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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	伊藤, 梨里
Description	配架番号：2595
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14479号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81907
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Riri_Ito_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　伊藤　梨里

学 位 論 文 題 名

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）

【背景と目的】

脂肪移植術は侵襲が少なく、自家の組織で軟部組織の増量が期待できる有用な手技であるが、その生着率は母床の状態により 20～70%と大きなばらつきがある。生着率の向上のため、近年では移植用に採取した脂肪組織の一部から脂肪由来間葉系幹細胞を含む間質血管細胞群を抽出し移植脂肪に添加する手法が行われ、生着率が向上する結果が示されている。間葉系幹細胞は、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、抗アポトーシスな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いる。

間葉系幹細胞は、脂肪組織以外にも骨髄、臍帯、胎盤などから得られるが、当教室では消化器内科学教室と共同し、羊膜由来間葉系幹細胞（amnion-derived mesenchymal stem cell, AMSC）を用いて研究を行ってきた。脂肪由来間葉系幹細胞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かった。AMSC は医療廃棄物である胎盤からドナーの侵襲なく大量に採取が可能である。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。

【材料と方法】

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。

第一章において、AMSC とヒト脂肪を混和しマウス背部皮下に注入する脂肪移植モデルの確立のため、AMSC と脂肪の混和状態、およびマウス背部皮下において移植脂肪が注入される解剖学的位置を組織学的に検討した。また、本実験として、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。

第二章では、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】

第一章において、AMSC と脂肪は、シリンジを用いた用手的な手技で十分に混和され、移植脂肪はマウスの肉様膜と骨格筋の間に安定して注入されることがわかった。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。

第二章において、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】

第一章において、AMSC はこれまでの脂肪由来間葉系幹細胞による報告と同様に、移植脂肪生着向上作用を持つことが示唆された。その機序に関して第二章で検討を行ったところ、これまでの報告では、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線維化抑制作用が関わっている可能性が示唆された。間葉系幹細胞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、脂肪由来間葉系幹細胞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考えられる。

本研究で、移植脂肪内の血管増生を認めず、線維化抑制が有意に生じた理由としては、間葉系幹細胞の由来の差による相違が考えられる。脂肪由来間葉系幹細胞と比較して胎児付属物由来間葉系幹細胞は、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とされる。また、間質血管細胞群は脂肪組織からコラゲナーゼ処理により脂肪細胞を除去することで精製され、間葉系幹細胞の含有率は 35%程度にとどまり他の細胞群として血管内皮細胞やその前駆細胞が含まれる。間質血管細胞群に含まれる間葉系幹細胞以外の細胞群による作用、もしくはそれらと間葉系幹細胞の相互作用により血管増生が生じている可能性も考えられる。

【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。第二章において、AMSC による移植脂肪生着向上効果は、これまで脂肪由来間葉系幹細胞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。