

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791924

研究課題名(和文) 乳癌術後の乳房再建に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)の応用

研究課題名(英文) Development of novel treatments for breast reconstruction using DFAT

研究代表者

小沼 憲祥(KONUMA, Noriyoshi)

日本大学・医学部・専修医

研究者番号：50553103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：乳腺組織と周囲脂肪の相互作用に関する検討を、乳腺上皮細胞に関してはNMuMG(normal mouse mammary gland)を用い、周囲脂肪組織に関しては、当教室にて脂肪から開発された幹細胞の性質を持つmouse DFAT(dedifferentiated fat cell)を用いた。三次元ゲルにおける共培養を行うことで、DFATと共培養するとNMuMGは乳管様構造を呈し、乳腺再生におけるDFATの有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：I examined the interaction with the surrounding fat of the mammary gland and mammary gland tissue. The NMuMG (normal mouse mammary gland) was used as a instead of the mammary epithelial cells. Furthermore, the mouse DFAT(dedifferentiated fat cell) with the properties of stem cells derived from mature adipocytes in our laboratory was used as a instead of the fat tissue around the mammary gland. Using the Matrigel, NMuMG exhibited ductal-like structures when co-cultured with DFAT. Thus, in the mammary gland regeneration, it was considered to use the DFAT would be useful.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：脱分化脂肪細胞 乳腺上皮細胞 乳房再建 乳腺再生 DFAT

1. 研究開始当初の背景

乳癌術後の乳房欠損および変形は患者に対して精神的苦痛を引き起こし QOL の低下をもたらす。そこで従来では、シリコンバッグ、生理食塩水注入などの乳房再建が用いられてきたが、感染や腫瘍化、変形などから一般的な再建法としては十分効果があったとは言えない。近年では、自己の細胞を使用する方法（筋皮弁、脂肪注入）が用いられるようになってきた。中でも、脂肪組織から単離される脂肪組由来細胞（adipose derived stem cell: ASC）を用いた乳房再建は、再生医療の発展とともに用いられるようになってきた再建法であり、移植した細胞の生着率を増し、自己の脂肪を用いていることから注目を浴びている (Matsumoto D, et al. Tissue Eng.2006 12:3375-82)。

これまでに我々は、脂肪組織から単離してきた DFAT (dedifferentiated fat cell) を用いて、再生医療への寄与を目的に様々な研究を行ってきた。DFAT は ASC と同様に脂肪細胞から単離されるものの、分離過程の途中で遊離してくる脂肪滴から作製される。つまり、ASC は雑多な細胞集団（平滑筋、血管、神経など）である一方、DFAT は脂肪滴から作製される単一クローンであることを一つの特徴としている。DFAT は ASC とほぼ同様の表面抗原を持っているだけでなく、様々な細胞へ分化する多分化能をもつことが分かっている。脂肪組織から作製される DFAT は主に中胚葉成分（脂肪、平滑筋、骨格筋等）への分化能を有しているだけでなく、外胚葉成分（神経等）への分化能も確認されており、中でも脂肪への分化能は極めて高い (Matsumoto T, et al. J Cell Physiol.2008 215:210-22) ことから、ASC と同様、もしくはそれ以上の効果が期待できる。

乳房内の乳腺上皮細胞にとって、周囲に存在する脂肪細胞の存在は重要とされており、Couldrey C らによると成熟脂肪細胞を欠く遺伝子改変マウスでは、乳腺実質が正常に発達しないと報告している (Couldrey C, et al. Dev Dyn.2002 223:459-68)。また、Zangani D らは脂肪細胞分泌因子が乳腺上皮細胞の形態形成を調節していると報告している (Zangani D, et al. Exp Cell Res.1999 247:399-409) ことなどから、乳腺上皮細胞と周囲脂肪組織の相互作用がとりざたされるようになってきた。女性の乳腺組織は生体内において一生を通じて、出生から第一次、二次性徴期、妊娠、出産、閉経に伴い、年齢、ホルモンバランスに応じてめまぐるしく変化していく唯一の臓器とされている。近年では、乳腺組織から脂肪組織、脂肪組織から乳腺組織へと状況（ホルモンバランス等）に応じ分化転換することが知られている。

