌を発症するリスクが高いことがわかっている。BRCA1/2 変異のある女性に対するリスク低減乳房切除術は、乳癌発症リスクが確実に減少することが知られているが、女性にとって乳房切除後の喪失感切実な問題であり、これらを背景に 2013 年に乳房再建術が保険適応となった。現在、乳癌手術後の乳房再建には主に自家組織(広背筋皮弁、腹直筋比弁)、人工物による再建が行われている。

一方で、自己皮下脂肪組織由来細胞や自己脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた乳房再建も行われ、有用との報告もあるが、しかしこれらはあくまで volume を回復させることのみであり、本来の乳汁産生・分泌といった機能を再生できないということが現状の問題点であった。

特に若年乳癌患者においては、適切な術後治療を行ってれば、自然妊娠は可能で、妊孕性に影響を及ぼすような治療を受ける際にも生殖補助医療の進歩により、妊娠・出産の可能性が広がってきている。以上の背景から、今後増加することが予想されるリスク低減乳房切除術後、若年乳癌患者の乳房切除後に、機能を有する乳房を再生することは解決すべき課題であると考えた。

そこで今回、局所の幹細胞である乳腺幹細胞(Mammary stem cells: MaSCs)に着目した。乳管上皮は基底上皮細胞系と管上皮細胞系の 2 つの細胞系列からなるが、MaSCs はその 2 つの上皮細胞へ分化する局所の幹細胞であることが知られており、今回の実験系での細胞ソースとして使用することを考えた。

種々の臓器の再生医療においては、細胞ソースに加えて、in vivo の細胞外マトリックスを再現するための足場が重要であるとされている。乳腺領域での足場の候補としては、すでに報告のされている乳腺周囲の脂肪組織、マウス Abdominal adipose tissue extracellularmatrix を使用することにした。

### 2. 研究の目的

乳汁分泌機能を有する乳房の再生のための細胞ソースとして MaSCs を用い、乳汁産生機能を有する乳腺を造ることが目的であった。

### 3. 研究の方法

(1)マウス乳腺から MaSCs を単離し、マウスの MFPs に移植し MaSCs の生着の有無を評価する。

#### マウス乳腺からの MaSCs の単離

Shackleton らの方法(Nature 2006)に準じて行う。8 週齢の雌マウス(C57BL/6)から乳腺を切除し、組織を機械的に細分化する。細分化組織は、5%FBS、300U/ml collagenase、100U/ml hyaluronidase を含む EpiCult™-B で 37、8h で分解する。450×g、5min の遠心後、RBC は 0.64% NH4Cl 内でピペッティングにより除外する。単細胞懸濁液は、0.25%trypsin 内で 1-2 分間ピペッティング、5mg/ml dispase と 0.1mg/ml DNase 内で 2 分間ピペッティングを続けて作成する。結果的に得られた懸濁液を 40-µm ナイロンメッシュで濾過し、CD45、TER19、CD31 抗体を用いて、造血系および上皮系細胞を除外する。Mouse Mammary Stem Cell Enrichment Kit(EasySep™)を使用し、磁気ビーズによって乳腺上皮細胞を濃縮する。細胞を  $0.5 \times 10^6$ /ml に調整し、1 次抗体(CD29・CD24)を加え、FACS を行い、CD24(+)、CD29(hi)、Lin(CD45、CD31、TER19)(-) 群を MaSCs とする。

#### MaSCs のマウス MFPs へ移植

ヒトでいう若年女性や妊娠女性を想定し、処女マウスと妊娠マウスを使用する。ドナーとレシピエントの区別を明確にするためにレシピエントに GFP マウス(B6 由来)を使用する。(1)にて単離し、 $1.0 \times 10^6$ /ml に調整した MaSCs 懸濁液を、処女マウスおよびあらかじめ妊娠マウスの MFPs に移植する。Shackleton らの方法(Nature 2006)に準じて、処女マウスは移植後 8・10 週目に犠牲死、妊娠マウスは妊娠 10 日・19 日に出産後に犠牲死させ、MaSCs の生着・分化を評価する。生着・分化：無染色・H-E 染色にて形態的に評価し、乳汁産生機能の評価：Nuclear fast red 染色にて評価する。

