

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18437

研究課題名(和文) 幹細胞産生因子を用い形成する脂肪移植至適環境の開発

研究課題名(英文) Development of an optimal environment for fat grafting using stem cell growth factors

研究代表者

太田 智之(Ota, Tomoyuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90869140

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)：我々は脂肪注入術における生着率を向上させるため、皮下インプラント留置後に脂肪移植をする Induced Membrane法に幹細胞が産生する細胞増殖因子・サイトカインの作用を付加した移植環境作成を試みた。結果、ペルナックGプラスに上清を含浸させた基材を脂肪注入前に移植した群では移植脂肪の残存率、組織学的結果ともに安定した結果が得られたが、他の環境群と明確な差を示すまでには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳房再建術における脂肪注入術は、他の術式より侵襲が小さく患者の負担は非常に少ない半面、一度の移植で生着可能な組織量が少なく複数回の手術が必要になることが欠点である。本邦では移植環境形成に関する報告は少なく、本研究は幹細胞が産生する細胞増殖因子やサイトカインを作用させ、脂肪生着・再生を促す移植環境を形成し、脂肪保持率を向上させた安全で確実な脂肪移植法を確立するものである。結果として Induced Membrane法に幹細胞産生因子を付加した移植環境群と、コントロール群での明確な差を示すにはいたらなかったが、移植環境の解析を行うことにより脂肪生着・再生のメカニズム解明への足掛かりとなった。

研究成果の概要(英文)：To improve the engraftment rate of fat injections, we attempted to create a conducive transplantation environment by adding cell growth factors and cytokines produced by stem cells, to the first step of the induced membrane (IM) method, in which fat is transplanted after subcutaneous implant placement. Subsequently, stable results were obtained in terms of fat residuals and histological analysis, in subjects in the group in which PELNAC Gplus supernatant-impregnated base material was transplanted before fat injection. However, the results were not clearly distinct from those obtained in subjects in the other environmental groups.

研究分野：形成再建外科

キーワード：脂肪幹細胞 培養上清 移植環境 幹細胞産生因子 皮下反復注射 基材移植 IM法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦では、乳癌術後の患者に対して乳房再建術が年間5千件以上施行されていると推定される。乳癌罹患数の増加と再建手術の認知度向上に伴い乳房再建手術を希望する患者数は年々増加しており、患者QOLを高めるためにより安全で確実な乳房再建術が求められている。脂肪注入は他の術式より侵襲が小さく患者の負担は非常に少ない半面、一度の移植で生着可能な組織量が少なく複数回の手術が必要になることが欠点であるが、この欠点が克服できれば理想的な乳房再建方法となる。脂肪保持率改善のため移植細胞に着目し、脂肪細胞の精製方法や注入方法の工夫、脂肪由来幹細胞(以下 ASCs)を付加する研究が多数なされている。しかし、そのボリューム保持率は53~75%であり、十分な生着とは言えない(Coleman et al. Plast Reconstr Surg. 1994, Rasmussen et al. Plast Reconstr Surg. 2019)。また、近年では細胞の生存や機能の発現には細胞とその周辺環境との相互作用が重要と言われており、細胞周辺環境(細胞ニッチ)が注目されている。細胞ニッチとは、細胞外マトリクス(細胞のすみか)や細胞増殖因子のことである。移植環境形成に関する報告は数少ないが、外部からの陰圧により移植部容積を拡大させる研究、あるいはVEGFの移植前投与の研究などがある(Oranges et al. Plast Reconstr Surg. 2019)。研究協力者の中桐も、皮下インプラント留置後に脂肪移植をする Induced Membrane 法(以下 IM法)の研究を行った(若手研究(B)H25~26)。その結果、IM法においてVEGFの強い発現と、より広範囲での脂肪生着を認めた。しかし、これらの研究でも十分な生着量とは言えず、さらに良好な移植環境形成のため細胞増殖因子の付加が必要と考えた。一方、幹細胞研究で、幹細胞が産生する増殖因子やサイトカインが炎症性細胞を制御し、細胞増殖を促していると報告されており(Ibrahim et al. Stem Cell Report.2014)、幹細胞培養後の培養上清にも注目が集まっている。

2. 研究の目的

本研究は、幹細胞が産生する細胞増殖因子・サイトカインの作用をIM法に付加し、脂肪移植に最も適した環境形成を確立し、新規脂肪移植法を開発することを目的としている。本研究の独自性は、IM法による移植空間確保時に、幹細胞産生因子の作用を付加して作製した移植環境について検討し、移植脂肪が確実に生着する移植最適環境を形成することである。本研究により、低侵襲で確実な脂肪移植が確立されれば新たな乳房再建方法となり、患者のQOL向上が期待できる。さらに、幹細胞産生因子の解析・移植環境の解析を行うことにより、脂肪生着・再生メカニズムの解明につながる。

