

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09866

研究課題名（和文）高機能化3D幹細胞塊の付加による新規脂肪移植法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel fat grafting method with ADSC spheroid

研究代表者

中桐 僚子（Nakagiri, Ryoko）

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10633753

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）：脂肪組織由来幹細胞（ASCs）を付加した移植脂肪は良好な生着率が報告されている。本研究はASCsを凝集塊にしたものを移植脂肪に付加することによって、移植脂肪の生着率のさらなる向上を目指した。

自己凝集化誘導技術（CAT）を用いて9格子構造を有するメッシュ状細胞凝集塊の作製に成功した。また、細胞の形態により成長因子の産生量が異なることを確認した。ASCを脂肪と共培養することにより脂肪塊の維持が確認できたが、ASC凝集塊の有用性は示せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己凝集化誘導技術（CAT）を用いてメッシュ状の細胞凝集塊の作製に成功した。細胞がメッシュ状の凝集塊の形態をとることにより細胞生着率の向上が期待できる。これは、脂肪以外の移植医療でも有用な可能性がある。細胞生着率が向上すれば細胞移植医療でさらなる効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Fat grafting with Adipose tissue-derived stem cells (ASCs) have been reported to have a good engraftment rate. In this study, we aimed to further improve the engraftment rate of transplanted fat by adding cell aggregates of ASCs to the transplanted fat.

We created cell aggregates to create spherical cell aggregates (spheroids) of different sizes, fiber-like cell aggregates, and mesh-like cell aggregates. We succeeded in fabricating mesh-like cell aggregates with 9-lattice structures using the guided self-aggregation technique (CAT).

In addition, it was confirmed that the amount of growth factor produced differs depending on the cell morphology. By co-cultivating ASC with fat, we were able to confirm the maintenance of the fat mass, but we could not demonstrate the usefulness of the ASC aggregate.

研究分野：形成再建外科

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 細胞凝集塊 スフェロイド 成長因子 脂肪移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍切除や外傷に伴う軟部組織欠損、先天性疾患による陥凹変形に対し組織増大術を必要とする患者は非常に多い。脂肪移植(注入)術は遊離皮弁術などと比較し侵襲の少ない簡便な方法だが、脂肪のみでは生着率が十分ではないため、複数回の手術が必要になる。近年、脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)を付加した脂肪細胞を移植することによりその生着率の改善が報告されている。一方、細胞は三次元的な球状塊(スフェロイド)を形成することにより、細胞本来の機能を発揮しやすくなると言われており多数の報告がされている。そこでASCの細胞塊(ASC塊)を付加した脂肪移植術を行うことにより移植脂肪の生着率向上、脂肪再生の促進が可能となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

脂肪生着・脂肪新生に関与するASCの機能を十分に発揮させることができるASC塊を開発し、そのASC塊を付加することによって、脂肪移植の生着率向上、脂肪新生促進を目的とした。

3. 研究の方法

ASCはWistarラット皮下脂肪から分離した細胞を用いた。

(1) ASCスフェロイド、ASCファイバーの作製

()ASCスフェロイドの作製

細胞低吸着処理プレートPrimeSurface®を用いてASCスフェロイドを作製し、細胞数によるスフェアの違いを検討した。

()ASCファイバー(線形凝集塊)、ASCメッシュ(網目状凝集塊)の作製

接着細胞の自己凝集化技術(Cell self-Aggregation induction Technology: CAT)を用いて、細胞の自発的な凝集化を誘導しメッシュ状の凝集塊の作製を行った。

まず単格子状の凝集塊を作製するのに適した条件を検討したのち、多格子メッシュの作製を行った。

()ASCメッシュの生着評価

メッシュ状細胞凝集塊の生態組織への生着性を調べるため、培養による*in vitro*評価を行った。ラットの皮下に正方形のシリコン板(2 cm×2 cm, 厚さ1 mm)を4週間埋植しシリコンを被覆化した真皮組織を生体真皮由来組織とし、これに赤色蛍光色素を用いて細胞を標識した9格子構造を有するメッシュ状細胞凝集塊を貼付して約1週間培養した。

(2)細胞の形態によるgrowth factor産生量の比較検討

ASC単層培養とASC-S(1万、5万、10万、20万 cells/sphere)を培養し培養上清中のVEGF,HGF,bFGFの産生量をELISA法で測定した。

(3)脂肪と共培養した際のgrowth factor産生量の比較検討

脂肪のみ、脂肪とASC、脂肪とASC-Sをそれぞれ培養し(2)と同様に培養上清中のVEGF,HGF,bFGFの産生量をELISA法で測定した。

(4)脂肪移植評価

脂肪のみ(脂肪300 μL+培地のみ200 μL)、脂肪とASC(脂肪300 μL+ASC懸濁液200 μL)、脂肪とASC-S(脂肪300 μL+ASC-S液200 μL)をヌードマウスに移植して移植直後、2週間後、4週間後にCTを撮影し体積変化を評価した。

