

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20357

研究課題名（和文）幹細胞エクソソームと人工生体材料を用いた乳房再建における被膜拘縮制御法の開発

研究課題名（英文）Development of the control method for capsule contracture after breast reconstruction by artificial biomaterial with stem cell exosomes

研究代表者

渡部 聡子 (Watanabe, Satoko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20379803

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：間葉系幹細胞培養上清(MSC-CM)を含浸させたポリグリコール酸(PGA)シートでシリコンインプラントを被覆するラットを使用した動物実験モデルにより、インプラント接着面における線維性結合組織が薄く、インプラント周囲に比較的成熟した細胞外基質形成を認め、血管形成や炎症細胞は少なかった。このことからMSC-CMに存在するとされるMSC由来セクレトームには異物反応に対する抗炎症作用と異物周囲に形成される被膜の抑制効果を有す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

現在世界で広く行われている乳房再建術では人工乳房としてシリコンインプラントが使用されているが、異物反応として起こるシリコン周囲の線維性被膜（カプセル）と長期的に起こるカプセル拘縮による高度な乳房変形が問題となっている。近年、間葉系幹細胞(MSC)の培養上清中に含まれる生体因子の抗炎症作用が注目されているが、このMSC培養上清によるシリコンに対する異物反応の抑制効果についてはまだ明らかとなっていない。この細胞を用いないMSC培養上清のみによる極めて簡便な方法で異物反応が抑制できればカプセル拘縮に対する根本的な治療法の開発につながり、社会的な波及効果は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Silicon implant covered by PGA sheet with the supernatant of condition medium from cultured mesenchymal stem cell (MSC) in rat model showed that the fibrous connective tissue on the implant adhesion surface was thin and extracellular matrix around the implant was relatively mature and there was few angiogenic and inflammatory cells. This suggests that the MSC-derived secretome, which considered including bioactive factors in MSC-CM, may have an anti-inflammatory effect and an inhibitory effect on the capsule formation around the foreign body.

研究分野：形成再建外科学

キーワード：カプセル拘縮 インプラント 間葉系幹細胞 エクソソーム 培養上清 抗炎症作用

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

乳房再建では人工物を用いた方法が一般的に行われている。しかし人工物周囲では、時間の経過とともに人工物周囲線維性被膜の肥厚、および拘縮（カプセル拘縮）を来し、乳房の変形、疼痛、QOLの低下の原因となっている。これは様々な要因による慢性炎症の結果と考えられるが、現在有効な対処法が無いのが現状である。一方、近年細胞から放出されるエクソソームに関して、抗炎症作用、組織再生、免疫制御、癌転移など多様な報告がなされており、ホルモン・成長因子とは異なる細胞間情報伝達の重要な役割を担うことが分かってきた。エクソソームの心筋梗塞再生に関する研究では、エクソソームの投与で炎症性細胞浸潤を抑制、細胞増殖を促し梗塞部を縮小させることが報告されている¹⁾。また間葉系幹細胞（MSC）から得られたエクソソームが様々な組織再生に効果をもたらすと報告もあり²⁾、再生医療の強力なツールとなる可能性を秘めた因子として期待されている。そこで本研究では、MSC等の幹細胞から得られたエクソソームを用いてTE/SBI周囲の炎症性細胞の浸潤を制御、線維性被膜の形成を抑制し、大胸筋下に自由で十分な容積の空間を保持可能な、全く新しい発想に基づく新規乳房再建法の開拓と、その分子調整機構の解明を行う。

2. 研究の目的

これまで申請者らは、TE/SBIを吸収性人工生体材料であるポリグリコール酸（以下PGA）シートで覆う術式を用いた臨床研究を行っておりその安全性を確認している。PGAは生体親和性に優れた吸収性の材料であって、積極的な抗炎症作用や大胸筋下に空間を拡張する性格を示す材料ではない。そこでPGAシートにMSC等の幹細胞から得られた抗炎症作用や様々な効果を有するエクソソームを含浸させることにより、PGAシートを単なる人工生体材料から、能動的な高機能付加工生体材料へと変化させる事が可能であるとの発想に至った。また本法は既にカプセル拘縮を生じてしまった患者に対しても、修正術として瘢痕拘縮解除後、組織欠損部にエクソソーム含浸PGAシートを介在させることで炎症活性を抑制し、カプセル拘縮の再発防止に繋がる可能性が期待できる。

