

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18911

研究課題名(和文) 幹細胞含有細片化脂肪組織を用いた新規再生治療と製造デバイスの開発

研究課題名(英文) The development of a manufacturing device for Micronized Cellular Adipose Matrix and its application in regenerative therapy

研究代表者

森田 侑平 (Morita, Yuhei)

自治医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：90834474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト脂肪組織由来の微小細片化組織(Micronized cellular adipose matrix; MCAM)、すなわち脂肪由来幹細胞(adipose-derived stem cells, ASCs)細胞を含有する細片化脂肪組織の製造に最適な方法を検討するとともに、MCAMの治療ツールとしての有用性、安全性について、動物疾患モデルで検証した。慢性放射線障害マウスに於いて、MCAMを予防的に投与することにより、放射線照射による創傷治療の遅延を改善し、MCAMによる難治性潰瘍治療への有効性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MCAMは、これまでの脂肪移植とは全く異なるアプローチであり、組織の賦活化、肥活化、抗炎症など組織の機能不全の治療に照準を合わせ、ASCの機能を利用しつつも、規制や安全性の問題を避けて、容易に速やかに完了できる手技であり、学術的にも医学的にも期待される新規性の高い治療アプローチである。本研究は、これまでの研究成果を、臨床に橋渡しして実現するための発展性、創造性の高い研究となる。

研究成果の概要(英文)：The present study discussed the optimal method for processing the micronized cellular adipose matrix (MCAM) which is riched in adipose-derived stem cells (ASCs). Furthermore, we investigated whether a prophylactic administration of products containing adipose tissue-derived stem cells immediately after radiotherapy could prevent the development of long-term functional disorders in irradiated tissues. Our results showed that the wound healing was significantly delayed by a total 40-Gy dose of irradiation in mice. And the prophylactic treatments with three different types of human adipose tissue-derived products significantly prevented the radiation induced histological changes and accelerated wound healing compared with the vehicle-treated irradiated group. Such prophylactic treatments have the potential to improve wound healing of irradiated tissue and clinical outcomes of reconstructive surgery required after cancer radiotherapy.

研究分野：幹細胞の臨床応用

キーワード：脂肪幹細胞 微小細片化組織 MCAM 再生医療 脂肪細断

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織には、間葉系幹細胞（脂肪由来幹細胞、adipose-derived stem cells, ASCs）が高密度で含まれている。ASCは、骨髄由来MSC (mesenchymal stem cells) と同等の多分化能を持つとともに、免疫抑制作用による抗炎症効果も大きく、再生医療分野で大いに期待される。しかし、ASCを用いた細胞移植は酵素処理や培養が必要であり、法規制や安全性の問題があるため、まだ実用化は広がっていない。

我々は、ヒト由来微小細片化脂肪組織 (Micronized cellular adipose matrix, MCAM) を用いた治療法に注目した。MCAMは、機械的破砕で製造されたASCを含有する細片化脂肪組織である。再生医療等安全化法的規制外であるため、簡便に臨床応用が可能であり、すでに欧州をはじめ海外で美容目的として使用されている。一方、形態再建の目的で脂肪移植が必要になるが、組織の機能改善のためには幹細胞が重要である。脂肪組織を機械的処理により、必要性の小さい脂肪細胞を破壊し、脂肪幹細胞を含むMCAMを得ることが可能である。MCAMは、これまでの脂肪移植と異なるアプローチであり、幹細胞の効能を利用しつつも、必要注射量が少なく容易に速やかに完了できる手技である。MCAM移植は、放射線障害組織、瘢痕拘縮、慢性虚血性疾患、自己免疫疾患等形成外科領域をはじめ様々な分野の難治性疾患に於いて、質的・機能的(血流、治癒能、進展能、再生能等) 改善することが期待される。

2. 研究の目的

- 1) 微小細片化脂肪組織 (MCAM) の製造方法の最適化を行うこと。
- 2) 実験動物モデルを通して、治療ツールとしてのMCAMの有効性と安全性を検証すること。

