

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11539

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞の作用メカニズムの解明と新たな乳房再建法の試み

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of adipose stem cells for Attempt of new breast reconstruction procedure

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪幹細胞(ASCs)を用いた乳房再建における移植脂肪の生着率を向上させるため、ASCsの投与方法を検討した。ASCsの追加投与が、脂肪生着に寄与する血管新生を改善させることを期待した。しかし、ASCsの追加投与は、ASCs単回投与の場合と比較して血管新生を認めるものの、炎症が強く血流の改善は認めなかった。追加投与は炎症を惹起し、血流改善効果を阻害した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

脂肪幹細胞(ASCs)を用いた乳房再建において、移植脂肪の生着率の向上のため、ASCsの投与方法とそのメカニズム解明を目的とした。移植脂肪生着に寄与するASCsの血管新生作用を持続させるため、下肢虚血モデルを用いてASCsの追加投与について検討したが、血管新生は認めるも血流改善の効果は得られず、炎症性作用の関与が示唆された。現在、多くの疾患に、ASCsの様々な作用が期待されて臨床適用されているが、疾患によって必要な作用が異なっている。ASCsの投与間隔や投与量による効果の差や、期待する特定の作用を強化する方法の開発の必要性を示した点で意義がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the administration of adipose stem cells (ASCs) to improve the engraftment rate of transplanted fat in breast reconstruction using ASCs, hoping that additional administration of ASCs would improve angiogenesis, which contributes to fat engraftment. However, although additional administration of ASCs resulted in more angiogenesis than single administration of ASCs, inflammation was stronger and the rate of improvement in blood flow was worse. It was suggested that the additional administration may have induced inflammation and inhibited the effect of improving blood flow.

研究分野：形成外科

キーワード：脂肪幹細胞 乳房再建 下肢虚血 血管新生作用

### 1. 研究開始当初の背景

近年、日本の乳癌発症率は増加の一途をたどっており、年間6万人以上の新規患者が報告されている。マンモグラフィ等のスクリーニング検査による乳癌の早期発見の増加に伴い、約60%の症例で乳房温存療法が選択されており、従来の再建方法(インプラント法、皮弁術)では対応できない乳房温存療法後の陥凹変形に対する乳房再建法の需要は高い。乳房の陥凹変形に対しては、従来、吸引脂肪を注入する方法が取られてきたが、手術痕や放射線療法により、局所の血行が悪く、注入脂肪の生着が極めて不良(10~20%前後)である。その問題を解決するために行われるようになったのが、ASCsを用いた乳房再建術である。単純な吸引脂肪の注入では石灰化や嚢胞形成が起こり、硬い乳房になるが、本法を実際に行った場合、ASCsの血管新生効果により、生着率が上がり、柔らかい乳房を形成することが出来る。問題点としては、生着率は従来の脂肪注入よりは改善しているものの、移植脂肪の吸収は避けられない。解決すべき問題点のひとつは、1回の注入で大きな欠損の改善は困難であり、複数回の手術が必要となることである。そこで、さらなる生着率の向上のため、ASCsの投与方法と活性の向上法の検討が課題であり、研究の背景である。

### 2. 研究の目的

本研究では、皮下脂肪組織から単離できる分化能、血管新生能、抗炎症作用を有する脂肪組織由来幹細胞(Adipose derived stem cells : ASCs)を用いた乳房温存療法後の陥凹変形に対する治療法における生着率の向上とメカニズムの解明を目的としている。脂肪生着率の向上のため、モデル動物を用い、より効果的な投与方法として、ASCsの追加投与といった移植方法の検討と脂肪幹細胞活性化の方法の検討を行い、生着率の向上を目指す。

#### (1) 乳房再建モデルマウス作製とASCsの追加投与の検証

マウスの背中にASCsと脂肪組織を混合して移植して作製した乳房再建モデルマウスにおいてASCsのブースト投与の間隔、効果について検討する。

#### (2) ASCs作用メカニズムの解明

ASCsの作用メカニズムとして、サイトカインの分泌による血管新生効果、ASCs自身の細胞への分化、ASCsのサイトカインによる他臓器からの細胞のホーミング効果が考えられる。そこで、血管新生サイトカインの分泌量と、モデル動物の再建乳房における新生血管を解析し、血流改善効果について検証する。

#### (3) ASCsの活性に影響する因子を投与方法で解決できるか

臨床例で判明した加齢によるASCsの増殖能力の低下、ASCs活性の低下についても検討する。これらから予測されるASCsの活性低下が、ASCsの1回投与量の増加、ブースト投与期間の短縮などで改善するのかを検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 乳房再建モデルマウス作製

脂肪生着率改善に関する評価はモデル動物の脂肪生着率の安定が得られず、困難であった。そのため、移植脂肪の生着に寄与すると考えられる局所の血流改善効果の評価のため、下肢虚血モデルマウスにおけるASCsの作用およびASCs追加投与の効果の評価することとした。