(2)マウス乳腺周囲脂肪組織を脱細胞化して DATS を作成し、MaSCs と DATS で作成した乳腺をマウスの乳腺切除部位に移植し、生着および生体環境下で機能を有するかどうか評価する。

#### DATS を作成する。

マウスの腹部脂肪組織を採取する。純水(含 NaCl solution(0.5M and 1M)、0.25% trypsin/EDTA、1% Triton X-100, and isopropanol)中で -80 での凍結・室温解凍を 3 サイクル行う。標本を凍結乾燥、70% ethanol で消毒し、PBS ですすぐ。サンプルは使用するまで 1% penicillin/streptomycin を含有する PBS の中に 4 で保存する。サンプルを 10% formalin で固定、paraffin 包埋し、5µm の切片を作成する。DATS の足場としての妥当性について、H-E 染色にて評価する。

DATS に MaSCs を移植して乳腺を作成し、マウスの乳腺切除部位に移植する。

ヒトでいう若年女性や妊娠女性を想定し、処女マウスと妊娠マウスを使用する。  $1.0 \times 10^6$ /ml に調整した MaSCs 懸濁液を DATS に移植して乳腺を作成し、あらかじめ乳腺を切除した後の切除部位に移植する。処女マウスは移植後 8・10 週目、妊娠マウスは妊娠 10 日・19 日・出産後に犠牲死させ、生着・分化：無染色・H-E 染色にて形態的に評価し、さらに、移植した MaSCs が管上皮細胞・筋上皮細胞へ分化したかどうかについて、CK5/14, Lgr5, Eif5, p63 などの免疫組織染色にて評価する。加えて、乳汁産生機能の有無を Nuclear fast red 染色にて評価する。

#### 4. 研究成果

マウス乳腺からの MaSCs の単離を Shackleton ら (Nature 2006) のプロトコールに準じて行った。MaSCs は CD29hiCD24+ の細胞群を含む population であり、8 週齢マウスでは安定的に約 2.5% の割合で抽出することができ、再現性も得ることができた。

次いで、Deome らのプロトコール (Cancer Res. 1959) に準じて、MaSCs を含む細胞群の移植を行った。レシピエントについては、3 週齢マウスの左右の Mammary fat pads (MFPs) に移植することとし、4 番目の乳腺領域から乳頭・成長乳腺・血管を切除後、0.04% trypan blue/50% FCS の PBS で懸濁した MaSCs を含む CD29hiCD24+ の細胞群を計  $2.0 \times 10^5$ /計 1ml 調整し、そのうち 0.5ml ずつを左右の MFPs に移植した。この手技を習熟するのに時間を要したものの、徐々に安定的にモデル作成できるようになった。移植 4 週間後には移植した細胞群が生着し、H-E 染色にて管状の組織を形成していることを確認することができた。さらに免疫組織染色を加えて乳管上皮・筋上皮の形成の有無、乳汁の有無について検討した。移植 8~12 週間後には、一部管状様構造を呈する部分を認めるとともに、ところどころで筋上皮様の薄い細胞構築を認める部分も確認できたものの、系統的な連続した乳管様構造を確認するまでには至らなかった。一方で、Congo red 染色では、一部で乳汁の分泌を思わせる染色領域を確認することはできた。組織像で乳管構造を思わせる領域が確認できたことから、移植 12 週間後のマウスに動物用 MRI の撮像を行ったが、乳管の構造を確認することはできなかった。

MaSCs を DATS に移植する実験系についてはプロトコールに準じて数回繰り返し行ったが、当初の予定通り進まず結果を得ることはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丹黒 章  (TANGOKU Akira)  (10197593)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授    (16101)	
研究分担者	鳥羽 博明  (TOBA Hiroaki)  (40403745)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教    (16101)	