3. 研究の方法

ウィスター系ラットの鼠径部より脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理を行うことでASCsを抽出し血清含有培地(DMEM低グルコース培地)にて培養を行った。サブコンフルエントに達した後、培地を無血清のものに変更し48時間培養したのちに上清を回収した。次に移植環境の最適化のためにラット皮下に1mlずつ上清または生食を注入する皮下反復注射群と、皮下に上清と生食を含ませた徐放性基材(Medgel® ペルナックG®)を移植した基材移植群を作成した。3週間後に鼠径部より脂肪を採取し、細かく破碎したものを前述の移植環境作成部位に各1mlずつ注入した。移植後、経時的に小型実験動物用X線CT装置(日立アロカLatheta LCT200)にて移植脂肪の容量の経時的变化を観察し、脂肪移植後8週間の時点で同様にCTにて移植脂肪の容量の最終評価を行い、組織を採取して組織学的変化を観察した。

4. 研究成果

(1)移植脂肪体積変化

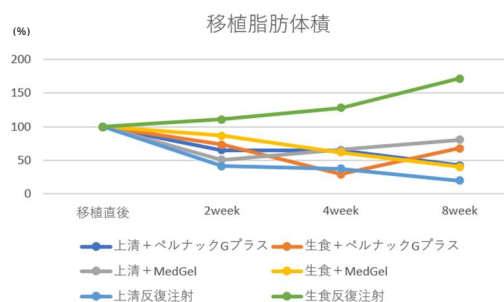
背部脂肪体積変化率

ラット背部にそれぞれ移植環境(1:上清 + ペルナックGプラス 2:生食 + ペルナックGプラス 3:上清 + Medgel 4:生食 + Medgel 5:上清反復注射 6:生食反復注射)を作成し、脂肪移植術を施行した。移植後2週間、4週間、8週間でCT撮影を行い、8週間での脂肪の体積変化率は1:42.2% 2:67.54% 3:80.26% 4:39.98% 5:19.14% 6:172%であった(表1)。

コントロールである生食反復注射群で移植時

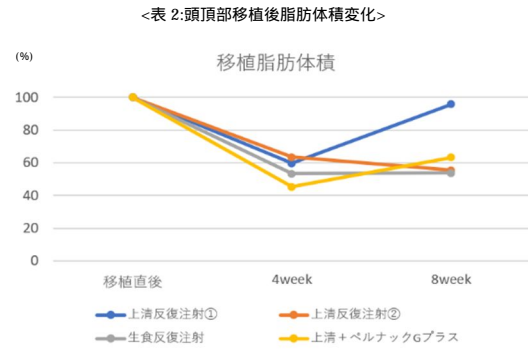
より容量が拡大するという結果となったが、背部は移植床周囲にも脂肪組織が存在するため、移植した脂肪の体積の正確な評価が困難な可能性があり、次に頭頂部への脂肪移植を行った。

<表 1:背部移植後脂肪体積変化>



頭頂部脂肪体積変化率

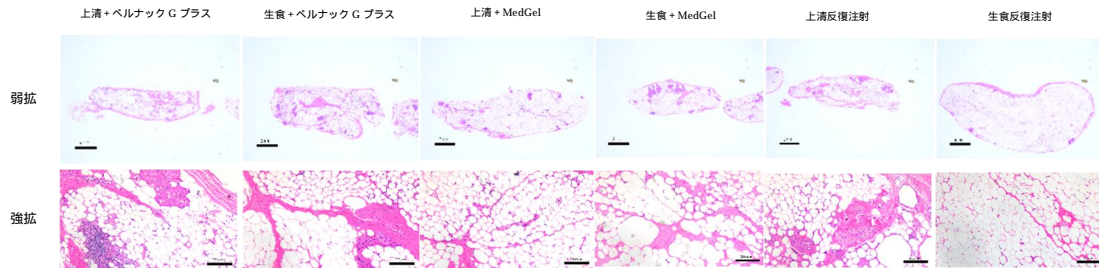
ラット頭頂部にそれぞれ移植環境(1:上清反復注射群 2:上清反復注射群 3:生食反復注射 4:上清+ペルナックGプラス)を作成し(どの群も n=2 で環境作成したが、生食反復注射群、上清+ペルナックGプラス群が1匹ずつ実験経過中に死亡した。)、脂肪移植術を施行した。移植後4週間、8週間でCT撮影を行い、8週間での脂肪の体積変化率は1:95.9% 2:55.5% 3:53.8% 4:63.3%であった(表2)。移植後8週間の時点では上清反復注射 において残存脂肪体積が最も大きい結果となった。



(2)組織学的検討

背部移植脂肪組織(H・E染色)(表3)

