

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16919

研究課題名（和文）革新的な乳房再建術のための脂肪由来幹細胞と生体外増幅単核球の相互作用の解析

研究課題名（英文）Analysis of the interaction between adipose derived stem cells and ex vivo expanded mononuclear cells for innovative breast reconstruction

研究代表者

古川 聖美（Furukawa, Satomi）

順天堂大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号：00896475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、血管再生が得意な生体外増幅単核球（RE-01細胞）と脂肪再生が得意な脂肪由来間葉系幹細胞（ASC）を共培養することで、ASCの脂肪分可能や血管形成能が向上することを示した。また、ヌードマウス背部脂肪移植実験にて、RE-01共培養ASCが従来のASCと比較し、移植脂肪組織中の血管新生を促進させ、移植脂肪組織の生着率を向上することが明らかとなった。本研究により、RE01細胞と共培養したASCの脂肪移植における有効性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RE-01細胞は、本研究室で開発された少量の末梢血から短期間で製造可能な、高い抗炎症作用・免疫寛容・抗線維化・血管再生能を有する細胞集団である。膠原病およびパージャラー病の難治性潰瘍患者に対する医師主導治験を実施している。ASCは、世界中で多くの製品が開発され、安全性の高さも認知されている。本研究では、乳がん患者の乳房再建術における脂肪移植を対象としたが、RE-01細胞と共培養したASCは脂肪に限らず様々な細胞・組織・臓器移植の生着率を向上する細胞となりうる。将来的な展望として、これまで間葉系幹細胞移植では効果が不十分であった疾患にこの合剤を用いることで治療可能となる疾患が増える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that co-culturing ex vivo expanded mononuclear cells (RE-01 cells), which specialize in vascular regeneration, with adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs), which specialize in adipose regeneration, enhances the adipogenic and angiogenic potential of ASCs. Furthermore, in a nude mouse dorsal fat transplantation experiment, it was revealed that ASCs co-cultured with RE-01 cells promoted angiogenesis and improved the engraftment rate of the transplanted adipose tissue compared to conventional ASCs. This study thus demonstrated the efficacy of ASCs co-cultured with RE-01 cells in fat transplantation.

研究分野：再生医療

キーワード：細胞治療 脂肪移植 末梢血単核球 間葉系幹細胞 乳房再建

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳がん患者は年々増加傾向にあり、2019年における罹患数は9万件を超えた。そのうち、乳房切除を受ける患者は約40%にものぼる(O'Halloran et al. Breast Cancer 2017)。乳房は女性の象徴であり、乳房切除によって受けるダメージはbody imageの低下・性機能の低下など精神的苦痛が多く認められる。乳房切除術後の患者を対象とするアンケート調査が世界中で多数実施されており、乳房再建により患者のQOLが向上するという報告がされている(Archangelo et al. Clinics(San Paulo) 2019)。現在、我が国において保険適応となっている乳房再建術には人工インプラントと皮弁移植があるが、様々な改善すべき点があり理想とは遠い現状である。自然な乳房を低侵襲に作成できる方法としては自家脂肪移植がある。

しかし、吸引した脂肪を移植するだけでは、大血管の不足から移植組織の酸素・栄養不足により、生着率が低く、移植組織の壊死や線維化が問題となっている。乳がん患者のQOL向上のための理想的な乳房再建術とは、低侵襲・低コストでより自然な乳房を長期間維持可能な方法であり、自家脂肪移植の欠点である生着率を改善することが必須である。

その背景の下、申請者は、脂肪組織由来間葉系幹細胞ASCと異なる別の細胞の組み合わせで治療効果の向上の報告(Yang et al. Stem Cell Int 2020)を手掛かりとして、ASCと血管形成能に優れた細胞を混合することを着想した。当研究室で開発された生体外培養増幅単核球(RE-01細胞)は、組織に豊富な血管を再生させる能力を持つ。少量の末梢血から約1週間で製造でき、高い抗炎症作用・免疫寛容・抗線維化・血管再生能を有する細胞集団であり、有効性・安全性が確認されている。この血管再生能に優れたRE-01細胞とASCとを合剤にすることで少量の脂肪から生着率の高い再生乳房を作ることができ、そして、RE-01細胞とASCは移植脂肪組織への血流が改善し、生着率が向上することが期待できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、血管再生能に優れたRE-01細胞と脂肪分化・免疫寛容作用に優れたASCの合剤を軸とした、少量の脂肪から生着率の高い脂肪移植を可能とする分子指標に基づく乳房再建技術の開発を主な目的とした。

### 3. 研究の方法

倫理委員会承認済みの臨床研究において、手術時に廃棄される脂肪組織よりASCを製造した。自家RE-01細胞はASCと同一患者より、他家RE-01細胞は健康人ボランティアより採血して製造した。

#### (1) in vitro 実験におけるASCとRE-01細胞の相互作用の解明

In vitro 実験系において、RE-01細胞がASCの脂肪分化能および血管形成能に与える影響について解析した。具体的にはTube Formation assayやEPC culture assayで血管形成能、脂肪染色にて脂肪分化能を評価した。

#### (2) 他家由来のASCとRE-01細胞における確認

将来的に患者由来RE-01細胞と健康人由来ASCの合剤を作ることを目的とするため、他家由来のASCとRE-01細胞を共培養した場合も検討し、自家由来細胞と同等の効果を示すこと、および免疫拒絶反応が起こらないことを確認した。

