

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20199

研究課題名(和文) Collagen microfibers size effect on the reconstruction of vascularized adipose tissues for soft tissues regeneration applications

研究課題名(英文) Collagen microfibers size effect on the reconstruction of vascularized adipose tissues for soft tissues regeneration applications

研究代表者

Louis Fiona (LOUIS, Fiona)

大阪大学・大学院工学研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：70838523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳房再建は困難で、主な課題は再建した乳房への酸素・栄養供給不足であった。酸素・栄養を行き渡らせるためには血管構造が必要とする。そこで、コラーゲンマイクロファイバーをフィブリンゲルに埋め込み、ヒト乳房細胞を混合した注射用血管網形成脂肪組織(iPAT)を開発した。マウスの皮下移植実験で、iPATは3カ月後に非血管新生組織よりも高い細胞生存率と体積維持率を示した。これは、iPATには血管、リンパ管、神経血管が浸透しているためである。さらに、iPATは凍結保存可能で、自己細胞を使用した臨床応用も検証した。最後に、バイオプリンターとバイオリアクターを使用して組織のスケールアップを実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

欠損した軟部組織を治療するための脂肪組織再生技術は、幅広い臨床応用が期待できる。自家細胞から成るiPAT組織球体を大量に培養し、スケールアップに成功したことから本iPAT技術は非侵襲的な組織再生を可能とし、長期的な治療効果をもたらすことが出来る臨床現場に資する技術であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Breast reconstruction is challenging, needing vasculature structure for a longer lifespan. We thus developed injectable prevascularized adipose tissues (iPAT), made from physiological collagen microfibers embedded in fibrin gel, mixed with cells naturally found in human breast: adipocytes, adipose-derived stem cells and endothelial cells.

The tissues were validated using murine subcutaneous implantation. After 3 months, they showed a higher cell survival and volume maintenance than non-prevascularized tissues. This higher survival was due to the greater amount of blood vessels found, also involving infiltration by lymphatic and neural vasculature networks. Furthermore, the iPAT can be cryopreserved for later reinjection and the process was validated using autologous cells (cells from the same patient) for clinical application. Finally, the scale-up of the process was performed by using a bioprinter for seeding the tissues and a bioreactor for the culture before injection.

研究分野：Tissue engineering

キーワード：adipose tissue breast reconstruction vascularization tissue injection soft tissue regeneration

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

乳がんは世界中の女性において最も多いがんであり、年間 200 万件以上の新規症例がある。乳房再建は需要が高く、患者は人工インプラントに付随する問題を避けるために生体由来のインプラントを好む。例えば、表面に凹凸加工が施されたテクスチャード乳房インプラントは乳房インプラント関連未分化大細胞リンパ腫との関係が報告されている。現在の生体由来インプラントでは自家脂肪組織を再注入しているが、脂肪細胞の生存率が低いため再注入後インプラントの容積が減少してしまい、かつその減少が予測できないという課題を抱えている (1)。移植した脂肪組織の生存率を向上させるために、移植前の脂肪組織に血管網を形成することを目指した研究が現在取り組まれている。血管網形成によって、組織の安定性と機能が向上し、生体由来の乳房再建の結果が改善される可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、乳房再建に使用される脂肪移植片の構造と生存率の改善を目的とした。移植前の脂肪移植片に血管網を形成することで、その機能を高めることが期待できる。血管網形成のために、成熟した脂肪細胞、幹細胞、内皮細胞を支持足場と混合し、生体外で球体の脂肪組織を作製する。移植片が最大 2 か月生存するためには、幹細胞、成熟した脂肪細胞、支持足場が必要と報告されている (2)。我々の生体内に多く存在するコラーゲンタイプ I (3) は、脂肪細胞の生存に適した足場であると考えられる。既にヒトの種々組織や臓器の再構築に使用されているブタ由来のコラーゲンは忍容性が良好であり、炎症や免疫反応を引き起こさない。免疫反応のリスクがある場合、幹細胞を加えることで、局所の免疫反応を調節できる (4)。また、血管網を形成することで、組織の適切な機能と安定性を確保できる (5)。

