

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861501

研究課題名(和文)皮下脂肪組織由来幹細胞の作用メカニズムに基づいた新しい乳房再生技術の開発

研究課題名(英文)Development of New Method for Breast Reconstruction based on the Mechanism of Adipose Derived Stem Cells

研究代表者

陶山 淑子(Suyama, Yoshiko)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90448192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生能や分化能をもつ脂肪組織由来幹細胞(ASCs)を用いた乳房再建において、脂肪生着率の向上と安全性の確認が重要である。乳房再建モデルマウスを作製し、至適脂肪量とASCs量の検討を行った。4週間後の移植脂肪重量はASCs量との強い関連は認めなかった。移植後ASCの体内動態を生体内で確認するため、トランスジェニックマウスの系統を確立した。これにより、移植後ASCsは、定着細胞数の定量と細胞の生体内での追跡が可能となった。ASCsの初回投与量、追加投与・投与期間の設定などASCsの作用に基づいた脂肪生着率を向上させる方法の開発をすすめていく。

研究成果の概要(英文)：Breast reconstruction using autologous adipose derived stem cells (ASCs)-enriched fat graft has been done around the world. ASCs have multipotency, secrete cytokines and help the fat graft to take. To improve the take rate and safety, we conducted experiments using the following methods; 1) Made model mice of breast reconstruction: injecting fat tissue mixing ASCs to their back. 2) Made transgenic mice and rats with expression of both GFP and ELuc gene: to check the gathering of ASCs to organs and the survival period. 3) Injected ASCs from transgenic rats into model mice. ASCs were confirmed to exist in vivo for two weeks and stay on injected areas without moving to other organs. This suggests that booster injections of ASCs might be effective to keep its function and not influence other organs. In the future, we want to examine aspects of booster injections of ASCs including safety, frequency, and volume in long-term follow up in vivo.

研究分野：形成外科

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 乳房再建 再生医療 脂肪 移植 分化

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪組織由来幹細胞 (Adipose derived stem cells : ASCs) は、皮下吸引脂肪から単離され、分化能、血管新生能、抗炎症作用を有するとされる細胞集団であることから、再生医療の新たな細胞源として注目されている。我々は、2012年より日本で初めてヒト幹細胞指針に基づく臨床研究「自己皮下脂肪組織由来細胞移植による乳癌術後の乳房再建法の検討」を実施してきた。これは、乳癌の乳房温存術後の陥凹変形に、吸引皮下脂肪と ASCs を混合して移植し、陥凹部位の形態改善を図る方法であり、5名全例で移植脂肪の生着と、乳房形態の改善を得た。しかし、一部脂肪は吸収され、脂肪生着率の向上が今後の課題と考えられた。

## 2. 研究の目的

我々は、臨床研究の結果をもとに、ASCs の効果の失活が脂肪吸収の原因と考え、ASCs の活性を維持する ASCs 投与方法を行うことで移植脂肪の生着率が向上するという仮説をたてた。ASCs 投与量や追加投与の有効性と安全性を動物実験で評価し、臨床に直結する質の高い乳房再建法の確立とそのメカニズム解明を目指し、移植した細胞の癌化や、多臓器への流入など移植細胞の安全性評価を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳房再建モデルマウスの作製

ヌードマウスの背部皮下にラット皮下脂肪と ASCs を移植し、乳房様形態の作製を行った。移植方法、移植脂肪重量、および脂肪と ASCs との混合比を、4週間後の移植脂肪重量変化および線維化で評価した。また、3D スキャナを用いて、移植部位の形態を評価した。

### (2) 移植 ASCs 評価のための Transgenic(Tg) ラットの作製

移植細胞を追跡するため、ASCs の可視化を検討した。GFP (Green Fluorescent Protein) と ELuc (Emerald Luciferase) 発光を用いる。ELuc 発光を *in vivo* imaging の手法を用いて観察することにより、生体外から非侵襲的に移植細胞の動態や生着率について評価する。加えて、GFP 発光を用いることにより、FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) を用いて、移植後の細胞を移植片から単離することが可能である。