#### (2) ASCs調製方法

Lewisラットから両鼠径部から皮下脂肪組織を採取し、細断してコラゲナーゼ処理を行い、ASCsを単離、採取し、3継代培養する。

#### (3) ASCsの投与間隔と投与量の設定

ASCs初回単回投与群と、ASCsを追加投与するブースト投与群における脂肪生着率の比較のため、ブースト投与の最適期間を検討した。すでに作製済みのELucを発現したトランスジェニックラット(Tgラット)由来のASCsを用い、マウス背部に移植した(Morikawa et al, 2019)。移植直後にin vivo imaging解析により、ASCsは他臓器に移行せず、移植部位に限局し、約2週間で消失する(図1)。これにより、ASCsブースト投与間隔は2週間毎と設定した。

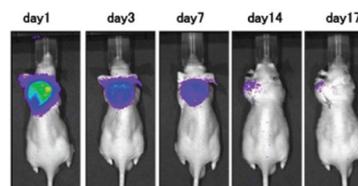


図1

#### (4) 下肢虚血モデルマウス作製および血流評価方法

免疫不全マウス(BALB/c 8週齢)の片側の大腿動脈を結紮し、下肢虚血モデルを作製

ASCsを、虚血肢作成時に1虚血下肢あたり $1 \times 10^6$  cells筋注し、1週間ごとにレーザードップラーで健側と比較で血流比を評価

Control : 下肢虚血モデルマウス作成時に、大腿内転筋群にPBSを投与する群

ASCs群 : 下肢虚血モデルマウス作成時のみに、大腿内転筋群にASCsを投与する群

Boost群 : 下肢虚血モデルマウス作成時、2週間後、4週間後に大腿内転筋群にASCsを追加投与する群

### 組織学的評価

虚血手術後 6 週間で虚血側の大腿内転筋を採取し、強拡大で筋間の炎症細胞数、線維化 (Grade0-4)、筋肉内毛細血管数の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 下肢虚血モデルマウスにおける血流評価

レーザードップラーによる血流評価では、3 群いずれも有意差は認めなかったが、虚血手術後 4 週の時点で、ASCs 群に血流の改善の傾向を認めた。Boost 群は、ASCs 追加投与後に一時的な血流の改善を認め、追加投与後 2 週間で血流の低下を認めた (図 2)。

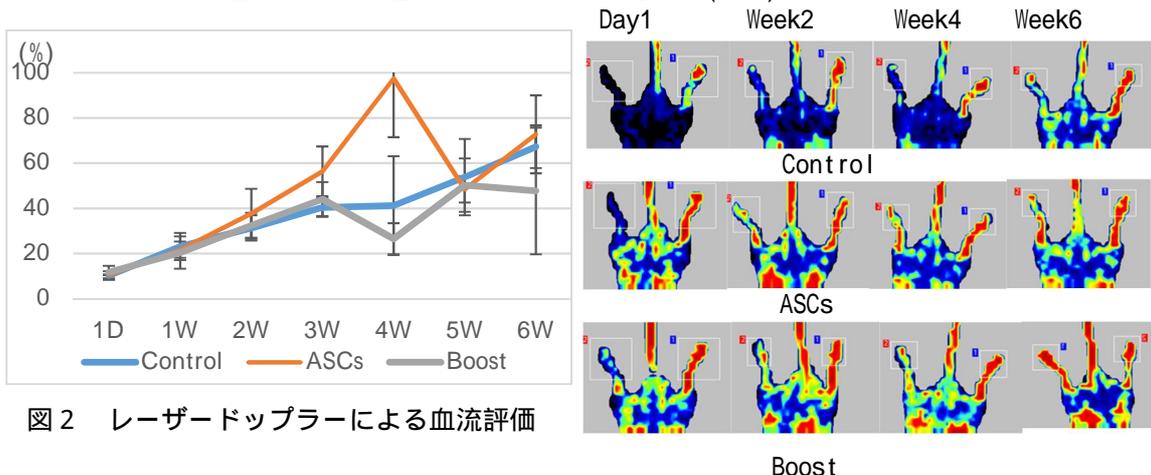


図 2 レーザードップラーによる血流評価

#### (2) 組織学的評価

虚血手術後 6 週の内転筋の組織から、炎症細胞数 (IC 図 3)、筋肉内毛細血管数 (VC 図 4)、線維化範囲 (CF 図 5) において 3 群の検討を行った (SPSS ver.25 IBM)。IC、VC において、ASCs 単回投与群と Boost 投与群で統計学的有意差を認めた ( $P_{IC}=0.031$ 、 $P_{VC}=0.025$ )。

