HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	羊膜由来間葉系幹細胞による移植脂肪生着向上効果の検証 [全文の要約]
Author(s)	伊藤, 梨里
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14479号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/81908
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号：2595
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Riri_Ito_summary.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文（要 約）

羊膜由来間葉系幹細胞による
移植脂肪生着向上効果の検証
（Studies on the effect of amnion-derived mesenchymal stem cells to promote the survival of fat grafts）

２０２１年３月

北　海　道　大　学

伊　藤　梨　里

Riri ITO

【諸言】 脂肪移植は、軟部組織の増量を図るため、皮下脂肪を吸引により採取し脂肪組織が破壊されて生じた油滴や血液成分を遠心分離により除去した後、患部に注入する手法である。余剰な皮下脂肪のみを使用する低侵襲な手技として、患者の負担が少ない再建方法であるが、欠点として、移植床の状態により生着率に 20〜70%と大きなばらつきがあることがあげられる。これに対し、移植脂肪の生着率を高めるために高濃度の間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)を含む脂肪を作成する cell assisted lipotransfer (CAL)が行われている。CAL により移植脂肪の生着率が向上することが示されてきたが、CAL の欠点の 1 つとして、移植用の脂肪だけでなく、MSC の抽出用としてさらに移植脂肪と同量の脂肪の採取が必要となることが挙げられる。臨床応用を視野に入れた場合、乳房再建など多量の移植脂肪を必要とする場面では、十分量の脂肪の採取が困難であることが予想される。

MSC は、脂肪組織以外にも骨髄、臍帯、胎盤などから得られる。MSC は、脂肪、骨、軟骨などの間葉系細胞への分化能を持つほか、様々なサイトカイン、ケモカインのパラクラインにより、血管新生作用、線維化抑制作用、抗炎症・免疫調整作用、抗アポトーシス作用など多様な効果を持つ。これらの総合的な働きにより移植脂肪の生着率が向上すると考えられているが、これまでの報告では、特に増殖因子などの分泌による脂肪前駆細胞の成熟脂肪への分化の促進や血管新生の促進などが、移植脂肪生着向上効果の機序の中心と考えられてきた。

羊膜由来 MSC (amnion-derived MSC, AMSC)は、帝王切開時に廃棄される胎盤組織から採取した羊膜組織を酵素処理後、初代培養につづき継代培養を行うことで大量に入手可能である。脂肪由来 MSC を用いた脂肪移植の報告は多数あるが、AMSC を脂肪移植へ応用した報告は渉猟し得た限りなく、本研究では、AMSC による移植脂肪生着向上効果を検証し、脂肪移植への臨床応用の可能性を検討した。

第一章：羊膜由来間葉系幹細胞による移植脂肪生着向上効果の検証

【方法】C.B-17/IcrHsd-Prkdcscid マウス、および帝王切開時に得られる胎盤組織から採取したヒト AMSC、脂肪移植手術時に生じた余剰なヒト脂肪を用いてモデルを作成した。マウス背部左側に AMSC 混和脂肪を、右側に脂肪のみを注入し、移植後 2、4、8、12、16 週に残存脂肪の肉眼的所見、体積、質量を評価した。AMSC の混和量は脂肪 0.5g に対して 5.0×10^5 個および 5.0×10^6 個とし、各群 35 匹を作成した。

【結果】AMSC の添加による移植脂肪の肉眼的変化は認めなかった。残存する移植脂肪の体積・質量は経時的に減少するが、AMSC 添加群で有意に大きい結果となった。

【考察】本結果から、AMSC はこれまでの脂肪由来 MSC による報告と同様に、移植脂肪の生着向上作用を持つことが示唆された。

第二章：羊膜由来間葉系幹細胞による移植脂肪生着向上効果の機序の解明

【方法】第一章で作成したモデルを用いて、AMSC による移植脂肪生着向上効果の機序の

検討のため、移植脂肪内の組織学的検索および遺伝子発現の評価を行った。AMSC による線維化抑制効果の検討のため、Elastica-Masson 染色、α-SMA に対する免疫染色による組織学的評価、線維化に関連する遺伝子発現について評価した。移植脂肪内の血管新生について、CD31 に対する免疫染色による組織学的評価、各種増殖因子の遺伝子発現を評価した。抗炎症・免疫調整作用の検討として、ヒトおよびマウス炎症細胞に対する免疫染色を行った。移植脂肪に添加後の AMSC の動態を検討するため、CD105 に対する免疫染色および AMSC に対する PKH26 による蛍光染色での評価を行った。脂肪組織内のアポトーシスの評価のため、in situ apoptosis detection kit による TUNEL 染色での評価を行った。

