

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09870

研究課題名（和文）ヒト脂肪組織マトリックス微小細片の製造法の最適化、特性解析および再生医療への応用

研究課題名（英文）Optimization, Characterization and Regenerative Medicine Application of Human Micronized Cellular Adipose Matrix

研究代表者

吉里 勝利 (YOSHIZATO, KATSUTOSHI)

自治医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：20095516

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）：ヒト脂肪組織から不要な脂肪細胞を取り除き、細胞外マトリックスおよび脂肪由来幹細胞（ASC）などの有用細胞が濃縮された微小細片化組織を効率よく作製する目的で、脂肪組織を微小細片化するための細断デバイスを試作した。手術で余剰となったヒト脂肪組織からデバイスを用いて微小細片化ヒト脂肪組織を調製し、細断組織の評価を行った。カッターの仕様の改良および細断ステップの最適化を行うことで、有用細胞にダメージを与えることなく効果的に脂肪組織を細断できる条件を検討した。オリフィスカッターを用いることで脂肪細胞が完全に除去、またはある程度除去され、かつ有用細胞が生きのまま濃縮された組織を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪組織中には脂肪幹細胞（ASC）や脂肪由来血管内皮前駆細胞（AEPC）など再生医療に有用な細胞群が含まれており、組織移植や細胞移植による治療効果が期待されている。脂肪組織の体積の大半は脂肪細胞が占め、ASCやAEPCなどの有用細胞は組織内の毛細血管網や特に結合組織（マトリックス）内に多く存在している。脂肪組織から不要な脂肪細胞を取り除き、有用な細胞が濃縮された注射可能な微小断片を作製し治療に用いることで、組織の賦活化、肥沃化、抗炎症など組織の機能回復をより効果的に行えることができ、応用範囲が広がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：For the purpose of removing unnecessary adipocytes from human adipose tissues and efficiently producing micro-fragmented tissues enriched with useful cells such as extracellular matrix and adipose-derived stem cells (ASC), some prototype shredding devices were used to prepare micro-fragmented human adipose tissues from surplus human adipose tissues after surgery, and the minced tissues were evaluated. By improving the specifications of the cutters and optimizing the chopping steps, we investigated the conditions under which adipose tissue can be effectively chopped without damaging useful cells. By using an orifice cutter, it was possible to obtain a tissue in which adipocytes were completely removed or removed to some extent and useful cells were enriched while alive.

研究分野：再生医学

キーワード：微小細片化組織 ヒト脂肪組織 マトリックス微小細片

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

脂肪組織中には脂肪幹細胞（ASC）や脂肪由来血管内皮前駆細胞（AEPC）など再生医療に有用な細胞群が含まれており、組織移植や細胞移植による治療効果が期待されている。ASCは免疫寛容の特性を示すとともに、骨髄由来MSCと同等の多分化能（脂肪、骨、軟骨、骨格筋、心筋、血管、肝臓などのへ分化する能力）を持つ。さらにASCはそれが持つ免疫抑制作用による抗炎症効果も注目されている。一方、AEPCは、血流障害から起こる難治性潰瘍などの虚血性疾患に対する血管新生治療への応用が期待される。これらのことから、脂肪移植は、組織欠損の再建のための充填術としてだけでなく、様々な病的臓器に対する、ASCやAEPCの作用を介した再生効果（機能回復）が期待されている。