3. 研究の方法

【ヒト吸引脂肪検体について】

自治医科大学倫理審査委員会で承認を受けたフォームを用いて、文書による同意を得られたBMIが正常範囲の患者から、吸引脂肪組織検体を入手する。

【MCAM 製造技術の最適化】

MCAMを製造するため、脂肪組織破断用デバイス（以下：細断機と省略する）を用いた。実験手順は図1で示す。最適な製造方法の評価指標として、細断の条件（回転カッター形状・回転数・細断時間）、検体処理時間、製造品の構造や均一性、製造品重量、製造品に含まれる幹細胞の生存率等を用いて検討した。

【細片化脂肪組織の移植実験：有効性・安全性の検証】

慢性放射線障害マウスモデルは、マウスの背部皮膚に、総線量40Gy(毎週10Gy×4週間)の放射線照射を行うことによって作成する。照射後、照射部位に下記の条件で局所投与する：

図 1



放射線非照射群： 基礎培地局注 (0.2 mL)

放射線照射 Vehicle 群： 基礎培地局注 (0.2 mL)

放射線照射脂肪組織投与群： 遠心後脂肪組織 (0.2 mL)

放射線照射 SVF 投与群： 間質血管細胞群 (7.5×10^4 cells/0.2 mL 基礎培地)

放射線照射 MCAM 投与群： MCAM (0.2 mL)

6ヶ月後、照射部位の皮膚欠損創を作成することで難治性潰瘍を作る。全身麻酔下にバイオプシーパンチ(6.0 mm直径)により、皮膚全層を剥離する。創面収縮を防ぐ目的で、ドーナツ型のシリコンプリント(ドーナツ穴直径9.0 mm)を6-0ナイロンで固定する。さらに、ドレッシング剤でシリコンプリントの脱落、創部乾燥、及び痂皮形成を防ぐ。

創作成日はD0として15日まで、3日毎に創傷部の経過を一眼レフカメラでマクロ撮影し、創部の面積から創傷治癒効果を評価する。創部の経過を記録後、マウスを安楽死させ組織学的な解析により、創部の上皮化、肥沃化、血管新生を確認する。創傷部組織形態をH&E染色法、Mallory-Azan染色法などにより評価する。

4. 研究成果

1. 最適なMCAMを製造するための細断パラメータについて

図1で示した手順で細断機を用いてヒト吸引脂肪組織の細断を行った。細断条件、検体処理時間、製造品の均一性、重量または製造品に含まれる幹細胞の生存率等を総合的判断したうえで、MCAMを効率よく製造するための各パラメータを決めた。丸型回転カッターで、回転数2000rpm、細断回数を4回、検体流速を30mL/min 15mL/min 7.5mL/min 3.8mL/min 段階的に設定し、処理時間を5minにする場合、より多くのMCAMを回収することができ、MCAMに含まれる脂肪幹細胞(ASC)の生存率も高かった。

2. 難治性潰瘍疾患モデルを用いて細片化脂肪組織の移植実験を行い、MCAMの有効性及び安全性について検証した

慢性放射線障害マウスモデルに、予防目的で吸引脂肪、SVF、ないしMCAMを投与し、Vehicle群ではASC培養用基礎培地を投与した。Vehicle群と比較して、MCAM、遠心後の脂肪組織(fat)やSVFの予防的な投与は放射線照射による創傷治癒の遅延を改善し、MCAMによる難治性潰瘍治療への有効性を示した(図2と図3。論文投稿中のため、2022年9月1日以降公開する予定です)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morishita Yuya, Sunaga Ataru, Gomi Akira, Hatade Alice, Morita Yuhei, Yoshimura Kotaro	4. 巻 9
2. 論文標題 Multi-directional Cranial Distraction Osteogenesis for Treating Sagittal Synostosis with Frontometaphyseal Dysplasia: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open	6. 最初と最後の頁 e3551 ~ e3551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/GOX.0000000000003551	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 Morita Yuhei, Yamamoto Naoto, Uchiyama Taku	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Nodular Pseudogout of the Skull Base Arising From the Temporomandibular Joint	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Craniofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 e475-e477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SCS.0000000000007437	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------