

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11370

研究課題名(和文) 積層化脂肪組織由来幹細胞シート移植による陳旧性顔面神経麻痺治療法の開発

研究課題名(英文) Treatment of old facial paralysis using layered adipose derived stem cell sheets

研究代表者

清水 雄介 (Shimizu, Yusuke)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10327570

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)：琉球大学臨床研究倫理委員会の承認の下(承認番号810)、ヒト由来の脂肪組織から脂肪幹細胞を抽出し、数週間、高純度培養した後、大量に得られた脂肪幹細胞をコラーゲンシートに播種して、4平方センチメートルの単層脂肪幹細胞シートの作製を行った。さらにこの脂肪幹細胞シートを重ね合わせた積層化シート、不織布を用いた脂肪幹細胞シートを作製した。また両側顔面神経麻痺モデルラットを作成し、それぞれの顔面半側に細胞シートの移植を行った。細胞シートの移植を行った側は、移植していない側に比べて顔面神経の回復が早い傾向がみられた。またコラゲナーゼを用いず脂肪幹細胞を分離抽出するための方法を開発し特許出願を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陳旧性顔面神経完全麻痺、不全麻痺に伴う表情筋機能不全(萎縮、拘縮、病的共同運動)に有効な治療は確立されていない。顔面神経麻痺は笑えない、眼を閉じることができない等、罹患者の日常生活に多大な苦痛をもたらす疾患であり、日本でも数多くの患者が存在している。

本研究の結果、積層化した脂肪幹細胞シートを顔面神経麻痺患者さんに早期に移植することで、回復する可能性があることが示唆された。また本研究を通して、脂肪幹細胞シートを作製する技術を構築できた他、コラゲナーゼを用いず脂肪幹細胞を分離抽出する新しい方法を開発し特許出願を行えた。

研究成果の概要(英文)：Under the approval of the Clinical Research Ethics Committee of the University of the Ryukyus (Approval No. 810), adipose tissue stem cells were extracted from human-derived adipose tissue, cultured for a few weeks with high purity, and a large amount of adipose stem cells were formed into collagen sheets. Seeding was performed to prepare a 4 cm² monolayer adipose stem cell sheet. Further, a layered sheet was produced by superposing the adipose derived stem cell sheets. Bilateral facial paralysis model rats were prepared, and the layered sheet was transplanted to each half of the face. On the side where the layered sheet was transplanted, facial nerve recovery was observed earlier than on the side where the laminated sheet was not transplanted. In addition, we developed a method for extracting adipose derived stem cells without using collagenase and filed a patent application.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 顔面神経麻痺 細胞シート 脂肪幹細胞 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顔面神経麻痺は笑えない、眼を閉じることができない等、罹患者の日常生活に多大な苦痛をもたらす疾患である。日本でも数多くの患者が存在する。急性期の顔面神経麻痺は薬物療法が基本となるが、陳旧性顔面神経麻痺に対しては有効な治療法が確立されていない。陳旧性顔面神経麻痺の病態は主に完全麻痺と不全麻痺に分けられる。完全麻痺では表情筋の萎縮が徐々に進行する。不全麻痺では表情筋が拘縮し、しばしば病的共同運動を生じる。完全麻痺の治療としては遊離筋肉移植や筋膜移植などが行われ、不全麻痺の治療としてはリハビリテーションやボトックス注射、近年は舌下神経 顔面神経間の神経移植などが試みられている。しかし、いずれの治療においても直接表情筋自体の機能を回復させるものではなく、治療としては不十分である。新たな革新的な治療が望まれている。

2. 研究の目的

近年、脂肪幹細胞を用いた再生医療が注目されている。脂肪幹細胞は脂肪、骨、血管、筋肉、神経などの細胞に分化する能力を持つ。人体に広く存在する脂肪から容易に採取できることから、最も有望な再生治療用の幹細胞として様々な疾患への臨床応用が期待されている。形成外科領域においては脂肪幹細胞移植による乳房再建や難治性潰瘍の治療などが知られている。しかし、顔面神経麻痺に伴って機能不全をきたした筋肉に対して直接脂肪幹細胞を移植する研究は多くない。

そこで我々は脂肪幹細胞のもつ筋肉への分化能、パラクライン因子放出能を利用して顔面神経麻痺に伴う表情筋機能不全を改善できるのではないかと考えた。また脂肪幹細胞移植に際しては単離した脂肪幹細胞を単純に筋肉内へ注射するよりも、培養したシート状の脂肪幹細胞を表情筋に移植する方法が望ましいと考えた。シート状にすることで移植投与する脂肪幹細胞の密度を高められるとともに、生着率を 100%とすることができるため、再生治療効果の大幅な向上を期待できるからである。このような細胞シート移植治療は、ラットの傷んだ心筋に対する移植試験などで既に有効性が示されている。我々はこの細胞シート移植治療技術を益々発展させるべく、我々独自のより優れた細胞シートを開発し、これを表情筋上に移植することで、筋肉再生、機能回復の向上を目指した研究を計画した。我々が開発する優れた細胞シートとは、我々独自の方法で積層化する脂肪幹細胞シートのことである。積層化によってシートに厚みを持たせることであれば、なお一層の治療効果を期待できるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

