

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10014

研究課題名（和文）自己末梢血単核球増幅細胞を用いた脂肪組織移植生着率の向上のための基盤技術開発

研究課題名（英文）Fundamental Technology Development for Improving Engraftment Rate of Adipose Tissue Transplantation Using Autologous MNC-QQ Cells

研究代表者

藤村 聡 (Fujimura, Satoshi)

順天堂大学・医学部・特任助教

研究者番号：00517542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：乳がん患者乳房切除術後の乳房再建成績向上による患者QOL改善のため、脂肪組織とともに血管形成を誘導する自己末梢血単核球生体外増幅(MNC-QQ)細胞を移植することで移植組織内に酸素、栄養の供給を行い、移植脂肪組織生着率の向上を目的として本研究を実施した。マウス脂肪組織移植における脂肪生着率、血管形成の向上などを確認したのち、ヒト由来MNC-QQ細胞をヒト脂肪組織移植に用いる検討を免疫不全マウスにおいて実施した。この結果、移植脂肪組織の生着率の向上、血管密度の増加など脂肪移植におけるMNC-QQ細胞の効果が確認された。この結果を基にヒトにおける再生医療臨床研究の実施準備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において脂肪組織とともに血管形成を促進するMNC-QQ細胞を移植することで移植脂肪組織の生着率を向上する新規脂肪移植法の実用化に向けた技術基盤が確立された。本研究の成果は乳がん患者乳房切除術後の乳房再建に留まらず、顔面半側萎縮症などの変性疾患・先天性疾患に伴う皮下軟部組織欠損、外傷後の皮下軟部組織欠損、HIV治療などによる薬剤性脂肪萎縮、乳房再建後小修正など脂肪組織を用いる再建術に広く応用が可能であり、移植成績の向上により患者QOLが改善する可能性がある。本研究の成果を基にヒトにおける再生医療臨床研究の実施準備を進めている。

研究成果の概要（英文）： This study was conducted with the aims of increasing QOL of breast cancer patients after mastectomy by improving the results of breast reconstruction by increasing the engraftment rate of transplanted fat grafts. The transplantation of adipose tissues with MNC-QQ cells, which cultured peripheral blood mononuclear cells through quality and quantity culture, that provide oxygen and nutrients within the transplanted tissue by through the vascular formation. After confirming the improvement of fat engraftment rate and vascular formation in mouse adipose tissue transplantation, the human adipose tissue transplantation with MNC-QQ cells in immune-deficient mice are conducted. The effects of MNC-QQ cells on fat transplantation, such as the improvement of the engraftment rate of transplanted adipose tissue and the increase in vascular density, was confirmed. Based on these results, the clinical research of adipose tissue transplantation with MNC-QQ cells on regenerative medicine is prepared.

研究分野：再生医学

キーワード：脂肪組織 血管再生 血管内皮前駆細胞 細胞移植 移植生着率向上

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がん患者乳房切除術後の乳房再建成績向上による患者QOL改善のため、脂肪組織とともに血管形成を誘導する自己末梢血単核球生体外増幅(MNC-QQ)細胞を移植することで移植組織内に酸素、栄養の供給を行い、移植脂肪組織生着率の向上を目的とする。MNC-QQ細胞は当研究室で開発され飛躍的な血管・組織再生能の向上を実現し、既にヒトにおける安全性と効果が示されている。本研究では安全性が担保されたMNC-QQ細胞を脂肪組織とともに移植することで高い正着率を示す新規脂肪移植法実用化の技術基盤として効果的な移植条件を検証しうるモデルマウスの確立を行い、効率が高く安全な移植法の確立と臨床応用を目指す。

2. 研究の目的

本研究は、脂肪移植による乳房再建術で酸素・栄養の不足による組織壊死抑制のため血管形成能・抗炎症能を有するMNC-QQ細胞を脂肪組織とともに移植することで生着率を向上する新規脂肪移植技術を開発し乳がん切除後のQOL向上を目的とする。

MNC-QQ細胞は、既に再生医療臨床研究において安全性と有効性が示された独自の血管・組織再生細胞群であり、他の幹細胞に比べ血管再生能に優れ、少量の血液から簡便に高い効果性を得ることができ、糖尿病など基礎疾患がある患者細胞の機能と数を改善する。また免疫細胞の極性制御により抗炎症能が向上し移植時の炎症制御が期待される。

脂肪組織とMNC-QQ細胞は患者自身より調製するため拒絶反応や多能性幹細胞で生じる腫瘍が生じにくい安全な治療法である。本法の実用化で日本女性悪性腫瘍罹患率のトップである乳がん後の乳房再建の成績向上により患者QOLの向上が期待される。