3. 研究の方法

当初、各種組織由来幹細胞の調整とエクソソーム精製を行う予定であった。しかしその後、骨髄由来間葉系幹細胞（以下MSC）の培養上清中にはMSC由来生体因子として溶解性蛋白、核酸、脂質および細胞外小胞が含まれており、これらはMSC由来セクレトームと呼ばれ、抗炎症作用を示し、肝炎や虚血性心疾患、変性疾患の治療が可能となりうるという報告が多く認められた³⁾。さらにcell-freeであるMSC由来セクレトームはMSCを用いた場合のような予期しない移植MSCの分化、腫瘍化といった副作用の危険性を回避でき、さらに市販のcell lineから簡単にMSC由来セクレトームが入手可能であるという利点を有する。以上のことから本研究ではエクソソーム分離、単独で使用するのではなく、より効果の期待できるエクソソームを含むセクレトームに着目してMSC培養上清をもちいて異物周囲被膜の抑制効果を検討することとした。異物周囲の被膜を形成した動物実験モデルを作製後、MSC培養上清含浸PGAシートを含めた各実験群における被膜形成を時系列で観察し、同部における組織学的変化を調査し、MSC培養上清含浸PGAシートにおける被膜拘縮の予防効果を検討することとした。

1) 動物モデルの作製

Wister系ラット雄4週齢の背部傍脊柱部に皮膚切開を加え、切開部より外側に向かって背部皮下筋膜上層を剥離してサンプルを移植するための皮下ポケットを作成する。皮下ポケット内でシリコンの動揺を防ぐため、作成する皮下ポケットのサイズは移植するシリコンの大きさと同程度のものとした。

2) 骨髄由来間葉系幹細胞の培養と培養上清の回収

ラット骨髄由来間葉系幹細胞（コスモバイオN. MSB01C）（SDラット骨髄から分離された細胞群からCD44, CD73, CD90, CD105が陽性、CD14, CD31, CD45陰性を示す細胞分離）を増殖用メディアウムでコンフルエントになるまで培養し、その後血清を含まない α MEMに培地を交換、24時間後に上清を回収したものをを用いた。

3) 実験動物モデルへのシリコンおよびMSC培養上清含浸PGAシートの移植

a) 実験1

移植後3日目の炎症反応を組織学的に観察するため、前述の動物実験モデルにより、各ポケットに①PGAシート（厚さ0.4mm）単独②PGAシート（厚さ0.4mm）で片面を完全に被覆した直径30mm厚み2mmのシリコンを各々1個ずつ移植し、移植後3日目にサンプルを摘出して10%ホルムアルデヒド溶液で24時間固定を行った。被膜組織を切開して内部シリコンは摘出し、残った被膜組織はパラフィン包埋を行なった後、5 μ m薄切切片を作成HE染色を施し組織学的に観察した。

b) 実験 2

移植後 3 週目の炎症反応と、MSC 培養上清による抗炎症作用効果を評価するため、前術と同様の方法でラットの背部に皮下ポケットを作成し、①培地含浸 PGA シート②MSC 培養上清含浸 PGA シート(厚さ 0.4mm)③シリコン+培地含浸 PGA シート④シリコン+MSC 培養上清含浸 PGA シートを移植し、サンプルを 21 日目に摘出して同様に 10%ホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋後、5 μ m 薄切切片を作成して HE 染色を行った。

c) 実験 3

以上の予備実験結果からコントロールを設定、サンプル数を増やした実験を行なった。Wister 系ラット雄 6 週齢の背部傍脊柱部に縦切開を加え、切開部より外側方向へ皮下剥離して一頭につき背部計 6 箇所の子下ポケットを作成し、各ポケットに①シリコン②シリコン+培地含浸 PGA シート③シリコン+MSC 培養上清含浸 PGA シートをそれぞれ移植し、これを計 3 匹に同様の手技で行い、各群 N=6 のサンプルを移植後 3 週目に回収した。各サンプルを前述と同様に 10%ホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋後、5 μ m 薄切切片を作成して HE 染色を行った。

4) 組織学的評価

H.E 染色標本は FSX-100 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて 40 倍視野で撮影し、撮影した画像を Image J1.47v [developed by Wayne Rasband, the National Institute of Health (NHS)] を用いて解析した。実験 3 から得られた標本では、各視野ランダムに計 4 箇所においてシリコンに接する被膜内腔側の線維性被膜の厚みを計測した平均値を求め、各群における平均値を算出した。

5) 統計処理

各群における線維性被膜の厚みを平均値で算出、Kruskal-Wallis 検定を用いて群間比較を行い、差が認められた項目については Bonferroni 補正の多重比較を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。全ての統計処理は SPSS16.0 (SPSS Japan) を用いた。

4. 研究成果

1) 組織学的検討

H.E 染色

a) 実験 1

PGA シート単独で移植した 3 日目の組織では、PGA シートの線維層の中央まで細胞浸潤は認められず、シート周囲に炎症細胞の浸潤が観察された(図 1 ①: 矢印は PGA シート線維束)。PGA シートで被覆したシリコンから得られたサンプルの組織では、同様に PGA シートの線維層中央には細胞侵入が認められず、PGA シートで覆われていないシリコンの接着面では炎症性細胞が認められた(図 1 ②: 矢印は PGA シート線維束)。