脂肪組織の体積の大半は脂肪細胞が占め、ASCやAEPCなどの有用細胞は組織内の毛細血管網や特に結合組織（マトリックス）内に多く存在している。有効な治療ツールとして、不要な脂肪細胞を除去し有用細胞を高密度に含む注入材（ヒト脂肪組織マトリックス微小細片）が注目されている。細片化した脂肪組織は、MCAM(Micronized Cellular Adipose Matrix)、Nanofat、SVFgel、Lipogemなどと名付けられ、組織の賦活化、肥沃化、抗炎症など組織の機能回復に有効であることが示されてきている。脂肪組織マトリックス微小細片は、ASCおよびAEPCがニッチに存在したままの機能を維持しつつ、脂肪細胞が除去されることで体積（必要注射量）が50分の1になり、さらには“細胞治療”ではないため再生医療等安全性確保法などの規制や安全性の問題を避けて、速やかかつ簡便に実施できる（30G針で皮内にも局注が可能）新しいアプローチである。申請者らの研究室ではこれまでに、放射線障害および糖尿病潰瘍モデルへMCAMを投与し、その有効性を論文報告してきた[1, 2]。これらの細片化脂肪組織の調製はこれまで手作業で行われてきたため、不均一で、処理速度、処理量に限界があり、いまだに最適化や標準化が行われていない。また、脂肪組織中には1gあたり約500万のSVF（ASCやAEPCを含む間質血管細胞群）が含まれていると言われているが、通常の酵素処理では1gあたり約50万前後のSVFしか抽出されない。培養は可能であるが、培養増幅過程における機能の低下は否めない。マトリックス微小細片では増幅は難しいが、細胞が従来通りに組織内のニッチに存在するため、単離した細胞と異なり本来の高い機能が投与直後から期待できる大きな利点を持つ。

### 2. 研究の目的

本研究では、放射線障害または糖尿病に起因する難治性潰瘍などの病的組織の機能を回復させる目的で、(1)ヒト脂肪組織を注射針で投与可能な形態へ微小細片化するための製造法とそのためのデバイスの開発および最適化、(2)1で製造したヒト脂肪組織マトリックス微小細片の機能特性解析、(3)ヒト脂肪組織マトリックス微小細片の疾患モデル動物を使った前臨床研究による安全性と有効性の検証、を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1)ヒト脂肪組織マトリックス微小細片製造のための新たなデバイスの開発

株式会社日進製作所との共同で、脂肪組織を微小細片化するための新たなデバイスの開発・製造委託を行う。脂肪組織細片化装置を試作し、脂肪マトリックスの大半を30G針で通過可能な200 $\mu$ m以下に断片化する。さらに不要な脂肪細胞を取り除くための細断条件の最適化およびデバイスの改良を行う。

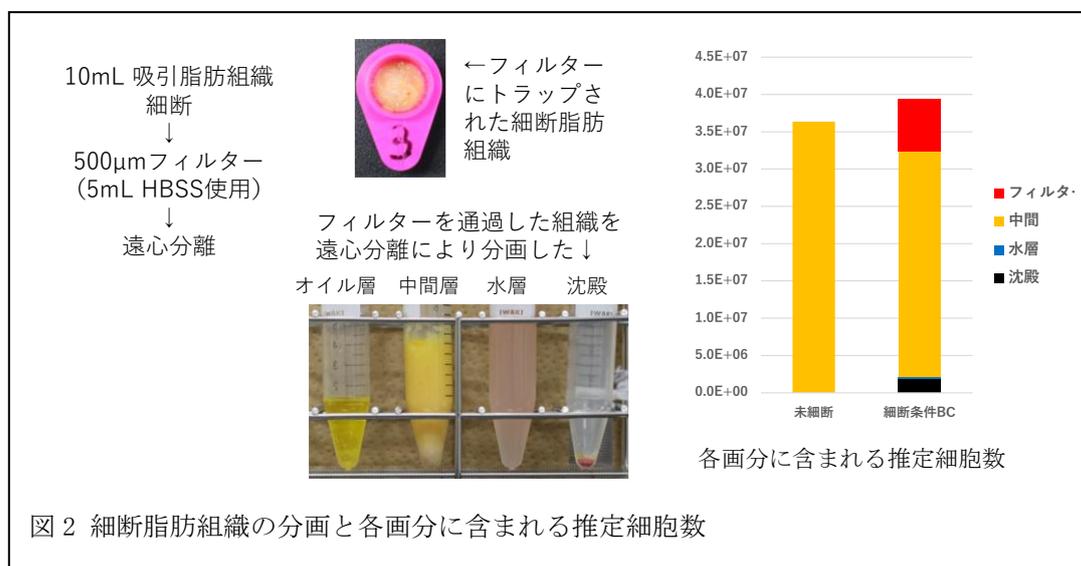
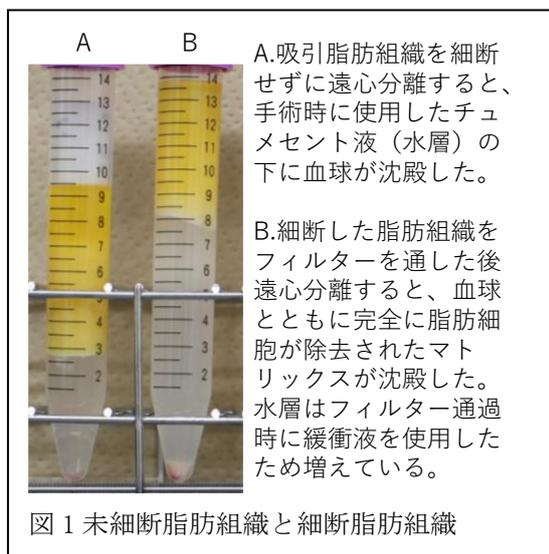
#### (2)ヒト脂肪組織マトリックス微小細片の機能特性解析