まず、琉球大学病院内の手術において廃棄される脂肪組織を研究に使用するために、琉球大学臨床研究倫理審査委員会の承認(承認番号 810)を得た。次に、廃棄予定の脂肪組織を患者さんの同意を得て研究用に採取した。同組織を専用の滅菌済み容器に充填して琉球大学再生医療研究センター内の細胞培養加工施設まで運んだ後、ペニシリンによる静菌処理を 12 時間行った。静菌処理後に洗浄を行い、二通りの方法で脂肪幹細胞の抽出を開始した。一つ目は脂肪組織からコラゲナーゼ処理によって脂肪幹細胞を抽出する方法である。二つ目は不織布シートを用いて脂肪組織から脂肪幹細胞を抽出する方法である。我々はこれら二つの方法を使い分けながら、積層化細胞シートの原料となる脂肪幹細胞を確保した。

細胞シートの作製に関しては ~ の新しい方法を検討した。脂肪幹細胞をコラーゲンゲルに包埋して培養することでシート化する方法、脂肪幹細胞を不織布シートに

播種して培養しシート化する方法、脂肪組織を不織布シートでサンドイッチして培養しシート化する方法である。これら細胞シートの積層化に関しては、～ 共にそれぞれ我々独自の工夫が施された。～ に関しては、コラーゲンゲル(2%アテロコラーゲン中性溶液、KOKEN)に脂肪幹細胞を包埋して培養しつつ、増殖させながら積層化を図る新しい方法を考案した。～ と に関しては、複数の不織布シート(幹細胞抽出培養シート、オルソリバース)上に細胞もしくは脂肪組織を播種して増殖させ細胞シートを形成させながら積層化を図る新しい方法を考案した。これらは、新規性と進歩性を有し、特許出願の可能性のある未発表内容を含むため、詳細を記述できない。～ の方法で約18日～36日間培養(37℃、5%CO₂)し、～ は6.38 cm²、～ と は約4 cm²の円盤状の細胞シートを作製した。作製された細胞シートは電子顕微鏡および共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察され、細胞密度や接着形態などが評価された。なお、～ の細胞シートの形と面積は、シート作製に用いられたセルカルチャーディッシュ底面と同じであり、～ と の細胞シートの形と面積は用いられた不織布シートと同じである。

作製された細胞シートを両側顔面神経麻痺モデルラットに移植し、マウスの髭の動きを評価することで、顔面神経麻痺に対する治療効果を評価した。顔面神経麻痺モデルラットの作製には、7週齢のF344ラット(免疫不全ラット)およびWisterラットが用いられた。顔面神経麻痺モデルラットの作製は、両側の顔面神経本幹を剖出して神経を2～5 mm切除することで行われた。この両側顔面完全麻痺モデルラットの左顔面のみに各細胞シートを移植し、移植しなかった右顔面と髭の動きの回復状況を比較することで各細胞シートの再生治療効果を検証した。同時に、移植投与された不織布シートの生体内での経時変化をマイクロCTで定期的に撮影することで調査した。