3. 研究の方法

(1) マウス細胞・組織を用いた細胞調製条件の最適化

使用するマウス系統の選択、選択したマウスを用いた脂肪組織調製及びMNC-QQ細胞の調製法を確立する。本研究では十分な量の脂肪組織とMNC-QQ細胞の調製が要求されるため、マウスの系統選択や遺伝子改変マウスの使用を検討する。ヒトで確立されているMNC-QQ細胞の調製はマウスでは未確立であり、マウスに最適なMNC-QQ細胞調製法を確立する。MNC-QQ細胞確立が困難な場合にはマウスEPC-QQ細胞の使用を検討する。

(2) マウス細胞・組織を用いた移植実験の確立と効果性の証明

調製法を確立後から移植法の確立を行う。レシピエントマウスには、ドナーと同じ系統のマウスを使用する。移植法の確立では、最適な脂肪組織の処理法、効果的な血管誘導のための脂肪組織とMNC-QQ細胞の最適混合比率、本試験に適した移植部位を決定する。必要に応じて脂肪組織に存在する脂肪幹細胞の利用を考慮する。同時に移植効果の評価法(生存率、組織解析、遺伝子発現解析)、移植条件及び検出法を確立し、効果性の証明に用いる。

(3) ヒト組織を用いる研究の準備

MNC-QQ細胞のマウス脂肪移植への効果性を証明したのち、ヒト脂肪組織及びMNC-QQ細胞を用いた検証を開始するための準備を行う。ヒト組織及び細胞を用いるため「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に基づき順天堂大学付属順天堂医院病院倫理委員会へ研究計画を提出し承認を受けて患者のリクルートを開始する。

(4) ヒト細胞・組織を用いた移植の検証

脂肪移植におけるMNC-QQ細胞の有効性についてヒト細胞及び組織を用いて証明する。ヒト脂肪組織採取法及びMNC-QQ細胞調製法は既に確立されている。レシピエントとして免疫不全マウスを用いてヒト脂肪組織移植におけるヒトMNC-QQ細胞の効果を実証する。

4. 研究成果

(1) マウス細胞・組織を用いた細胞調製条件の最適化

まず本研究においてモデルとして使用するマウス系統の選択、選択したマウスを用いた脂肪組織調製及びMNC-QQ細胞の調製法確立を目指した。当初、計画通りにヒトと同様にマウス末梢血を用いた生体外増幅培養(QQ培養)法(マウスMNC-QQ法)の開発を試みたところ、マウス1匹から採取できる末梢血量より調製される末梢血単核球数が少なく、最終的に得られるマウスMNC-QQ細胞が極微量となることより脂肪移植への応用のための条件検討に用いるには相当数のマウスが必要となることが判明した。そこでMNC-QQ細胞に代わり、使用実績のあるC57BL/6マウスを用いてマウス骨髄由来血管内皮前駆細胞であるKSL(c-kit陽性, Sca-1陽性, Lineageマーカー陰性)細胞を調製し、QQ培養へ供したマウス生体外増幅血管内皮前駆細胞(KSL-QQ)を用いて検討を行う事とした。C57BL/6マウスの使用は十分なKSL-QQ細胞の確保が可能であったこと、さらに鼠径部より十分量の脂肪組織の採取が可能であったこと、各種遺伝子改変マウスの母系となっていることから合理的な選択であると考えられる。また余剰な採取脂肪組織より脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)の採取が可能であった。

(2) マウス細胞・組織を用いた移植実験の確立と効果性の証明

マウス血管内皮前駆細胞であるKSL細胞をQQ培養法へ供したマウス生体外増幅血管内皮前駆細胞(KSL-QQ)を用いた検討として移植脂肪組織のボリューム、移植部位、移植細胞数等を決定した。その後移植法の検討としてC57BL/6マウス背部へ脂肪組織及び脂肪組織へ同系GFP+マウス由来のKSL細胞、QQ培養に供したKSL-QQ細胞、マウス脂肪組織由来間葉系幹細胞である脂肪幹細胞ASCをそれぞれ混合した組織を移植し経過を観察し解析を行った。この結果、KSL-QQ細胞を脂肪組織と共に移植した群において脂肪移植のみ、KSL細胞群、ASC群との比較において移植組織における生着率の向上(Figure 1)、血管密度の向上(Figure 2)及び新生血管内GFP陽性KSL-QQ細胞取込、脂肪組織の質向上、線維化抑制、炎症抑制が観察された。以上より脂肪移植時にマウスKSL-QQ細胞を混合し移植する方法が脂肪再建術の成績向上に寄与する可能性が示された。

