

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09472

研究課題名(和文) 羊膜由来幹細胞の大いなる可能性～理想的な乳房再建を目指して

研究課題名(英文) The Study on Promotion the Survival of Fat Grafts by Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells

研究代表者

舟山 恵美 (Funayama, Emi)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10533630

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)：近年、移植脂肪生着向上のための試みとして間葉系幹細胞が着目されているがその多くが、脂肪由来間葉系幹細胞によるものである。本研究では、侵襲なく大量採取が可能な羊膜由来間葉系幹細胞による移植脂肪生着向上効果について検証し、羊膜由来幹細胞も移植脂肪の生着率を向上させ、その機序としては線維化抑制作用が関わっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

羊膜由来間葉系幹細胞は、採取に侵襲的な手技を必要とする他由来の間葉系幹細胞と比較し、帝王切開時に廃棄される胎盤から、ドナーの侵襲なく大量に採取することが可能である。MHC Class II を発現しておらず免疫抑制作用を有することから免疫寛容を持ち、他家移植が可能である間葉系幹細胞の特性を生かし、製剤化したの投与も可能であることから、羊膜由来間葉系幹細胞の脂肪移植への応用により、患者の負担が少ない幹細胞付加脂肪移植が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) have been investigated to promote the survival of fat grafts, such as using grafts with autologous stromal vascular fractions or adipose-derived MSCs. Amnion is a rich source of MSCs that is available to allogeneic transplantation. We explored the feasibility of using amnion-derived MSCs (AMSCs) to enhance fat graft survival, and suggested that AMSCs promote the survival of fat grafts and prevent fibrosis in the grafts.

研究分野：形成外科

キーワード：脂肪移植 間葉系幹細胞 再生医療 羊膜 線維化抑制

1. 研究開始当初の背景

脂肪移植術は侵襲が少なく、自家の組織で軟部組織の増量が期待できる有用な手技であるが、その生着率は母床の状態により 20~70%と大きなばらつきがある。生着率の向上のため、近年では移植用に採取した脂肪組織の一部から脂肪由来間葉系幹細胞を含む間質血管細胞群を抽出し移植脂肪に添加する手法が行われ、生着率が向上するという結果が示されており、またその機序としては移植脂肪内の血管新生の促進が寄与していると考えられている。

この間葉系幹細胞は、脂肪、骨、軟骨などの間葉系細胞への分化能を持つほか、様々なサイトカイン、ケモカインのパラクラインにより、血管新生作用、線維化抑制作用、抗炎症・免疫調整作用、抗アポトーシスな作用など多様な効果を持つ。また、間葉系幹細胞は、脂肪組織以外にも骨髄、臍帯、胎盤などから得られる。

その中でも羊膜由来間葉系幹細胞(amnion-derived mesenchymal stem cell, AMSC) は医療廃棄物である胎盤から大量に採取が可能であり、実用化が期待されている。我々のグループではこれまでに AMSC 培養上清のケロイド由来線維芽細胞の増殖抑制効果 (Sato et al., 2018) や、糖尿病性潰瘍における創傷治癒促進効果 (Takahashi et al., 2021) について研究を行ってきた。しかしながら、AMSC を脂肪移植へ応用した報告はこれまでになく、ドナーの侵襲なく採取可能な間葉系幹細胞として、その有効性や実用化が期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、AMSC の脂肪移植への臨床応用を目指し、マウス脂肪移植モデルにおける AMSC による移植脂肪生着向上効果を検証するとともに、その機序について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) AMSC 添加マウス脂肪移植モデルの作成

オス、8 週齢の C.B-17/IcrHsd-Prkdcscid マウス、および帝王切開時に得られる胎盤組織から採取したヒト AMSC、脂肪移植手術時に生じた余剰なヒト脂肪を用いてモデル作成を行った。AMSC は手動的に羊膜を採取後、酵素処理により AMSC を分離、初代・継代培養を行い、6~8 継代の細胞を使用した。ヒト脂肪は、臨床での手法と同様にコールマン法で採取後、遠心分離により油滴成分、血液成分を除去し、中層の脂肪層のみを回収した。