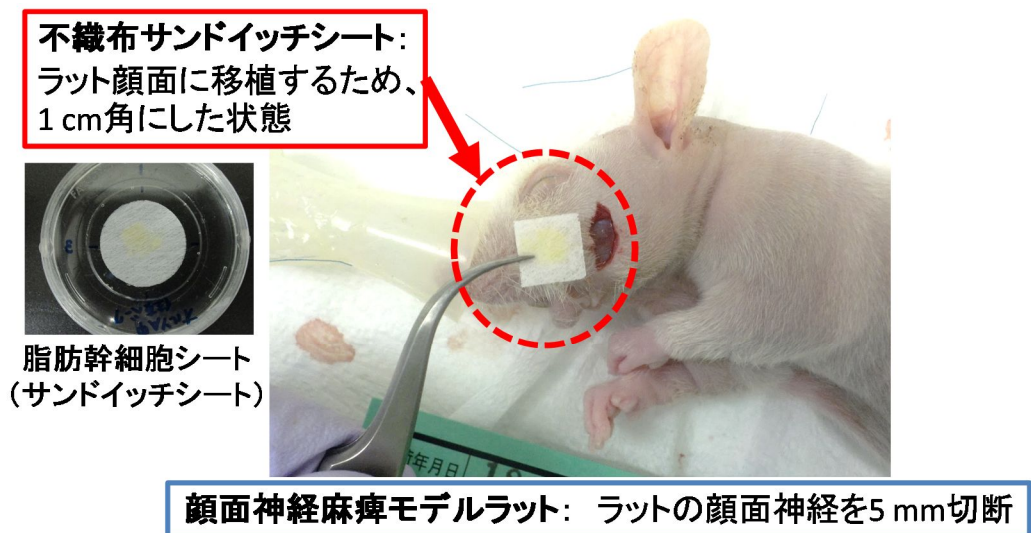
4. 研究成果

まず、～ の細胞シートの作製結果についてまとめる。コラーゲンゲル中に脂肪幹細胞を包埋して約18日間培養することにより、面積6.38 cm²、厚さ約0.79 mmの円盤状の積層型細胞シートを作製できた。共焦点レーザー走査型顕微鏡でこのシートの断面を観察したところ、シート表面から裏面までシートと平行に接着伸展した細胞が密に幾重にも積層していることが確認された。積層した細胞の分布は非常に均一であり、シートに対して平行方向に強固なアクチンフィラメントが発達していることが分かった。次に、～ と の細胞シートの作製結果についてまとめる。脂肪幹細胞1万 cells/cm²あるいは3万 cell/cm²を上述の不織布シート1枚に播種した。脂肪組織を0.02 gもしくは0.05 gを不織布シート2枚でサンドイッチするようにして播種した。これらを36日間培養することで、面積4 cm²、厚さ約0.25 mm(シート1枚)もしくは約0.50 mm(シート2枚)の円盤状のシートを作製できることが分かった。これらのシート内の細胞は、不織布繊維に沿って接着伸展し、不織布繊維の空隙を埋めるように密に増殖することが分かった。我々は、更に積層して厚みを増したシートの作製にも成功している。このシートは、いくらでも積層化能だと考えている。

次に、上述の通り作製された脂肪幹細胞シートを、両側顔面神経麻痺モデルラットに移植投与し、その治療効果を検証した。その一例として、顔面神経を麻痺させたF344ラットの患部に、患部に適した形に切った不織布サンドイッチシートを移植している様子を図1に示す。これまでに、コラーゲンゲル包埋培養シートをWisterラットに対して3例、F344ラットに対して3例、不織布担持シートをF344ラットに対して6例、不

織布サンドイッチシート を F344 ラットに対して 5 例、移植投与し実施した。その後、2 週間おきに 3 ヶ月間、両側の髭の動きと生体内のシートの経時変化を観察した。実施期間中に ~ 共に髭の動きが完全に快復することはなかったが、Wister ラットの顔面側部に コラーゲンゲル包埋培養シートを埋め込んだものが、移植投与後 1 ヶ月で最も良く髭が動くようになることが分かった。 の実験系のいずれも移植側の髭の動きが良い傾向がみられた。移植したシートがサイトカイン等を生産しパラクライン効果を周辺組織に及ぼした結果だと考えている。また、X 線 CT を用いて生体内のシートの経時変化を観察したところ、コラーゲンゲル包埋培養シート は約 3 ヶ月で完全に周囲の組織に溶け込むように消失し、 の不織布サンドイッチシート も約 3 ヶ月で周囲の組織に溶け込み、当初の 30% 程度の体積になることが分かった。

本研究で開発された厚みのある積層化細胞シートは、コイン程度のものから A4 サイズ程度のもので自由自在に作製可能である。また、剛性の調節もある程度可能なため、図 1 のように患部に適合する形に切ったり、患部に貼ったりすることが容易に行える。折りたたんだり丸めたりして更に厚みを出すことも可能である。このようにして患部全体に確実に幹細胞を配置し、それを長く患部に留める有用な再生医療用デバイスになると期待している。本研究の成果は、顔面神経麻痺による筋肉の萎縮を予防、もしくは筋肉の回復を促進する新たな再生治療法になる可能性を秘めているのではないかと考えられる。



**本細胞シートは、患部の形や大きさあわせて自在に成形可能！
様々な疾患への臨床応用を期待**

図 1 積層化脂肪幹細胞シート（不織布サンドイッチシート）の
顔面神経麻痺モデルラットへの移植投与

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ntege Edward H., Sunami Hiroshi, Shimizu Yusuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 136 ~ 153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.01.004	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 清水雄介
2. 発表標題 生分解性不織布を用いた再生治療用脂肪幹細胞シートの開発
3. 学会等名 第27回 日本形成外科学会基礎学術集会 シンポジウム1
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水雄介
2. 発表標題 培養脂肪幹細胞による陥凹性病変の治療
3. 学会等名 第17回 日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水雄介
2. 発表標題 琉球大学における再生医療の現況と課題
3. 学会等名 第132回 日本美容外科学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角南寛
2. 発表標題 脂肪幹細胞の軟骨分化を促進する足場材の開発
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Shimizu
2. 発表標題 Clinical trial for the treatment of depressed facial lesions using cultured adipose derived stem cells
3. 学会等名 3rd International Biomedical Interface Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水雄介
2. 発表標題 培養ヒト脂肪組織由来幹細胞を用いた臨床研究の開始 ~ゼロからのスタート~
3. 学会等名 第59回日本形成外科学会総会・学術集会教育セミナー
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 コラゲナーゼを用いなくて脂肪組織由来幹細胞を分離抽出するための方法、及び脂肪由来幹細胞分離抽出用キット	発明者 清水雄介、角南寛、 普天間直子、オルソ リバーズ株式会社	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/007472	出願年 2019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
研究 分 担 者	角南 寛 (Sunami Hiroshi) (50374723)	琉球大学・医学部・特命助教 (18001)	