脂肪組織細片化装置を用いて微小細片化したヒト脂肪組織を遠心することで、脂肪細胞が完全にまたはほとんど除去された沈殿層（ヒト脂肪組織マトリックス微小細片）を得る。この沈殿層にASCが含まれていることをexplant cultureによって確認する。この微小細片の機能特性を明らかにするために、マトリックス微小細片を用いて①SVF抽出を行い、単位組織あたりに存在するASCの数を細片化前吸引脂肪組織と比較する、②explant culture（10%FBS含有DMEM/F12）により培養増幅した幹細胞の観察を行う。

### 4. 研究成果

(1)脂肪組織を微小細片化するための細断デバイスを試作し、手術で余剰となったヒト脂肪組織からマトリックス微小細片を細断によって調製し、細断組織の評価を行った。デバイスの改良を行いさまざまな条件設定し、組織片の大きさ、脂肪細胞の除去程度、有用細胞の生存を指標として最適化を試みた。未細断の脂肪組織を遠心分離すると、血球などがわずかに沈殿するが、細断を行うことで脂肪細胞が除去されたマトリックス微小細片が得られた（図1）。約80%の組織片を目標の500ミクロン以下の大きさに細断することができた。脂肪細胞を完全に除去した組織片はわずかしかが得られなかったが、細断組織を遠心分離することにより油層が発生したことから、脂肪細胞の破壊をある程度行えていることがわかった。油層を除去することで、細胞外マトリックスおよび有用細胞が濃縮された微小細片化組織を得ることができた（図2 中間層、沈殿）。

一方、細断組織を遠心分離して得られた水層には核酸がほとんど検出されず、濃縮された微小細片化組織(中間層と沈殿)において核酸のほとんどが検出されたことから、細断によって有用細胞の破壊がほとんど起こっていないことが示唆された(図2)。Explant culture によって、微小細片化組織からも未細断組織と同様に脂肪由来幹細胞の遊走と増殖を確認することができた。微小細片化組織からのSVF抽出を行い、未細断組織と同程度のSVF(間質血管細胞群)を得ることができた。脂肪細胞が完全に除去された組織は遠心分離により沈殿したヒト脂肪組織マトリックス微小細片はわずかであり、ほとんどが遠心分離後でも水層の上に浮いた不完全に除去されている組織(中間層)であったこと、フィルターにトラップされた組織にも細胞が残存していたことから、細断効率の向上と不要な脂肪細胞を除去するためのさらなるデバイスの改良が必要であると考えられた。