### (3) Tg ラット由来 ASCs を用いた乳房再建モデルマウスの作製と移植細胞の追跡

Tg ラット由来 ASCs を用いて、(1) で得ら

れた移植脂肪重量と ASCs 量をもとに乳房再建モデルマウスの作製と移植した ASCs の *in vivo* imaging を行った。

## 4. 研究成果

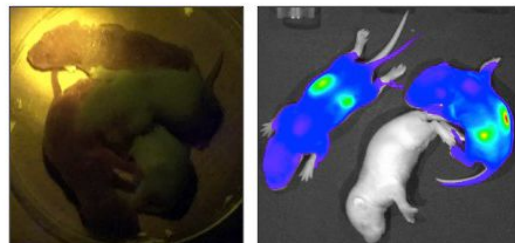
### (1) 乳房再建モデルマウスの作製

ヌードマウスの背部皮下にラット皮下脂肪と ASCs を移植し、乳房様形態の作製を行った。移植方法は、臨床と同様の注入器を用いた方法、鑷子を用いた移植法および脂肪塊の移植を比較した。注入器を用いる場合が、初回移植脂肪重量を最も反映していた。初回移植脂肪量は、0.3g、0.5g、0.7g、1.0g で検討したところ、0.7g が最も重量変化が少なく、安定していた。そのため、ASCs との混合移植では 0.7g を初回移植脂肪量とし、ASCs の混合比は 0:1、0.5:1、1:1、2:1 とした。4週間後の重量変化には ASCs との比率との関連は明確ではなかったが、マツソントリクローム染色を用いた線維化評価は、脂肪:ASCs が 1:1 において線維化が低い傾向を認めた。3D スキャナを用いた形態評価は、対象の基準点の設定が困難であり、経時的評価は行えなかった。

### (2) 移植 ASCs 評価のための(Tg)ラットの作製

GFP と ELuc 2色の蛍光・発光を単一細胞で同時に可視化できるように、Porcine teschovirus-1 由来の 2A 配列を用い、強制発現プロモーターである CAG プロモーターの下流に、GFP-2A-ELuc 遺伝子配列を搭載した強制発現ベクターを作製した。このベクターを Lewis ラット、C57/BL6 マウスの受精卵へインジェクションし、全身性に GFP と ELuc を同時に発現する Tg ラット・マウスの作製に成功した。

現在、これらの Tg ラット・マウスの解析中である。まず、作製した Tg ラット・マウスを用いて、*in vivo* imaging を行った。紫外線を照射すると Tg ラット・マウスは全身性に GFP 発光を発現し、D-Luciferin の腹腔への投与により、全身性に ELuc 発光が観察された (図 1)。