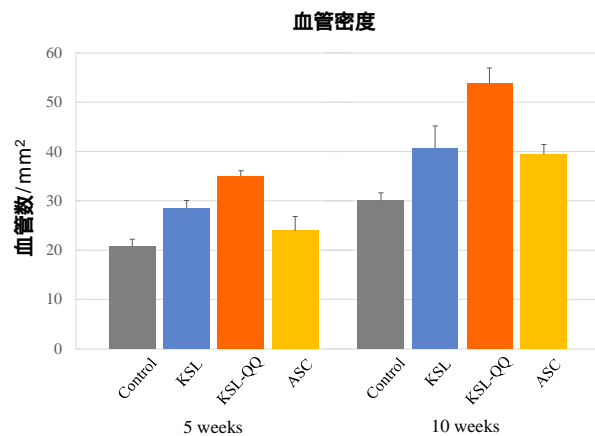


Figure 1

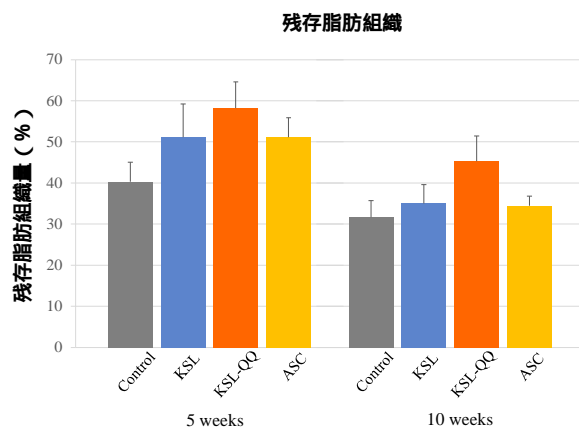


Figure 2

(3) ヒト組織を用いる研究の準備

(2)の結果より、ヒトの脂肪組織移植においてMNC-QQ細胞を添加が脂肪組織生着率向上に効果を示す可能性が示唆されたことより、ヒト脂肪組織の使用に向けて、脂肪除去術などで廃棄される脂肪組織及びヒト末梢血単核球を研究使用するため研究計画書、同意説明文書等を作成、本学医学系研究等倫理委員会へ提出、「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」に基づく審査の上、実施の承認を受けた。マウスでの検討を基に脂肪組織の調製法、調製した脂肪組織を移植する対象として適切な免疫不全マウスを選択などについて検討を行い、過去の実績等よりヌードマウス(BALB/cAJcl-nu/nu)を選択した。

(4) ヒト細胞・組織を用いた移植の検証

本学倫理審査の承認を得て実施するヒト脂肪組織及びヒト末梢血単核球(PBMNC)、MNC-QQ細胞またはASCに代わりヒト脂肪組織由来間質血管細胞群(SVF)を用いた検証を行った。ASCは脂肪組織から調製するが、調製までに時間を要することから採血のみで検体採取が可能なPBMNCやMNC-QQ細胞と異なり、脂肪組織を使用する同一検体からASCを調製する場合には2回の脂肪採取が必要となり倫理的にも研究参加者の心情的にも困難であるために本研究ではASCに代わりSVFを用いることとした。本研究に用いたヒトMNC-QQ細胞は既に報告されているように高い血管再生能と抗炎症性を示し、これはPBMNC及びSVFと比較しても優位な性能であった。これらの細胞と脂肪組織混合したのち免疫不全マウス(ヌードマウス: BALB/cAJcl-nu/nu)へ移植し、1週間及び7週間後に残存する脂肪組織を比較したところ、1週間、7週間ともにMNC-QQ細胞群及びSVF群で有意に残存している脂肪の重量が増加しており、生着率の向上(Figure 3)が示された。一方で回収した組織における血管数を比較したところ、MNC-QQ細胞群で有意な単位面積当たりの血管数(血管密度)の増加が7週目で見られた(Figure 4)。さらに残存脂肪量と血管数の間に相関関係を解析したところ相関がみられ、血管形成能の向上により形成された血管による血流が上昇し、より多くの酸素や栄養などの供給が可能となることで脂肪生着率が向上したことが推測された。