2. 研究の目的

乳癌術後の乳房再建は近年様々な方法が施行され、中でも再生医療の発展に伴い自己細

胞を使った再建法や幹細胞を用いた細胞移植が用いられるようになってきた。本申請では脂肪を脱分化させ作製した DFAT を用いて乳房再建を試みる。成熟脂肪細胞と正常乳腺上皮細胞との相互作用がとりざたされている中、多分化能をもつ前駆脂肪細胞である DFAT と正常乳腺上皮細胞の相互作用を確認し、ラット乳腺切除モデルを確立後、確立されたモデルに対して DFAT を移植することで乳房再建に対する DFAT の有効性を検討する。

3. 研究の方法

DFAT と正常乳腺上皮細胞 (Normal Mouse Mammary gland epithelial Cells: NMuMG) との相互作用を解明するために共培養系を用いた検討を行う。

MNuMG の細胞増殖能

共培養系 dish は、日本ベクトンディッキンソンのセルカルチャーインサートを用いる。インサートに DFAT、プレートに HMEpC を培養をする。プレートに培養する HMEpC の細胞数は 1×10^5 に固定し、DFAT の細胞数を 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 で検討する。各 DFAT 細胞数における MNuMG の細胞数を、培養開始時より day1、3、5、7 にて cell count 法により検討し、DFAT の培養細胞数が増加するとともに HMEpC の細胞数の変化及び増殖能を確認する。

MNuMG の三次元培養

既報によると、二次元培養と比較して、三次元培養で乳腺上皮細胞を培養すると、乳管構造を形成することが報告されている。そこで、血管新生にも用いられている下記の培養法を用いて検討する。比較対象に、ASC、Fibroblast (線維芽細胞) と NMuMG の共培養を行う。

- マトリゲル collagen Type
- マトリゲル collagen Type
- コラーゲンスポンジゲル

マウスを用いた乳腺切除モデルの確立

B6 マウス (メス、7 週齢) を用いて、乳腺切除モデルの確立を行う。乳腺 1/4 切除、1/2 切除、全切除モデルを作製し、各々に対して day3、d7、d14、d28 における再生乳腺組織を確認する。乳腺組織の評価としては、組織自体の定量を行うために画像による評価を行う。

乳腺切除モデルに対する DFAT の投与

確立したモデルに対して DFAT 投与を行う。マウス DFAT は、移植組織における DFAT の局在を把握するために、GFP 遺伝子組み換えマウスから作製された DFAT を用いて検討する。

DFAT 投与方法は、残存乳腺内ならびに乳腺周囲の脂肪組織への局所注射とマトリゲルを用いて細胞を封入し、乳腺切除領域にゲルと共に留置してくる方法で検討する。

4. 研究成果

乳癌術後の乳房再建を目的に、脱分化脂肪細胞 (DFAT) を用いた乳房再建を試みた。生体における乳腺にとって周囲の脂肪組織は、単なる支持組織ではなく、乳腺の発達や増殖をサポートする内分泌組織としての認識が近年高まってきている。そこで、正常乳腺上皮細胞である NMuMG と脂肪を脱分化させた DFAT をの相互作用を In vitro にて確認した。既報によると、二次元培養での乳腺上皮細胞の分化よりも三次元培養法を用いた培養法の方が、より生体に近い環境が得られると報告があることから、コラーゲンタイプ とコラーゲンタイプ のゲルを用いて、NMuMG と DFAT の共培養を施行した。結果、DFAT と共培養された NMuMG は管腔構造を持ち、枝葉状にひろがる構造物となることが確認され、さらに DFAT と NMuMG を 4:1 で共培養した時に、乳腺様構造が最も大きく培養されることが