(A) 全身での GFP の発現 (B) *in vivo* imaging 解析による全身での ELuc の発現

図 1 Tg ラットは全身で GFP と ELuc を発現する

次に、各臓器での ELuc と GFP の発現を確認した。imaging 解析から、全ての臓器での ELuc と GFP の発現が認められた(図 2)。

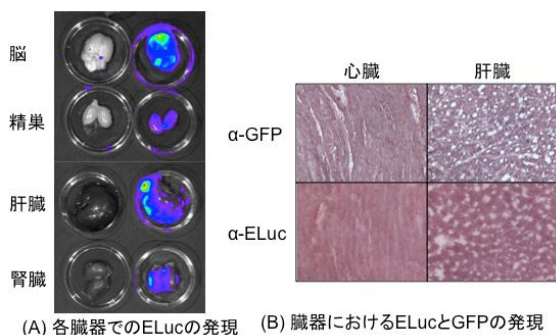


図2 Tgラットは各臓器においても GFP と ELuc を発現する

加えて、ウエスタンブロッティングや各臓器の切片の抗体染色の結果からも同様の結果が得られた。さらに、Tgラット・マウスの各系統から、ASCs を単離及び培養し、単一細胞での詳細解析を行った。フローサイトメーターによる GFP 蛍光強度の測定から、ASCs は全ての細胞で、GFP 蛍光を発現することが分かった。しかしながら、各系統により、蛍光強度にわずかな強弱の差があることが判明した。培養した ASCs のルシフェラーゼアッセイでも同様に、ELuc の発現を確認することができた。最後に、抗体染色を行うと、単一細胞で、GFP と ELuc の共発現を観察することができた。以上の結果から、GFP と ELuc を同時に発現する可視化 ASCs の樹立に成功した。

(3) Tgラット由来 ASCs を用いた乳房再建モデルマウスの作製と移植細胞の追跡

細断したラット皮下脂肪 0.7g と  $0.7 \times 10^6$  個又は5倍量の  $3.5 \times 10^6$  個の ASCs を混合し、免疫不全マウスの背部、皮下に注入した。移植直後に imaging 解析を行うと、移植した細胞数に比例して、ELuc の発光強度が変化し、移植細胞の局在を観察することができた。移植翌日も同様に、体外から移植細胞の生着を観察することができた(図3)。

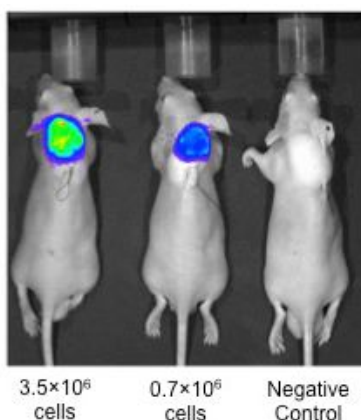


図3 乳房再建モデルマウスにおける移植 ASC の追跡。移植細胞数を ELuc の発光強度によって定量することができる

さらに、この移植片を摘出し、酵素処理を行って脂肪細胞と ASCs を単一細胞に分離し、フローサイトメーターによって、GFP 蛍光を発現する移植細胞に由来する定着細胞数の定量を行った。この結果、移植細胞数に比例した GFP 陽性細胞を確認することができた。以上の結果から、樹立した Tg ラット由来の ASCs を用いることにより、当初の計画通りに、移植細胞の追跡ができることが分かった。Tg ラット由来 ASCs は、乳房再建モデルマウスに移植後、多臓器への流入は認めず、移植部位に限局し、2 週間程度で減少していくことも明らかとなった。

本研究の成果から、今後、脂肪組織生着の向上のための新しい ASCs 投与方法 (ブースト効果や培養 ASCs の移植など) の開発が期待でき、移植 ASCs の長期追跡と長期的安全性の検証が可能となる。

#### 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 2 件)

1. 陶山淑子、福岡晃平、森川久未、久留一郎、八木俊路朗：自己皮下脂肪組織由来幹細胞移植による乳房再建 査読あり  
形成外科 59:486-495、2016

2. 陶山淑子、森川久未、山本康孝、八木俊路朗、中山敏、久留一郎：患者まで届いている再生医療 脂肪組織由来幹細胞を用いた乳房再建術 査読なし  
再生医療 14:370-376、2015

[学会発表](計 2 件)

1. 第 18 回山陰形成外科懇話会  
島根県立中央病院(島根県出雲市)  
2016 年 6 月 19 日

陶山淑子、森川久未、久留一郎、八木俊路朗  
乳房再建モデル動物を用いた皮下脂肪組織由来細胞による乳房再建法の検討

2. 第 14 回日本再生医療学会総会  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
2015 年 3 月 19~21 日

森川久未、八浦妃佐子、陶山淑子、中山敏、久留一郎  
乳房再建治療メカニズムの解明に向けた乳房再建モデルマウス作製の試み

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

陶山 淑子 (Suyama, Yoshiko)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90448192