(2) ヒト脂肪組織から不要な脂肪細胞を取り除き、細胞外マトリックスおよび脂肪由来幹細胞(ASC)などの有用細胞が濃縮されたヒト脂肪組織マトリックス微小細片を効率よく作製する目的で、3種類のカッター(3方向カッター、3穴カッター、オリフィスカッター)を試作した。これらを用いて手術で不要となったヒト脂肪組織を使い細断による評価を行った。組織の細断サイズは30ゲージの注射針が通る500ミクロン前後、摩擦熱を低く抑える(40°Cを超えない)、高い細胞の生存率(80%)を目標とし、組織培養によるASCの遊走・増殖、間質血管細胞群(SVF)の抽出も指標とした。3穴カッターと比べると3方向カッターのほうがより細かい細断サイズを実現し細片化組織はASCに富んでいたが、摩擦熱のため細断継続5分で生存率が低くなった。一方、オリフィスカッターは、生存率および細断サイズいずれにおいても良好な結果を示した。

(3) オリフィスカッターによる脂肪組織の細断が最も良好な結果を示したことから、カッターの仕様および細断ステップを変えることで有用細胞にダメージを与えることなくより効果的に組織を細断できる条件を検討した。固定刃と回転刃の間の隙間を50µmまたは200µm、カッターの穴の形状を丸または角、穴の大きさがφ0.5mmと2mmのオリフィスカッターを作成した。細断ステップでは理論上の断片長を踏まえ、脂肪組織の送り速度(流速)、刃の回転速度、組織の往復回数を様々に組み合わせたいくつものパターンで細断を行い、実際の細断効率を検証した(表1)。評価方法として、細断した脂肪組織を500µmフィルターに通し細断状態を確認するとともに、フィルターに残存した組織の量及び通過した組織の脂肪細胞の除去の状態や有用細胞の増殖の様子を比較した(図3)。細断スピードを上げると固定刃と回転刃が擦れて発生した金属粉の発生が見られ、隙間が50µmカッターでは、摩擦熱の発生で生存細胞数が少なくなった。隙間200µmのカッターでは、固定刃と回転刃の間に脂肪組織中に含まれる繊維が詰まりやすかったが、細断スピードを上げることで詰まることなく細断は可能であり、摩擦熱の発生も抑えられた。いずれも穴の形状は細断効率に影響しなかった。また、カッターの隙間の違いによって脂肪細胞の除去効率に大きな違いは見られなかった。細断された組織をExplant cultureすることで、脂肪

組織由来幹細胞の増殖を確認することができた (図 4)。オリフィスカッターを用いることで脂肪細胞が完全に除去、またはある程度除去され、かつ有用細胞が生きたまま濃縮された組織を得ることができた。

表 1. 細断条件

実験群	カッターの隙間( $\mu\text{m}$ )	カッターの穴の形状	カッターの出入り口の穴の大きさ	脂肪組織の流速 (mL/min)	カッターの回転数 (rpm)
A	50	丸	① $\phi 2\text{mm} \rightarrow \phi 2\text{mm}$ ② $\phi 2\text{mm} \rightarrow \phi 0.5\text{mm}$	①30 ②4.7	600
B	50	丸	① $\phi 2\text{mm} \rightarrow \phi 2\text{mm}$ ② $\phi 2\text{mm} \rightarrow \phi 0.5\text{mm}$	①30 ②4.7	1000
C	200	丸	① $\phi 2\text{mm} \rightarrow \phi 2\text{mm}$ ② $\phi 2\text{mm} \rightarrow \phi 0.5\text{mm}$	①30 ②4.7	1000
D	50	角	① $\phi 2\text{mm} \rightarrow \phi 2\text{mm}$ ② $\phi 2\text{mm} \rightarrow \phi 0.5\text{mm}$	①30 ②4.7	1000
E	200	角	① $\phi 2\text{mm} \rightarrow \phi 2\text{mm}$ ② $\phi 2\text{mm} \rightarrow \phi 0.5\text{mm}$	①30 ②4.7	1000