3. 研究の方法

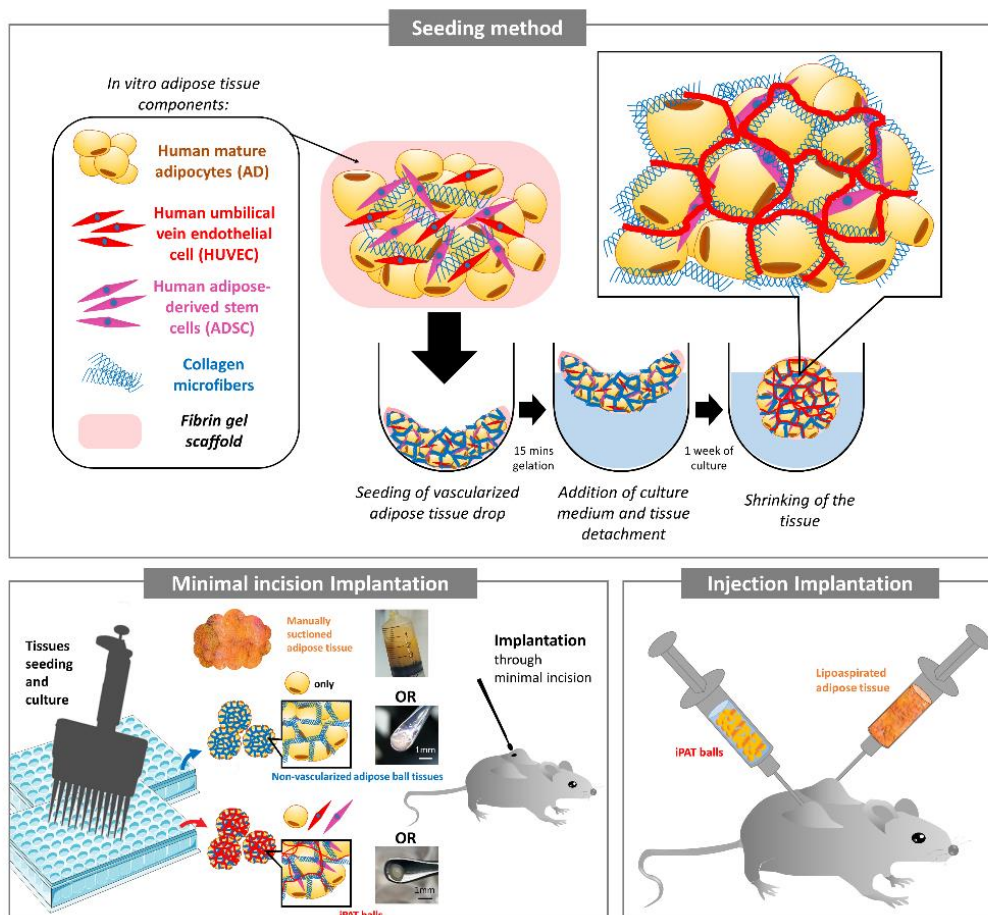


図 1: 球状組織 (iPAT) の細胞培養プロセスとマウスへの移植。

血管網が全体に行き渡った脂肪組織を移植前に創製するために、成熟脂肪細胞、脂肪由来幹細胞 (ADSC)、脂肪内皮細胞という 3 種の重要な脂肪細胞の機能を保存することが必須であった。我々の既報の研究成果では、ブタ由来のコラーゲン微細繊維 (CMF) をヒト成熟脂肪細胞、ヒ

トADSC、臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）と混合することで、7日以内に血管網形成した微小な脂肪球体を作製できることを示した（6）（図1）。この球体組織を iPAT（injectable prevascularized adipose tissue；注入可能な血管付き脂肪組織ボール）と名付け、iPAT 作製に適切な播種容積を検討した。その後、組織片の播種にはバイオプリンタを、組織片培養にはバイオリアクタを導入することで、より大きな組織を構築するための一連のプロセスを自動化することに成功した。さらに、作製した組織をマウスの皮下に移植し、1カ月後と3カ月後の安定性評価を通して、組織の生存率に問題ないことを確認した。また、異なる患者からの HUVEC は実際の移植には適さないため、患者自身の脂肪組織から採取された ADSC を分化操作し、得られた内皮細胞を使用することで組織片の作製プロトコルをさらに改善した。