AMSC 5.0×10^5 個および 5.0×10^6 個をヒト脂肪 0.5g と混和し、マウス背部左側皮下に AMSC 混和脂肪を、右側に脂肪のみを注入し、マウス脂肪移植モデルを作成した。

(2) 移植脂肪の生着率の評価 (体積・質量)

上記モデルを用いて、移植後 2、4、8、12、16 週に、移植脂肪を摘出し、残存する移植脂肪の肉眼的所見、体積、質量を評価した。

(3) 移植脂肪の病理組織学的評価

摘出した移植脂肪に対して HE 染色での評価のほか、脂肪内の血管増生の評価として、CD31 に対する免疫組織化学染色を行った。また、線維化の評価として Elastica-Masson 染色を、移植脂肪内の線維芽細胞の活動性の評価のために α -SMA に対する免疫組織化学染色を行った。それぞれの陽性面積を、画像解析ソフト image J を用いて定量化し、評価、解析を行った。

(4) 移植脂肪内の遺伝子発現の評価

摘出した移植脂肪内の線維化関連遺伝子として、Collagen I、 α -SMA、TGF- β の mRNA 発現の評価を行った。また Collagen 分解に作用する遺伝子発現として、MMP-2、TIMP-1、血管増生に関わる遺伝子発現として、EGF、FGF-2、VEGF の mRNA 発現の評価を行った。RNA を抽出し、逆転写を行った後に、Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) を用いたインターカレーション法により、PCR 増幅産物生成量を測定し、遺伝子発現量の比較のため、 $\Delta\Delta CT$ 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 移植脂肪の肉眼所見、生着率 (体積・質量)

摘出した移植脂肪は、全例において薄い被膜に覆われており、周囲組織からの剥離は比較的容易であった。一部の移植脂肪では被膜内に毛細血管が透見されたが、毛細血管の程度について、AMSC 添加による差異は明らかではなかった (図 1)。

移植脂肪の体積・質量は経時的に減少を認めた。投与後 12 週時点での移植脂肪の体積は、AMSC 5.0×10^6 個添加群では、Control 群 $0.57 \pm 0.07 \text{ cm}^3$ に対し、AMSC 添加群で $0.67 \pm 0.07 \text{ cm}^3$ ($p < 0.05$)、AMSC 5.0×10^6 個添加群では、Control 群 $0.45 \pm 0.11 \text{ cm}^3$ に対し、AMSC 添加群で $0.60 \pm 0.14 \text{ cm}^3$ ($p < 0.01$) と AMSC 添加群で有意に大きい結果となった。

また、質量についても同様に、投与後 12 週時点で AMSC 5.0×10^6 個添加群では、Control 群 0.15 ± 0.02 g に対し、AMSC 添加群で 0.19 ± 0.001 g ($p < 0.05$)、AMSC 5.0×10^6 個添加群では、Control 群 0.13 ± 0.02 g に対し、AMSC 添加群で 0.17 ± 0.03 g ($p < 0.05$) と AMSC 添加群で有意に大きい結果となった (図 2)。

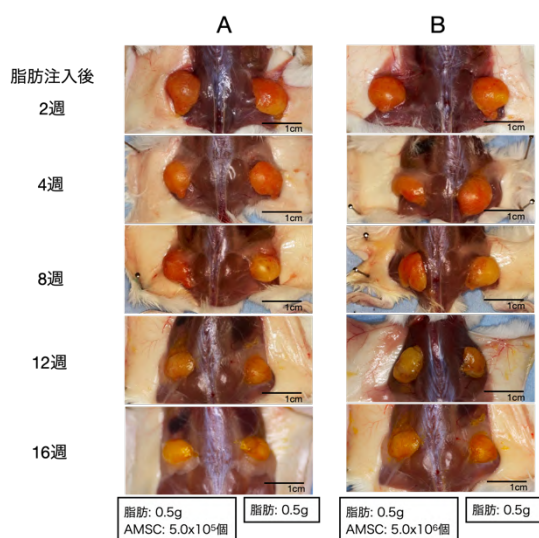


図 1. 移植脂肪の肉眼的所見。
(A)AMSC 5.0×10^5 個添加群。
(B)AMSC 5.0×10^6 個添加群。
残存する移植脂肪の量は経時的に減少する。AMSC 添加による明らかな肉眼的性状の差異は認めない。