ASCは脂肪1mLあたり300万 cellsの濃度とした。また、ASC-Sは2万 cells/sphereを用いた。

4. 研究成果

(1) ASCスフェロイド、ASCファイバーの作製

()ASCスフェロイドの作製

96well PrimeSurface®にASCを播種することにより1万 cells、5万 cells、10万 cells、20万 cellsのスフェロイドを作製した。細胞数が少なれば凝集が不十分になる傾向があったまた細胞数が多すぎると一度は凝集した細胞でも数日経過するとばらばらに崩れてしまった。(図1)

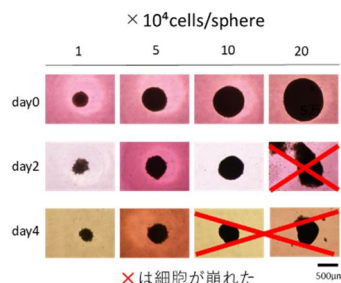


図1 細胞数とスフェロイドの関係

() ASC メッシュの作製

CAT ポリマーを培養皿に塗布して細胞の接着領域を規定する CAT 技術により、ASC メッシュの作製を行った。

まず、メッシュを構成する基礎となる単格子形状の作製条件の検討を行い、細胞単層は CAT 誘導表面の線幅が 4 mm 以下では剥離すると同時に格子形状を保ちつつ凝集化を生じて格子状の凝集塊を形成することがわかった。(図 2)

この結果をもとに、線幅が 2 mm の溝が縦横 4 本ずつ直行した 9 格子構造を有するメッシュ状のチャンパーを作製し細胞を播種して培養し、播種 1 日後に 9 格子を有するメッシュ状細胞凝集塊が作製できた。(図 3)

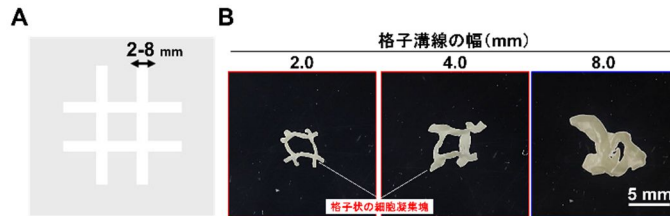


図2 幅の異なる溝線を有する格子状の培養チャンパー設計 (A) とチャンパー内に形成した細胞単層の一体凝集化により生じた細胞凝集塊の形態 (B) 赤枠写真: 格子状細胞凝集塊 青枠写真: 無秩序な形状の細胞凝集塊



図3 9格子を有するメッシュ状の培養チャンパーの設計 (A) と播種2時間後にチャンパー内に形成した細胞単層 (B-1) および約1日後に形成したメッシュ状細胞凝集塊 (B-2)

() ASC メッシュの生着評価

(*in vitro* 評価)

生体真皮由来組織に貼付したメッシュ状の細胞凝集塊は、貼付から約 30 分で培養液をその直上から添加しても剥離することなく組織表面に維持されていたことから接着していると判断した。さらに 7 日間培養を続けてもメッシュ状凝集塊の形状は肉眼的にほとんど変形することなく維持されていた。そこで、蛍光顕微鏡観察を行い細胞レベルでの組織表面の変化を調べた結果、培養 1 日後にはメッシュ状細胞凝集塊の間隙 (格子内) に赤色蛍光を発する凝集塊由来の細胞の点在が認められ、7 日後にはそれらの細胞は格子内の組織表面を完全に被覆化していることが分かった。(図 4)

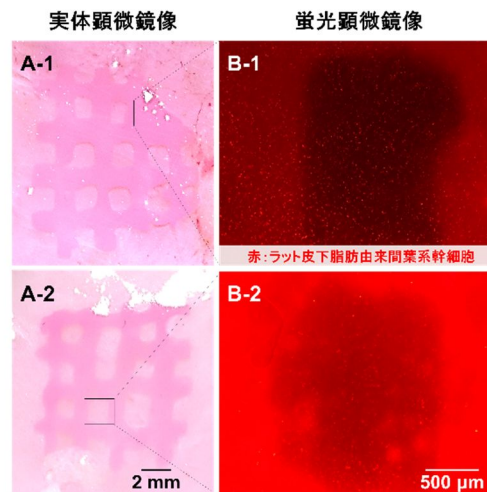


図4 生体真皮由来組織体に貼付した9格子構造を有するメッシュ状細胞凝集塊の培養1日後 (A-1, B-1) と7日後の (A-2, B-2) の実顕微鏡 (A-1, A-2) および蛍光顕微鏡 (B-1, B-2) による観察像

(2) ASC と ASC-S の growth factor 産生量の比較検討

単層培養 (ML)、1 万・5 万・10 万・20 万 cells のスフェロイドをそれぞれ培養し day 2、day 4 に培地を採取して growth factor 産生量を測定した。

VEGF は単層培養でもスフェロイドでも産生されていた。また、HGF は 1 万 cells のスフェロイドで長期的に産生されていた。bFGF は単層培養ではほとんど産生されていなかった。1 万 cells のスフェロイドで産生量が多かった。(図 5)