4. 研究成果

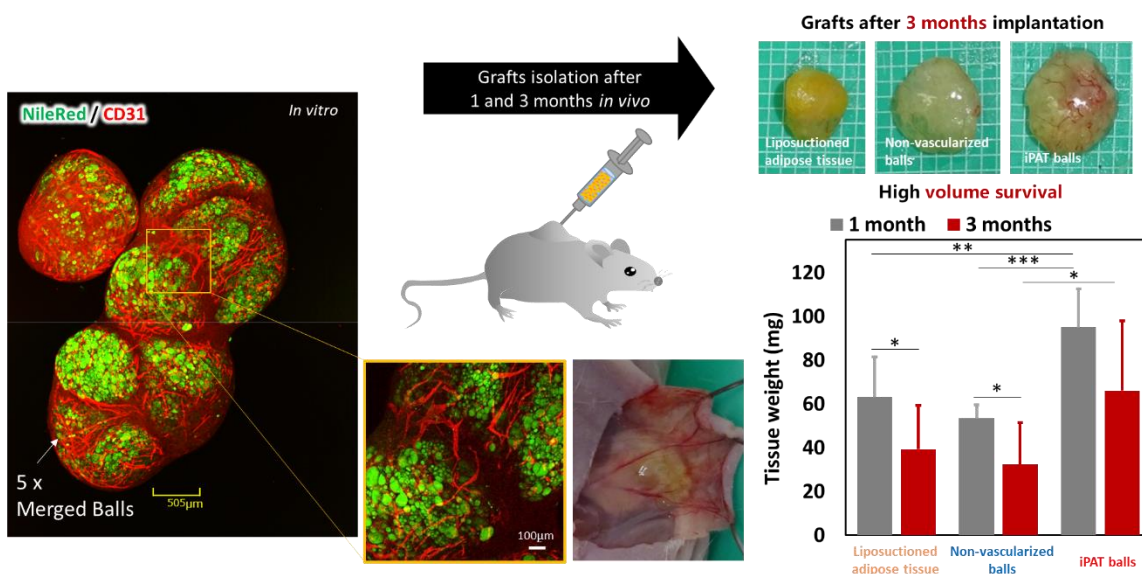


図 2: 血管網を形成した iPAT の球体は結合して、より大きなサイズの組織を作り出すことができる。これは移植後にも起こり、時間を経て組織のより高い安定性につながる。

マウスに血管網形成した脂肪組織（iPAT）を移植し細胞生存率を解析した結果、血管網形成していない組織球体や脂肪吸引した移植球体に比べ、iPAT 中の細胞生存率は高く（ $84 \pm 6\%$ ）、体積も維持されていた（最大 2 倍重）（図 2）。他の条件と比較して iPAT の細胞生存率が高かったのは、より多くの血管が発達していたこと（最大 1.6 倍）、またその血管が宿主の血管と適切に繋がっていたこと（人間/マウスの管腔割合： $51 \pm 1\%$ ）に起因すると考えられる（図 3）。加えて、リンパ管や神経網も組織内に浸潤していた。iPAT 技術では後の再注入のために凍結保存が可能であり、非侵襲かつ長期的な組織再生が実現できる。RNA シーケンシングにより、当モデルの優れた生存率が確認され、血管形成に関連する遺伝子や内皮細胞の増殖・移動に関連する遺伝子発現が向上していることも示された。移植された組織内には、3 か月経過後もヒト血管網が保たれていた。ヒト由来の細胞のみで構成される脂肪球体の作製も達成した。ヒトの乳房再建のため、バイオリアクタを利用することで、1000 個もの組織球体を同時に培養するというスケールアップにも成功した。

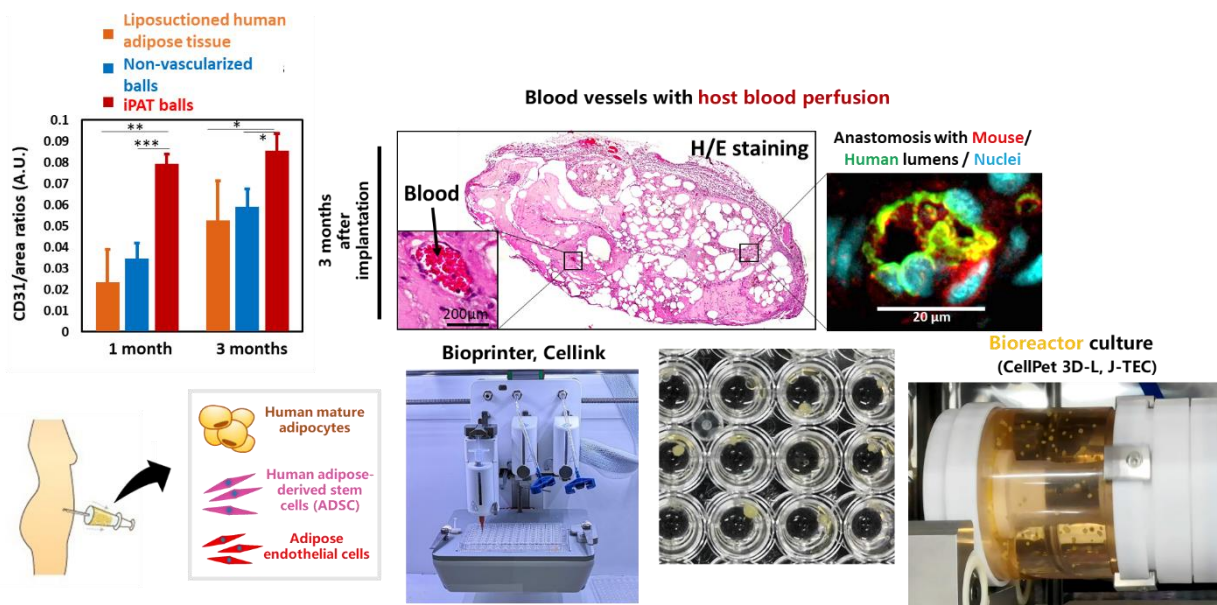


図 3: 移植された iPAT は他の条件と比較し、より多くの血管が宿主と接続していた。また、このプロセスは自家細胞を用いて行うことができ、バイオブリンターやバイオリアクターを使用することで臨床応用のためにスケールアップが可能である。