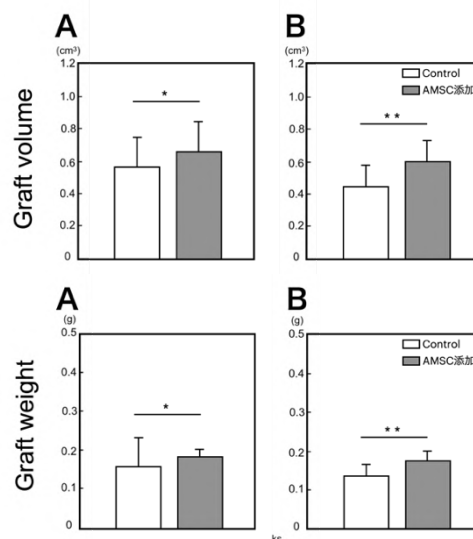


図 2. 移植脂肪の体積、重量 (移植後 12 週)。
(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群。
(B)AMSC 5.0×10^6 個添加群。
残存する移植脂肪の体積、質量は AMSC 添加群で有意に大きい。(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)

(2) 移植脂肪内の組織学的評価 (HE 染色)

移植脂肪の HE 染色では、経時的な脂肪滴成分の減少、その他の細胞成分や細胞外基質の増加を認めたが、AMSC 添加群では脂肪滴の性状は比較的保たれていた (図 3)。

(3) 移植脂肪内の血管増生の評価 (CD31 染色)

脂肪由来 MSC もしくは SVF 添加により、移植脂肪内の血管増生が増加することから、AMSC の血管増生作用の評価のため、血管内皮細胞に対する CD31 による免疫染色を行った。しかし、AMSC の添加により CD31 陽性面積は増加せず、明らかな血管増生促進効果は確認できなかった (図 4)。

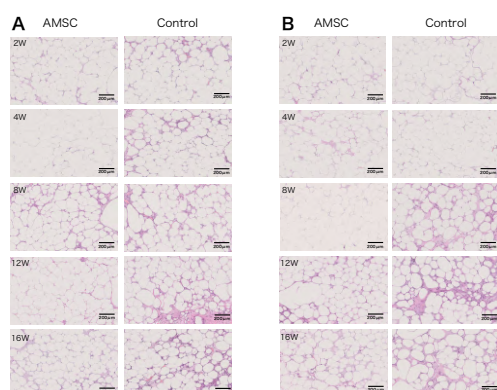


図 3. 移植脂肪の HE 染色による病理組織学的評価。
(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群。
(B) AMSC 5.0×10^6 個添加群。

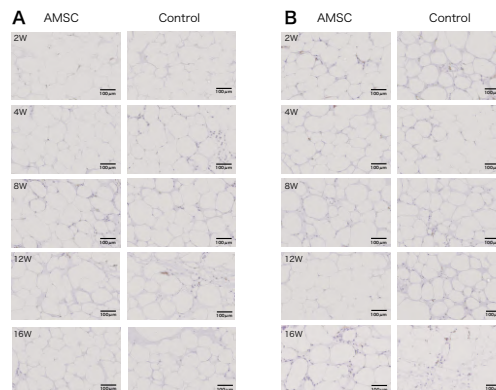


図 4. 移植脂肪の CD31 染色による病理組織学的評価。
(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群。
(B) AMSC 5.0×10^6 個添加群。

(4) 移植脂肪内の線維化の評価 (Elastica-Masson 染色)

Elastica-Masson 染色による移植脂肪内の線維化の評価を行ったところ、青色に染色される膠原線維の占める面積は、AMSC 5.0×10^5 個添加群、 5.0×10^6 個添加群ともに、AMSC の添加により抑制される傾向を認めた。定量化を行ったところ、線維化は移植後 8 週以降増加傾向を認めたが、Control 群と比較し、AMSC 添加群で線維化が有意に抑制された (図 5)。