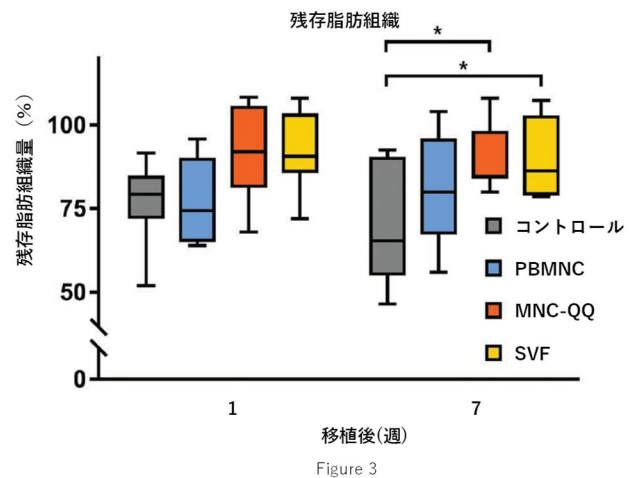


Figure 3

血管密度

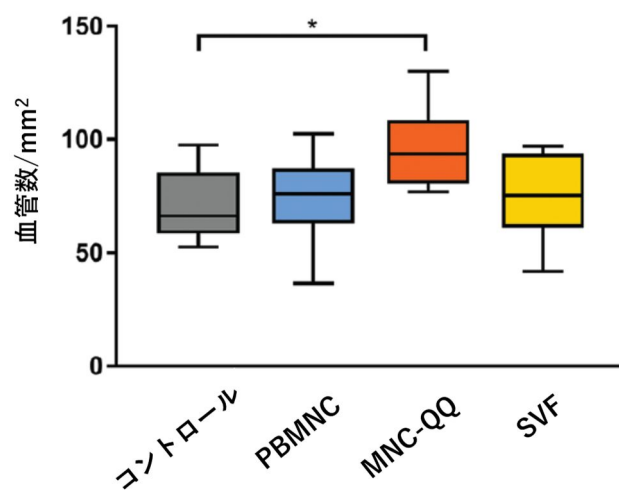


Figure 4

血管形成の促進と脂肪生着率が向上するメカニズム解析として移植脂肪組織の解析を行い、

血管マーカーとヒト特異的マーカーを有する血管が観られた事より組織内でMNC-QQ細胞が血管を形成する細胞に分化している事を見出した。また、これらの移植脂肪組織におけるmRNA発現をqPCR法で解析したところ、MNC-QQ細胞を混合した移植脂肪組織内において有意に血管形成を促進するサイトカインであるVEGF-A（血管内皮細胞増殖因子）及びその受容体VEGFR-1（血管内皮細胞増殖因子受容体）の発現が有意に増加しており、この増加によって血管が誘導されたことが推測された（Figure 5）。さらに血管数の増加と相関して線維化が抑制されていることを見出し、これらの効果により移植脂肪組織の生着が向上していることが示唆された。

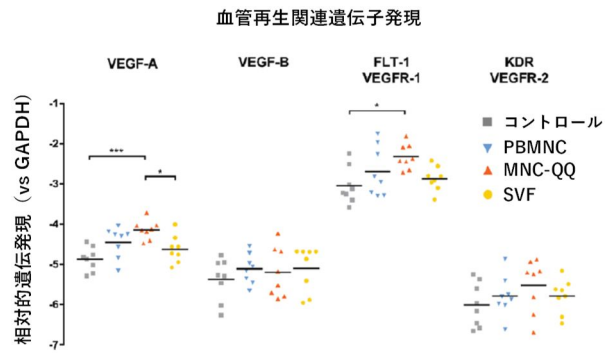


Figure 5

本研究の成果を基にまずは健常者を対象とした脂肪移植術へMNC-QQ細胞を供する再生医療を臨床研究として実施するため、他施設と共同で再生医療の実施に関して定められた「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に基づいた審査手続きを進め、再生医療等提供計画の提出を行っており、今後ヒトにおける脂肪移植術へのMNC-QQ細胞の応用について安全性及び効果性を確認するために準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 田中里佳、古川聖美、藤井美樹、藤村 聡	4. 巻 66
2. 論文標題 再生医療で血管再生・新生を担う（世の中の虚血をなくす）	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 形成外科 増刊	6. 最初と最後の頁 124-127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中里佳、藤井美樹、藤村聡、平野理恵、姜森、古川聖美、萩原裕子、水野博司
2. 発表標題 生体外増幅培養末梢血単核球細胞による創傷再発予防と神経再生の可能性
3. 学会等名 第14回日本創傷外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中里佳、藤井美樹、藤村聡、平野理恵、水野博司
2. 発表標題 CLTIに対する自己末梢血単核球生体外増幅培養細胞（MNC-QQ）移植の開発
3. 学会等名 第30回日本心血管インターベンション治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中里佳、藤井美樹、藤村聡、平野理恵、古川聖美
2. 発表標題 次世代の血管再生治療の開発
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤村聡、ジューロムス マキシム、春日（有田）佳代、水野博司、田中里佳
2. 発表標題 MNC-QQ細胞を用いた移植脂肪組織の血管形成及び生存率向上
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古川聖美、鹿内彩菜、藤村 聡、田中里佳
2. 発表標題 生体外増幅単核球RE01と脂肪由来間葉系幹細胞を用いた新規脂肪移植法の開発
3. 学会等名 第32回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古川 聖美、鹿内 彩菜、藤村 聡、田中 里佳
2. 発表標題 脂肪移植に適した脂肪由来間葉系幹細胞の開発
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

〔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	田中 里佳 (Tanaka Rica) (70509827)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	ジーロムス マキシム (Geeroms Maxim)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ベルギー	Vrije Universiteit Brussel.			