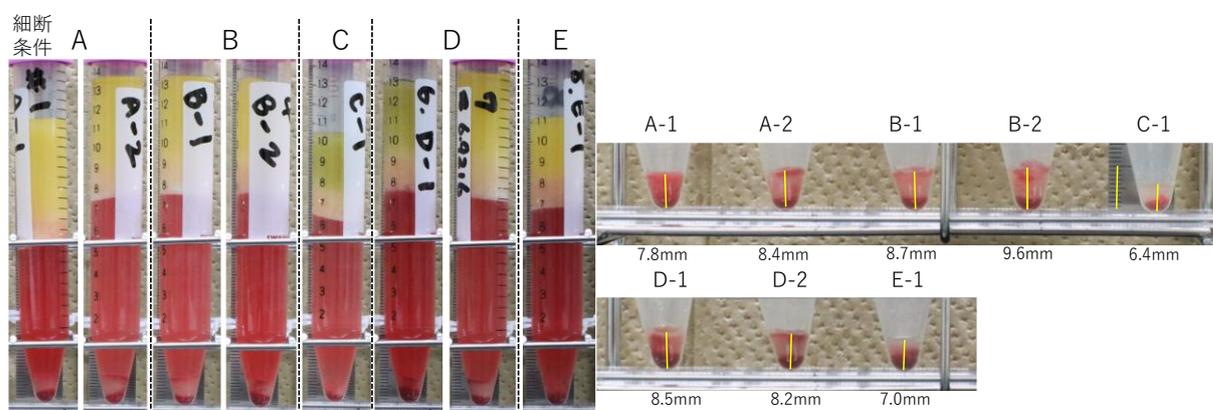


図 3 細断条件を変えて脂肪組織を細断した後、フィルターを通し遠心し、沈殿の高さを比較した。

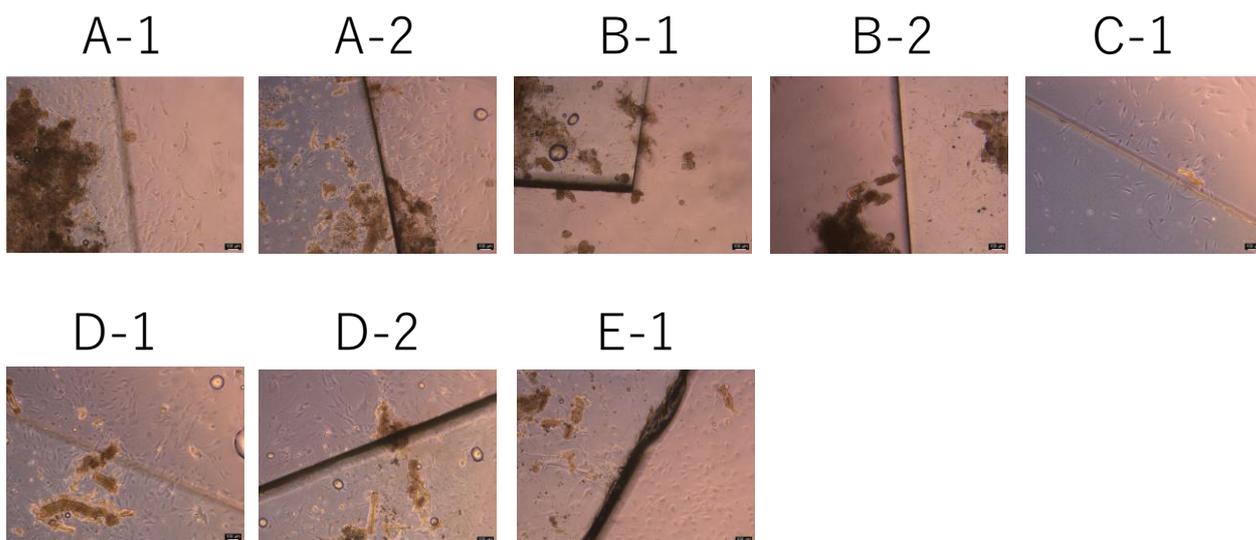


図 4 細断後の沈殿をカバーガラスで押さえ Explant culture を行い、すべての沈殿から ASC の増殖を確認した。

## 【参考文献】

1. Feng J. et al. *Regene.Med.*2015; 10(6): 699-708.
2. Wu et al. *Plast. Reconstr. Surg.* 2018; 142(2): 282-291.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	吉村 浩太郎  (YOSHIMURA KOTARO)  (60210762)	自治医科大学・医学部・教授    (32202)	

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