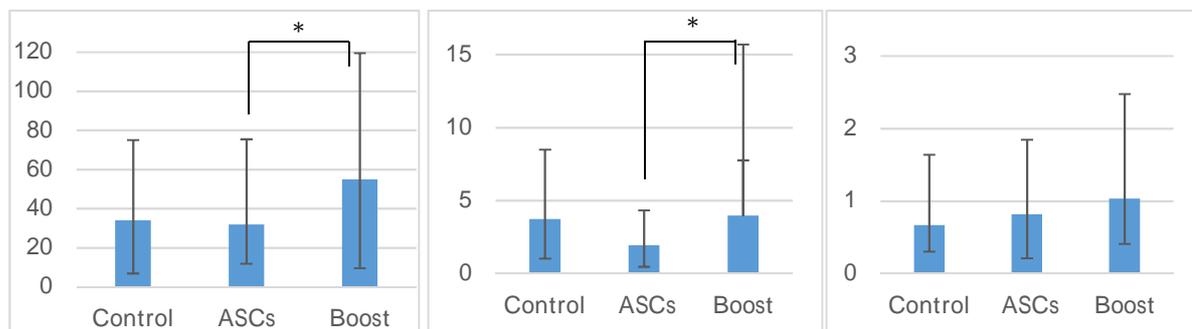


図 3 炎症細胞数 (\* < 0.05)

図 4 毛細血管数 (\* < 0.05)

図 5 線維化範囲

ASCs 追加投与は、組織学的には毛細血管数が有意に増加している一方で、虚血肢モデルにおいては追加投与に伴い一時的な改善は認めるものの持続的な血流の改善は得られなかった。炎症細胞数が有意に増加しており、ASCs 追加投与によって生じた炎症の惹起が血流改善効果を阻害している可能性が示唆された。今回の結果から、本研究の当初の目的であった乳房再建において、数週間単位での ASCs の追加投与は、炎症の惹起によって脂肪の生着が阻害される可能性が考えられる。また、VEGF、FGF 等血管新生因子の分泌による血管新生作用のみならず、ASCs と炎症性サイトカインの相互作用について in vitro に検討を行う必要がある。今後、ASCs の投与間隔や投与量による効果のみならず、多くの作用を有するとされる ASCs において特定の作用を強化する方法の開発が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Morikawa Kumi, Nakamura Kazuomi, Suyama Yoshiko, Yamamoto Kenshiro, Fukuoka Kohei, Yagi Shunjiro, Shirayoshi Yasuaki, Ohbayashi Tetsuya, Hisatome Ichiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Novel dual-reporter transgenic rodents enable cell tracking in animal models of stem cell transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100645 ~ 100645
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2019.100645	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 -
1. 著者名 Yamamoto Kenshiro, Kurata Yasutaka, Inoue Yumiko, Adachi Maya, Tsuneto Motokazu, Miake Junichiro, Ogino Kazuhide, Ninomiya Haruaki, Yoshida Akio, Shirayoshi Yasuaki, Suyama Yoshiko, Yagi Shunjiro, Nishimura Motonobu, Yamamoto Kazuhiro, Hisatome Ichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Pretreatment with an angiotensin II receptor blocker abolished ameliorating actions of adipose-derived stem cell sheets on cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 79 ~ 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2018.08.005	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 -
1. 著者名 野津 智美、櫻木 哲詩、陶山 淑子、八木 俊路朗、久留 一郎	4. 巻 69
2. 論文標題 フコイダン前投与により誘導される虚血肢の血管新生作用に関する研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 米子医学雑誌	6. 最初と最後の頁 16 ~ 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Yagi Shunjiro, Sasaki Takafumi, Fukuhara Takahiro, Fujii Kaori, Morita Maki, Suyama Yoshiko, Fukuoka Kohei, Nishino Teruyasu, Hisatome Ichiro	4. 巻 63
2. 論文標題 Hemodynamic Analysis of a Microanastomosis Using Computational Fluid Dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Yonago Acta Medica	6. 最初と最後の頁 308 ~ 312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33160/yam.2020.11.013	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 陶山 淑子、福岡 晃平、森田 真紀、八木 俊路朗、久留 一郎、原田 雄輔、岩畔 英樹、森川 久未
2. 発表標題 非培養皮下脂肪由来再生幹細胞(ADSCs)を用いた乳癌術後乳房変形に対する乳房再建の臨床研究
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 陶山 淑子、福岡 晃平、森田 真紀、八木 俊路朗、森川 久未、久留 一郎
2. 発表標題 自己皮下脂肪組織由来幹細胞(ADSC)による乳房再建術の長期経過
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 森田真紀、井上由美子、陶山淑子、野津智美、福岡晃平、遠藤祐輔、八木俊路朗、久留一郎
2. 発表標題 下肢虚血モデルマウスへの高分子フコイダン前投与における血管新生効果の検討
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

〔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
研究分担者	八木 俊路朗  (YAGI Shunjiro)  (00378192)	鳥取大学・医学部附属病院・准教授    (15101)	

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
研究分担者	福岡 晃平  (FUKUOKA Kohei)  (40548781)	鳥取大学・医学部附属病院・医員    (15101)	
研究分担者	久留 一郎  (HISATOME Ichiro)  (60211504)	鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・教授    (15101)	

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