#### (3) in vitro 実験結果から最適なASCとRE-01細胞の混合比率を決定

(1)の結果より、ASCの脂肪分化能および血管再生能を最大限向上させつつ、実臨床において実現可能なRE-01細胞の混合比率を決定する。RE-01細胞は一度の採血から製造可能な細胞数に制限があることを踏まえ、(4)のin vivo 実験を行うための細胞比率を決定した。

#### (4) 脂肪移植における脂肪組織とASCとRE-01細胞の最適な混合比率の確立

in vivo 実験として、ヌードマウスを用いた背部脂肪移植実験を行い、移植片の生着率・脂肪の質・血管形成・線維化などをCTや組織化学染色で評価することで、ASCとRE-01を用いた脂肪移植の効果を確認した。

### 4. 研究成果

最初に、RE-01細胞はEPCやマクロファージ・リンパ球を含む細胞集団であることから、ASCを共培養することによるRE-01細胞への影響をFACSで解析した。表面マーカーに明らかな変化は認めなかったが、共培養することで死細胞の割合が減少する傾向を認めた。また、共培養によるRE-01細胞のVGEFβやANGPTなど血管形成能に関連する遺伝子の変化は認めなかった。一方、ASCはRE-01細胞と共培養することで、IGF1やANGPT2などの血管形成に関連する遺伝子の増加が認められた。HUVECを用いたTube Formation assayにて、ASCとRE01を混合することで、HUVECの血管形成が促進することが示された。

共培養によるRE-01細胞の変化は少ないことから、共培養後のASCに注目することとした。ASCとRE-01細胞を2:1または10:1の割合で非接触共培養した後、ASCの脂肪分化能や血管形成能を評価した。脂肪分化能は共培養後のASCを脂肪分化誘導培地で培養し、3日後に脂肪分

化関連遺伝子の mRNA 量を解析した。血管形成能は HUVEC を用いた in vitro tube formation assay にて評価した。その結果、血管形成能は、いずれの条件においても RE-01 細胞と共培養した ASC において有意に促進していた。一方で、脂肪分化能については、共培養 1 日では、差は認められず、RE-01 細胞と 10:1 の割合で 3 日間共培養した ASC においてのみ脂肪分化の促進が認められた。これらの結果から、当初に想定していた、ASC と RE-01 細胞の混合移植ではなく、RE-01 細胞で刺激した ASC のみを脂肪移植に用いる可能性が示唆された。

移植が RE-01 細胞を含まずに ASC のみとなることから、他家由来の ASC を脂肪移植に用いることが可能と考えられる。そこで、自家 RE-01 細胞と他家 RE-01 細胞を用いて、検証を行った。その結果、自家由来と他家由来で ASC の血管形成能および脂肪分可能促進効果に差は認めなかった。

脂肪移植における RE-01 細胞刺激 ASC の有効性を検証するため、ヌードマウス背部脂肪移植実験を行った。In vitro の検証で、RE-01 細胞と ASC は自家由来と他家由来で差が認められなかったことから、動物実験では ASC、RE-01 細胞、脂肪は全て異なるヒト(他家)由来の検体を用いた。一般的に ASC を脂肪に補充する場合、脂肪 100 $\mu$ L に対し、最低でも  $1 \times 10^5$  個の ASC を混合している報告が多い。予備検討の結果より、本研究では、通常の ASC よりも少ない細胞数でも効果があるか検証するため、脂肪 200 $\mu$ L に RE-01 刺激 ASC を  $2 \times 10^4$  個混合し、移植脂肪組織の体積の維持、線維化の割合を検証した。脂肪のみのコントロール群および共培養なしの ASC 混合群と比較し、RE-01 共培養 ASC 混合群において、移植後 28 日までの脂肪の生着率は優位に改善していた。また、28 日後に摘出した移植脂肪片の免疫染色の結果、Perilipin 陽性の生脂肪細胞の割合や CD31 陽性の微小血管数も RE-01 共培養 ASC 混合群において、優位に 2 つの対照群よりも多いことが示された。また、線維化の割合はいずれの群においても差が認められなかったが、iNOS 陽性の炎症性マクロファージの浸潤が RE-01 共培養 ASC 混合群において優位に少なかった。RE-01 共培養 ASC 混合により、移植脂肪組織中の血管形成が促進され、炎症反応が抑制されたことにより、脂肪の質が向上し、生着率改善につながったと考えられる。移植片の PCR 解析の結果、ヒト由来 CD31 発現量については各群で差を認めなかったが、マウス由来 CD31 発現量は免疫染色の結果と同様に RE-01 共培養 ASC 混合群において、優位に発現量が高くなっていた。これらのことから、RE-01 共培養 ASC は移植脂肪組織中で、自ら血管内皮に分化するのではなく、サイトカイン分泌などのパラクライン作用によって、移植組織周辺からの血管新生を促進させていることが示された。

本研究により、RE-01 細胞と共培養した ASC を用いた脂肪移植の有効性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古川聖美, 藤村聡, Geeroms Maxim, 水野博司, 田中里佳
2. 発表標題 乳房再建にMNC-QQ細胞を用いた新・脂肪移植技術の開発
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satomi Furukawa, Satoshi Fujimura, Rie Hirano, Kayo Arita, Rica Tanaka
2. 発表標題 Development of non-invasive and effective peripheral blood cell therapy for vascular and tissue regenerative therapy
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021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

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

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 間葉系幹細胞による処置の効果を増幅するための組成物	発明者 学校法人順天堂大学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-197874	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化能を増幅させるための組成物	発明者 学校法人順天堂	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-197877	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------