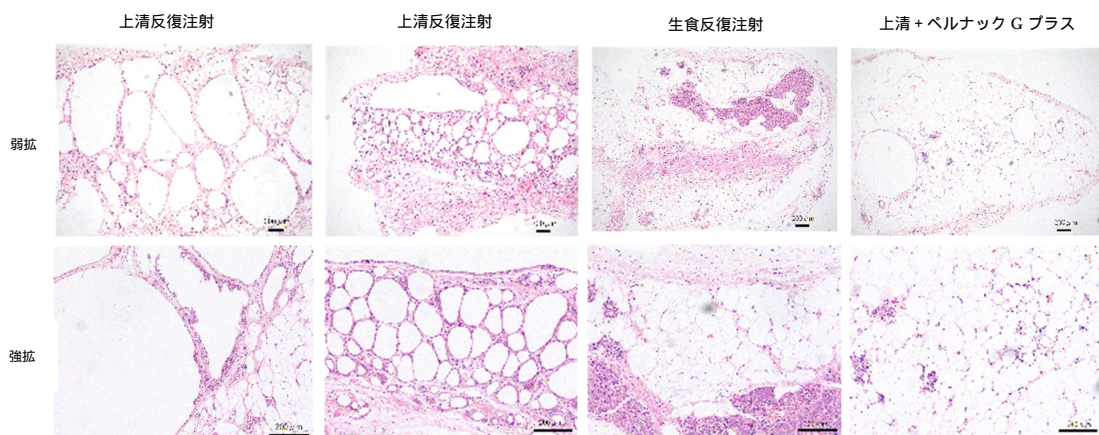
<表 3:背部移植脂肪H・E染色>



どの移植環境においても、脂肪の生着を認めたが、背部は移植脂肪と移植床周囲の脂肪組織の境界が不明瞭であり、参考評価とした。

-1.頭頂部移植脂肪組織(H・E染色)(表4)

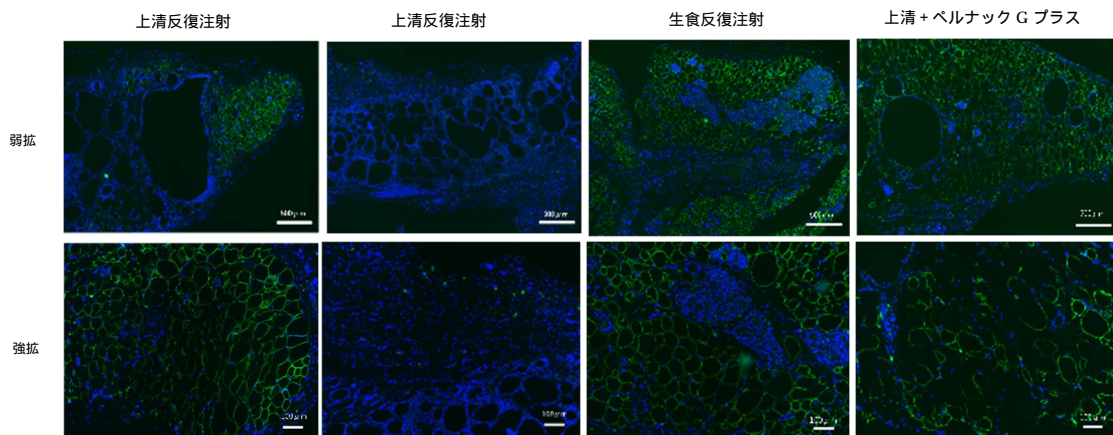
<表 4:頭頂部移植脂肪H・E染色>



上清反復注射 では、オイルシストを思わせる巨大な脂肪滴が散見され、細かい脂肪滴の占める範囲は減少を認めている。上清反復注射 と生食反復注射では、細かい脂肪滴は認めるものの周囲に癥痕様の非脂肪組織を形成していた。上清+ペルナックGプラスでは細かい脂肪滴の残存を認めたが、一部には大きな脂肪滴を形成していた。

-2. 頭頂部移植脂肪組織 (Perillipin 染色) (表 5)

<表 5:頭頂部移植脂肪 Perillipin 染色>



脂肪生着の指標として Perillipin 染色を行った。上清反復注射 では、巨大脂肪滴は Perillipin で染色されず、小さい脂肪滴のみが Perillipin 陽性であった。上清反復注射 では Perillipin 陽性細胞をほぼ認めず、移植脂肪は不生着であったと考えられた。生食反復注射、上清+ペルナック G プラスでは移植脂肪の大半は Perillipin 陽性であった。

(3)まとめ

頭頂部に移植した脂肪の 8 週間後の体積変化率は、上清反復注射 (95.9%) > 上清+ペルナック G プラス(63.3%)>上清反復注射 (55.5%)>生食反復注射(53.8%)と、上清反復注射 で最も脂肪残存率が高かった。しかしながら、組織学的には巨大な脂肪滴が移植組織の大部分を占め、同部位は Perillipin 染色で染色を認めないことから、臨床上のオイルシストの様な病態を呈しているのではないかと考えられた。また、上清反復注射 では脂肪は不生着であったと考えられる。これらのことから、上清+ペルナック G プラス(幹細胞産生因子+IM 法)は画像上での脂肪残存率、組織学的ともに安定した結果を得られたと考えられる。ただし、コントロールである生食反復注射と明確な差を示すまでには至らず、本方法が脂肪注入術における生着率の向上に寄与する可能性を示唆するにとどまった。

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
研究協力者	辻極 秀次 (Tsujigiwa Hidetsugu)		
研究協力者	渡部 聡子 (Watanabe Satoko)		
研究協力者	中桐 僚子 (Nakagiri Ryoko)		

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