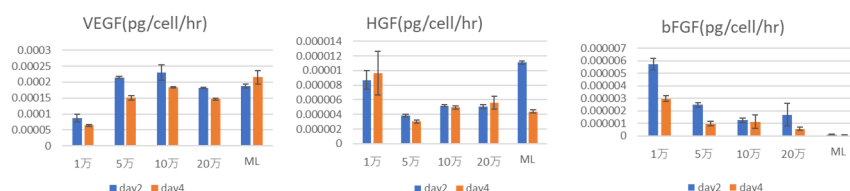


図5 growth factor 産生量

(3)脂肪と共培養した際の growth factor 産生量の比較検討
 脂肪のみ(control)、脂肪 + ASC(ASC)、脂肪 + ASC-S(ASC-S)をそれぞれ培養し、day2,5 に上清を採取した。ASC-S は 2 万 cells/sphere とした。

培養 5 日目の状態で ASC で脂肪塊の形態が最も維持されていた。(図 6)

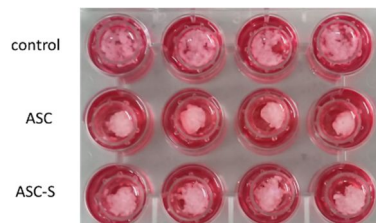


図6 共培養5日後の脂肪塊

VEGF は ASC で多く産生されていた。HGF も早期から ASC で産生が多く、時間が経過するとともに ASC-S でも産生量は増えた。VEGF、HGF は control では早期はほとんど産生されていなかった。bFGF は ASC ではあまり産生されていなかった。(図 7)

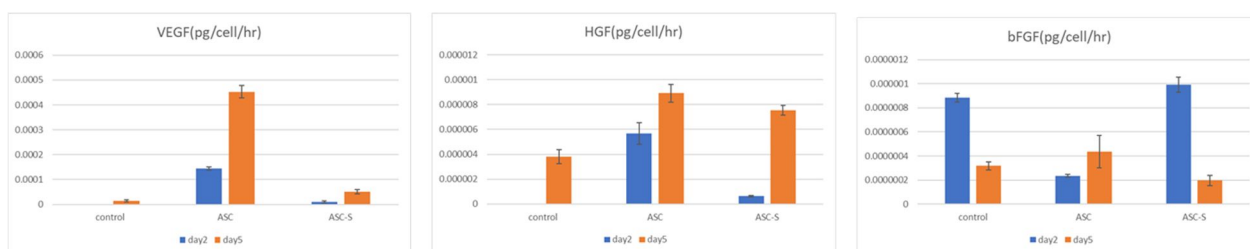


図7 共培養でのgrowth factor産生量

(4)脂肪移植実験

脂肪移植後の体積をCTで測定したが、体積変化に有意差はなかった。また、実際には血腫やしょう液腫形成があり、体積評価のみで脂肪生着率の評価が困難で移植方法の検討が必要と考えられた。

本研究では、ASC を懸濁液の状態では脂肪に付加するのではなく、スフェロイドにして脂肪に付加することで脂肪の生着率の向上を目指した。スフェロイドの優位性は示せなかったが、ASC 付加の有効性は示唆された。

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 Lupeng TENG, Ryoko NAKAGIRI, Yoshihiro KIMATA, Ryosuke IWAI	4. 巻 2
2. 論文標題 Preparation of mesh-shaped cell aggregated constructs using cell self-aggregation induction technology.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Bulletin of Research Institute of Frontier Science and Technology	6. 最初と最後の頁 31-35
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4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤魯鵬, 中桐僚子, 木股敬裕, 岩井良輔
2. 発表標題 細胞自己凝集化技術を用いたファイバー状細胞凝集塊の作製とex vivo組織培養評価
3. 学会等名 第93回日本組織培養学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北口陽平、中桐僚子、木股敬裕、岩井良輔
2. 発表標題 脂肪生着率向上のための細胞凝集付加型-脂肪移植法の組織培養による基礎的評価
3. 学会等名 第93回日本組織培養学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩井良輔
2. 発表標題 荷電高分子で細胞の接着力を制御し凝集化させる～接着細胞の自己凝集化誘導技術の開発と組織工学への応用展開～
3. 学会等名 日本生物工学会 生物工学シンポジウム2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滕魯鵬, 中桐僚子, 木股敬裕, 岩井良輔
2. 発表標題 細胞自己凝集化技術を用いた網目状細胞凝集体“CELL MESH”の作製
3. 学会等名 第57回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岩井良輔、高木睦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 コロナ社	5. 総ページ数 230
3. 書名 セルプロセッシング工学（増補）- 抗体医薬から再生医療まで -	

〔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	岩井 良輔 (Iwai Ryosuke) (60611481)	岡山理科大学・フロンティア理工学研究所・講師 (35302)	
研究分担者	渡部 聡子 (Watanabe Satoko) (20379803)	岡山大学・医学部・客員研究員 (15301)	

	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	滕 魯鵬 (Teng Lupeng)		

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	北口 陽平 (Kitaguchi Yohei)		

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