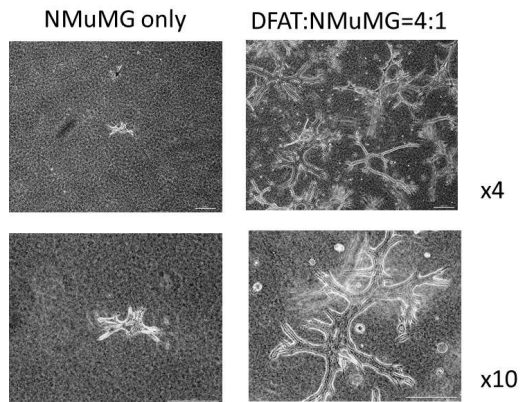
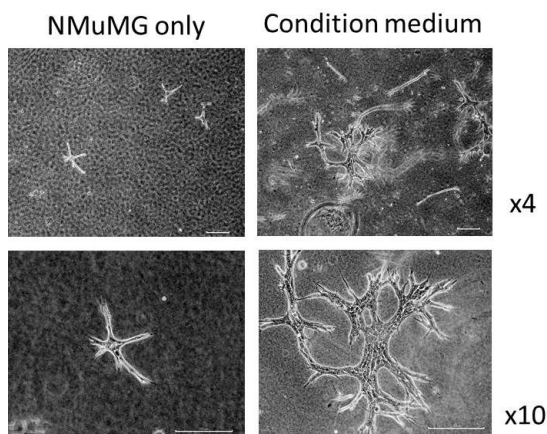


図1

確認できた(図 1)。また、condition medium による検討では、10%FCS 含有 DMEM : DFAT condition medium=2:1 の medium で培養した



ときに、乳腺様構造物をもっとも多く培養された(図 2)。以上より、乳腺上皮細胞は、DFAT から影響を受け、増殖能並びに形態変化が起こることが確認された。更に、DFAT の対照として、negative control にマウス線維芽細胞をおき、positive control として ASC (脂肪由来間葉系幹細胞)をおき、DFAT と同条件で検討したところ、positive

control として検討した ASC は、DFAT と同様の乳管構造を呈するものの、乳管構造が放射状に増殖し、明らかに DFAT とは異なる構造を持っていた。今後さらなる検討が必要と考えられるが、乳管様構造の違いから、いずれかの細胞種にて上皮間質転換 (Mesenchymal transition) が起こっていることが示唆された。

生体における乳腺組織と DFAT との相互作用を検討するために、マウス乳腺組織に DFAT を局所投与することを試みた。局所投与した DFAT の局在性を高めるため、collagen type の Matrigel 内に GFP ラベルされている DFAT を封入し、正常乳腺組織の周囲に局所投与した。確認できたマウス正常乳腺に対して計 6 ヶ所局所投与し、二週間飼育後、乳腺組織周辺を拡大切除し、HE 染色にて確認したところ、正常乳腺に対する DFAT の影響はあまり認められなかった。

また、乳腺上皮細胞から DFAT に対する脂肪分化誘導の可能性を調べるために、二次元培養にて、NMuMG と DFAT を共培養した。Oil Red-O 染色を用いて脂肪染色を施行したところ、培養 4 日目にて NMuMG と共培養された DFAT は、脂肪へ分化されていることが確認

Oil Red-O stain

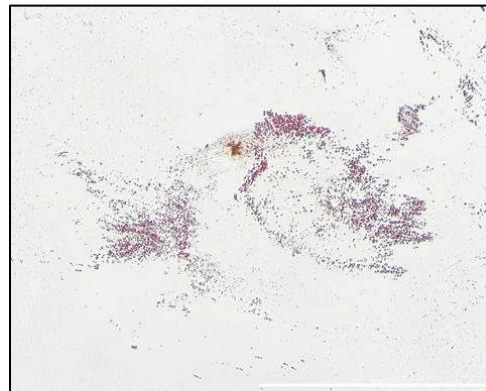


図3

された(図 3)。このことから、乳腺上皮細胞は、DFAT を脂肪分化させることが明らかとなり、乳房再建における DFAT の有用性を示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小沼憲祥(KONUMA, Noriyoshi)

日本大学・医学部・専修医

研究者番号：50553103