【結果】移植脂肪内の膠原線維が占める面積および α-SMA 陽性面積は AMSC 添加群で有意に小さく、移植後 4 週における α-SMA、TGF-β、Collagen1 遺伝子の発現は有意に抑制された。MMP-2、TIMP-1 の遺伝子発現については明らかな傾向を認めなかった。血管新生について、CD31 陽性面積および各種増殖因子の遺伝子発現に関しては、AMSC の添加による増加傾向は認めなかった。AMSC による抗炎症・免疫調整作用、抗アポトーシス作用、移植脂肪内における AMSC の動態については明らかな傾向を認めなかった。

【考察】これまでの脂肪由来 MSC による移植脂肪の生着向上においては、移植脂肪内の血管増生が着目されていたが、AMSC による移植脂肪生着向上作用には血管増生ではなく、線維化抑制作用が関わっている可能性が示唆された。移植脂肪内の線維化の亢進により、生着率は低下することは知られているが、MSC による移植脂肪内の線維化抑制作用に関しては一定の見解は得られておらず、脂肪由来 MSC の添加により、生着率の向上および脂肪内の線維化抑制効果が得られたとする報告がある一方、逆に線維化抑制効果に乏しいとの報告もある。また、脂肪由来 MSC を含む間質血管細胞群の投与により、移植脂肪内の線維化は濃度依存性に亢進したとの報告もある。

一方、これまでに他疾患においては、AMSC およびその培養上清による、肝線維症モデルや内視鏡的粘膜下層剥離術後の狭窄における線維化抑制作用や、in vitro でのケロイド由来線維芽細胞に対する増殖抑制作用が示されていることから、AMSC は線維化抑制作用を持ち、脂肪移植モデルにおいてもその効果が発揮されたと予想される。

これまでの脂肪由来 MSC による血管増生の報告と異なり、本研究において、AMSC の添加は、移植脂肪の生着向上とともに、強い抗線維化作用を生じた要因の一つとして、MSC の由来の違いによる相違が考えられる。脂肪由来 MSC と比較して胎児付属物由来 MSC は、免疫調整因子の分泌能では優れるものの、各種増殖因子の分泌能では劣る可能性が示唆されている。また間質血管細胞群を使用した脂肪移植の場合、間質血管細胞群内の脂肪由来 MSC の含有率は 35%にとどまり、その他、血管内皮細胞・血管内皮前駆細胞、血管周皮細胞などの細胞群も多く含まれる。間質血管細胞群の添加による血管増生作用は、MSC 以外の細胞群による作用、もしくはそれらと MSC の相互作用により強く生じている可能性も否定できないと考えられる。

今後の課題としては、AMSC 添加脂肪移植の臨床応用を視野に、さらなる検討が望まれ

る。本研究では、AMSC の添加量を脂肪 0.5g あたり 5.0×10^5 個、5.0×10^6 個と設定したが、AMSC は医療廃棄物から侵襲なく大量に採取できるという大きな利点を持つことから、より大量の投与を含めた最適投与量の検討が必要と考える。また、AMSC の局所投与に伴う安全性の検証も必要である。通常、乳房再建における脂肪移植では乳癌の完全切除後、腫瘍の残存・再発がないことを十分確認した上で再建が行われるが、脂肪由来 MSC に乳癌細胞を添加して脂肪移植を行ったところ、癌細胞の増殖率が上昇したとの報告もあり、AMSC の局所投与における悪性腫瘍増殖効果の有無については、十分な検証が必要である。

【結論】第一章において、AMSC は移植脂肪の生着率を向上させることが示された。また、第二章において、AMSC による移植脂肪生着向上効果は、これまで脂肪由来 MSC で示唆されていた血管増生作用ではなく、線維化抑制作用に起因する可能性が考えられた。本研究により、AMSC を用いたより生着率の高い脂肪移植法開発の可能性が示唆された。