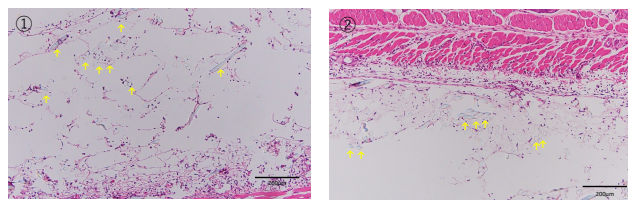
b) 実験 2

①の培地含浸 PGA シートの組織では PGA シート線維周囲に多数の多核巨細胞およびリンパ球を主体とした炎症性細胞浸潤と多数の血管腔の増生を認め、激しい炎症所見を認めた(図 2 ①)。

②の MSC 培養上清含浸 PGA シートの組織では①と同様に PGA 線維周囲の炎症性細胞浸潤を認めるが、①と比較すると線維組織は細胞外基質の形成も発達しており比較的成熟した組織と考えられた(図 2 ②)。

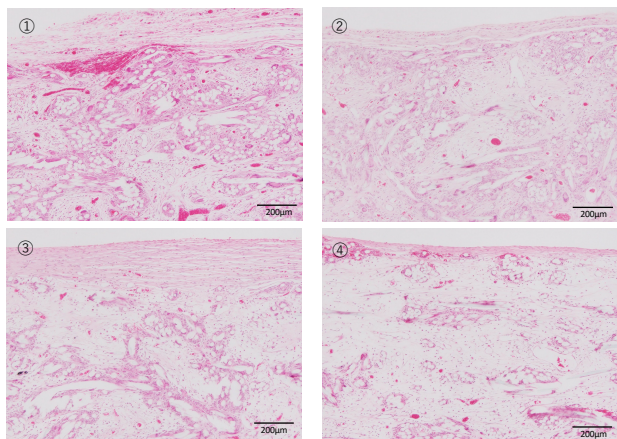
③の培地含浸 PGA シートで被覆したシリコンを移植した場合の被膜組織では、シリコン接着面の組織表面には比較的発達した厚い線維性結合組織が認められた。部分的に小血管形成と血管周囲にはリンパ球を主体とする炎症性細胞の浸潤も観察された。線維性組織下には血管腔の増生が認められ炎症があったことが考えられた(図 2 ③)。

④の MSC 培養上清含浸 PGA シートで被覆したシリコンを移植した場合の組織では、③と比較してシリコン接着面の線維性結合組織の厚みが薄く、また血管形成と周囲のリンパ球組織、残存 PGA 線維周囲の多核巨細胞の出現は比較的少なかった(図 2 ④)。



①PGAシート ②シリコン+PGAシート

図 1



①PGAシート②MSC培養上清含浸PGAシート③シリコン+培地含浸PGAシート④シリコン+MSC培養上清含浸PGAシート

図 2

- 2) 被膜の厚み計測
 実験3において各群で被膜の厚み平均値を比較したところ、シリコン単独群とその他の群では統計学的有意差を認め、シリコン+培地含浸PGAシート群とシリコン+MSC培養上清含浸PGAシート群の間では統計学的には有意差を認めなかったものの後方で厚みが薄い傾向を認めた(図3)。

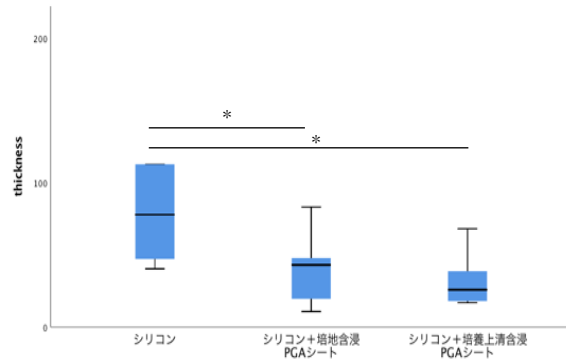


図3

【引用文献】

- 1) Ibrahim AG, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports*. 2014 May 8;2(5):606-19.
- 2) Katsuda T, Kosaka N, Takeshita F, et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*. 2013 May;13(10-11):1637-53.
- 3) Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N et al. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*. 2019 May 16;8(5)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部 聡子
2. 発表標題 ネオパールシートを用いた sling 法の組織拡張期間における有用性の検討
3. 学会等名 第 62 回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	辻極 秀次 (Tsuji giwa Hidetsugu)	岡山理科大学・理学部・教授 (35302)	