(5) 移植脂肪内の線維芽細胞の活動性の評価 (α -SMA 染色)

筋線維芽細胞や血管周皮細胞のマーカーである α -SMA の免疫染色では、 α -SMA の発現は移植後 4~12 週にかけて徐々に増加し、16 週では減少する傾向を認めた。染色のパターンから 12 週までは筋線維芽細胞が主に染色され、16 週では血管周皮細胞が主に染色されていることが予想された。AMSC 添加により、移植後 4~12 週においては、 α -SMA の発現は抑制される傾向を認め、 5.0×10^5 個添加群の移植後 8 週では有意に抑制された (図 6)。

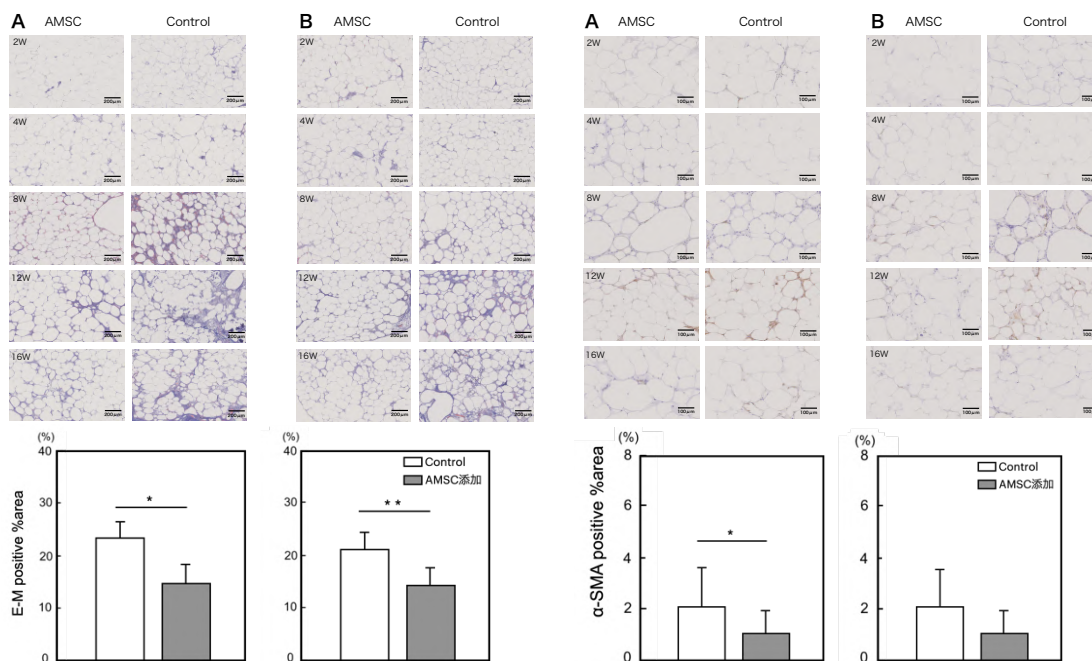


図 5. 移植脂肪の Elastica-Masson 染色による病理組織学的評価。

(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群。
(B) AMSC 5.0×10^6 個添加群。
(下段) 移植後 16 週での定量化。AMSC の添加による膠原線維の減少を認める。
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

図 6. 移植脂肪の α -SMA 染色による病理組織学的評価。

(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群。
(B) AMSC 5.0×10^6 個添加群。
(下段) 移植後 8 週での定量化。AMSC の添加による α -SMA 陽性面積の減少を認める。(* $p < 0.05$)

(6) 移植脂肪内の線維化関連遺伝子発現の評価

摘出した移植脂肪内の線維化関連遺伝子として、Collagen I、 α -SMA、TGF- β の mRNA 発現の評価を行った。移植後 2 週では、 α -SMA 遺伝子の発現は有意な傾向を呈さなかったが、AMSC 5.0×10^5 個添加群で TGF- β 遺伝子の発現は 0.87 ± 0.08 ($p < 0.01$)、Collagen I 遺伝子の発現は 0.75 ± 0.27 ($p < 0.05$) と有意に抑制された。