<引用文献>

- (1) Eto H et al. *Plast Reconstr Surg.* 2012; 129(5):1081-92.
- (2) Mojallal A et al., *Aesthetic Plast Surg.* 2011;35(6):1061-72.
- (3) Young D.A. et al., *Acta Biomater.* 7 (2011) 1040-1049.
- (4) Parker D.M. et al., *Curr Surg*, 2006, (63)255-258.
- (5) Angelo A et al., *BioMed Res Intern.* 2013: 383685.
- (6) Louis F et al. *Acta biomaterialia*, 2019, (84), 194-207.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Louis Fiona, Sowa Yoshihiro, Kitano Shiro, Matsusaki Michiya	4. 巻 7
2. 論文標題 High-throughput drug screening models of mature adipose tissues which replicate the physiology of patients' Body Mass Index (BMI)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioactive Materials	6. 最初と最後の頁 227 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioactmat.2021.05.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fiona Louis, Marie Piantino, Hao Liu, Dong-Hee Kang, Yoshihiro Sowa, Shiro Kitano, Michiya Matsusaki	4. 巻 1412542
2. 論文標題 Bioprinted Vascularized Mature Adipose Tissue with Collagen Microfibers for Soft Tissue Regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cyborg and Bionic Systems	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34133/2021/1412542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Louis Fiona, Sowa Yoshihiro, Irie Shinji, Higuchi Yuriko, Kitano Shiro, Mazda Osam, Matsusaki Michiya	4. 巻 11
2. 論文標題 Injectable Prevascularized Mature Adipose Tissues (iPAT) to Achieve Long Term Survival in Soft Tissue Regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Healthcare Materials	6. 最初と最後の頁 2201440 ~ 2201440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adhm.202201440	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 -
1. 著者名 Karanfil Asl? Sena, Louis Fiona, Matsusaki Michiya	4. 巻 10
2. 論文標題 Biofabrication of vascularized adipose tissues and their biomedical applications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Materials Horizons	6. 最初と最後の頁 1539 ~ 1558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2MH01391F	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 5件）

1. 発表者名 F. Louis, Y. Sowa, S. Kitano, M. Matsusaki.
2. 発表標題 Unraveling vascularized adipose tissue reconstruction by using collagen microfibrils allows multiple applications from breast regeneration to bioprinted cell-cultured steak-like meat.
3. 学会等名 Society for Biomaterials, Special Symposium "Women in Biomaterials" (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 F. Louis, Y. Sowa, S. Kitano and M. Matsusaki.
2. 発表標題 Towards long-term survival soft tissues regeneration by injectable prevascularized mature adipose tissues (iPAT).
3. 学会等名 Asian Biomaterials Conference/ Japanese Society for Biomaterials (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fiona Louis, Yoshihiro Sowa, Shiro Kitano, Michiya Matsusaki
2. 発表標題 Prevascularized injectable adipose balls tissues for cryopreservable and custom-fit soft tissues reconstruction
3. 学会等名 Kansai Biomaterials Conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fiona Louis, Yoshihiro Sowa, Shiro Kitano, Michiya Matsusaki
2. 発表標題 Injectable Vascularized Mature Adipose Balls for Soft Tissues Regeneration Applications
3. 学会等名 World Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fiona Louis, Yoshihiro Sowa, Shiro Kitano, Michiya Matsusaki
2. 発表標題 Vascularized Mature Adipose Tissue Model for Obesity-Related Drug Screening Application
3. 学会等名 World Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fiona Louis, Yoshihiro Sowa, Shiro Kitano, Michiya Matsusaki
2. 発表標題 Using Collagen Microfibers to Unlock in vitro Vascularized Mature Adipose Tissue Regeneration: Applications to Patients derived Drug-screening Models and Breast Reconstruction.
3. 学会等名 European Society for Biomaterials (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 Cell construct and cell construct production method	発明者 史朗北野, 新司入江, 典弥松崎, フィオナ ルイス, 善弘素輪	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02020203369A1	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 METHOD FOR FREEZING CELL STRUCTURE	発明者 Matsusaki, Louis, Kitano, Sowa	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/038303	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------