移植後 4 週では、Collagen I 遺伝子の発現は AMSC 5.0×10^5 個添加群で 0.33 ± 0.07 ($p < 0.01$) と有意に抑制され、 α -SMA 遺伝子の発現は AMSC 5.0×10^5 個添加群で 0.44 ± 0.1 、AMSC 5.0×10^6 個添加群で 0.35 ± 0.08 (いずれも $p < 0.01$) と有意に抑制された。また、TGF- β 遺伝子の発現も、AMSC 5.0×10^5 個添加群で 0.54 ± 0.08 、AMSC 5.0×10^6 個添加群で 0.49 ± 0.11 (いずれも $p < 0.01$) と有意に抑制された。

また、移植後 2 週、4 週において、Collagen の分解に関わる MMP-2、TIMP-1 の遺伝子発現を評価したが、有意な傾向は認めず、移植脂肪内の線維化の抑制効果は、Collagen 分解の亢進ではなく、Collagen 産生の低下による可能性が示唆された。

また、移植後 2 週、4 週において、血管新生に関わる遺伝子発現として、EGF、FGF-2、VEGF の発現を評価したが有意な傾向は認めず、AMSC による移植脂肪の生着向上作用における機序として、血管増生の促進よりも線維化抑制作用が寄与している可能性が示唆された。

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 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤梨里, 大西俊介, 高橋周子, 石川耕資, 前田 拓, 大澤昌之, 林 利彦, 舟山恵美, 山本有平 |
| 2. 発表標題 羊膜由来間葉系幹細胞による移植脂肪生着向上効果の検討 |
| 3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤梨里, 大西俊介, 高橋周子, 佐藤千草, 石川耕資, 前田 拓, 大澤昌之, 村尾尚規, 林 利彦, 舟山恵美, 山本有平 |
| 2. 発表標題 羊膜由来間葉系幹細胞添加による移植脂肪生着向上効果の基礎的検討(第1報) |
| 3. 学会等名 第100回北日本形成外科学会北海道地方会 |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤梨里, 大西俊介, 佐藤千草, 石川耕資, 前田 拓, 大澤昌之, 舟山恵美, 澤口恵美, 山本有平 |
| 2. 発表標題 羊膜由来間葉系幹細胞添加による移植脂肪生着向上効果の基礎的検討(第2報) |
| 3. 学会等名 第101回北日本形成外科学会北海道地方会 |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤梨里, 大西俊介, 高橋周子, 佐藤千草, 石川耕資, 前田 拓, 大澤昌之, 林 利彦, 舟山恵美, 山本有平 |
| 2. 発表標題 羊膜由来間葉系幹細胞添加による移植脂肪生着向上効果の基礎的検討 |
| 3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 産業財産権の名称 間葉系幹細胞を含む軟部組織再生用医薬組成物 | 発明者 大西俊介、伊藤梨里、林真広、中石智之 | 権利者 国立大学法人北海道大学、株式会社力ネカ |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2021-017768 | 出願年 2021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 |
|-------|---|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 山本 有平 (Yamamoto Yuhei) (70271674) | 北海道大学・医学研究院・教授 (10101) | |
| 研究分担者 | 林 利彦 (Hayashi Toshihiko) (00432146) | 北海道大学・歯学研究院・准教授 (10101) | |
| 研究分担者 | 村尾 尚規 (Mura0 Naoki) (90706558) | 北海道大学・大学病院・講師 (10101) | |
| 研究分担者 | 大澤 昌之 (Osawa Masayuki) (70625029) | 北海道大学・大学病院・講師 (10101) | |
| 研究分担者 | 前田 拓 (Maeda Taku) (80813542) | 北海道大学・医学研究院・助教 (10101) | |

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 | 大西 俊介 (Ohnishi Shunsuke) (10443475) | 北海道大学・医学研究院・准教授 (10101) | |
| 研究協力者 | 伊藤 梨里 (Ito Riri) (00813544) | 北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101) | |

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 |
|---------|---------|
| | |