



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
Author(s)	伊藤, 梨里; ITO, Riri
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14479
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96776
Type	doctoral thesis
File Information	Riri_Ito.pdf



学 位 論 文

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)

2 0 2 1 年 3 月

北 海 道 大 学

伊 藤 梨 里

Riri ITO

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
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	
緒言	8 頁
方法	9 頁
結果	15 頁
考察	20 頁
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	
緒言	22 頁
方法	23 頁
結果	29 頁
考察	42 頁
総括および結論	47 頁
謝辞	49 頁
利益相反	50 頁
引用文献	51 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Riri Ito, Shunsuke Ohnishi, Yuhei Yamamoto, Toshihiko Hayashi, Naoki Murao, Masayuki Osawa, Taku Maeda, Kosuke Ishikawa, Naoya Sakamoto, Emi Funayama
Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote the Survival of Fat Grafts by Preventing Fibrosis in Mice
Plastic and Reconstructive Surgery (2020 年投稿済)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 伊藤梨里、大西俊介、高橋周子、石川耕資、前田 拓、大澤昌之、林 利彦、舟山恵美、山本有平
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討
第 29 回日本形成外科学会基礎学術集会，2020 年 10 月 9 日・横浜
2. 伊藤梨里、大西俊介、高橋周子、佐藤千草、石川耕資、前田 拓、大澤昌之、林 利彦、舟山恵美、山本有平
羊膜由来間葉系幹細胞添加による移植脂肪生着向上効果の基礎的検討
第 20 回日本再生医療学会総会，2021 年 3 月 11 日・神戸（予定）

要旨

【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 (amniotic-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、Elastic-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

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

一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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ABC	avidin-biotinylated peroxidase complex
AMSC	amnion-derived mesenchymal stem cell
b-FGF	basic fibroblast growth factor
CAL	cell assisted lipotransfer
DAB	diaminobenzidine
E-M	Elastica-Masson
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HE	Hematoxylin and Eosin
HGF	hepatocyte growth factor
HLA	human leukocyte antigen
IL-10	interleukin-10
LCA	leucocyte common antigen
MHC	major histocompatibility complex
MEM	minimal essential medium
MMP-2	matrix metalloproteinase-2
MPO	myeloperoxidase
MSC	mesenchymal stem cell
PBS	phosphate buffered saline
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
α -SMA	α -smooth muscle actin
SVF	stromal vascular fraction
TBS	tris buffered saline
TGF- β	transforming growth factor- β
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase-1
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick-end labeling
VEGF	vascular endothelial growth factor

緒言

【背景】

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。適応となる疾患は軟部組織の増量を目的とする乳房の再建、外傷性や先天性の軟部組織の不足や陥凹変形、顔面などの加齢性変形や豊胸といった美容外科領域など多岐にわたる。人工物を用いずに自身の組織で軟部組織の増量が期待でき、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 (Parrish and Metzinger, 2010; Coleman, 1995)。

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 (Yoshimura et al., 2007)。これは移植用に採取した脂肪組織の一部に対しコラゲナーゼ処理を行い、脂肪由来 MSC を多く含む間質血管細胞群 (stromal vascular fraction, SVF) を抽出し、これを移植脂肪に添加する手法である。この SVF には脂肪由来 MSC のほか、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が含まれている。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 (Matsumoto et al., 2006)、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。

一方、MSC は脂肪組織だけでなく、骨髄、胎児由来の組織など様々なソースから採取可能である。MSC は体性幹細胞の 1 種であり、間葉系組織から、増殖能の高い接着細胞として分離され、脂肪、骨、軟骨への多分化能をもつ、CD73、CD90、CD105 陽性の細胞と定義される (Pittenger et al., 1999)。移植免疫に関わる human leukocyte antigen (HLA) -DR を含む major histocompatibility complex (MHC) Class II を発現していないこと、MSC 自体が免疫抑制作用を有することから免疫寛容能を持ち、同種他家移植が可能である (Le Blanc and Ringden et al., 2007)。

MSC は、様々な細胞への分化能を持つほか、各種増殖因子を含めたサイトカイン、ケモカインの分泌能力を持ち、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示す (Meirelles Lda et al., 2009)。これらの働きにより脂肪移植の際の移植脂肪の生着率が向上すると考えられているが、特に SVF による移植脂肪生着向上効果は、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増生の促進などが中心と考えられている (Rehman et al., 2004 ; Cai et al., 2007)。

申請者が着目した羊膜由来 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入手可能である。AMSC は胎児由来の若い細胞であるため、成体由来の幹細胞と比較し高い増殖能、パラクライン能力を持つ (Saulnier et al., 2016)。また一枚の胎盤からは約 20g の羊膜組織が採取でき、1g の羊膜組織から初代培養として約 2×10^6 個の AMSC が採取可能であることから、ドナーの侵襲なく大量に採取可能という大きな利点を持つ (Yamahara et al., 2014)。継代培養を行なう間に他の増殖能力の低い上皮細胞は淘汰されるため、純度が高いことも特徴である (Dominici et al., 2006)。

これまでに北海道大学消化器内科学教室では、AMSC の全身投与によるラットの急性重症腸炎 (Onishi et al., 2015)、放射線直腸炎 (Ono et al., 2015)、膵炎 (Kawakubo et al., 2016)、および肝線維症 (Kubo et al., 2015) の改善について報告した。これらの効果は、移植細胞から分泌された生理活性物質によると示唆された。さらに、AMSC を培養して得られた培養上清の投与により、ブタの内視鏡的粘膜下層剥離術後の食道および直腸の狭窄を抑制した (Mizushima et al., 2017; Tsuda et al., 2018)。一方、当教室では、AMSC 培養上清が *in vitro* でケロイド由来線維芽細胞の増殖、活性化を抑制することを確認した (Sato et al., 2018)。

本研究では、AMSC による移植脂肪の生着向上効果を評価するとともに、その機序について検討した。

【目的】

1. 羊膜由来間葉系幹細胞による移植脂肪生着向上効果を検証する
2. 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を解明する

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

1.1 緒言

1.1.1 背景

移植脂肪の生着率は、母床の環境、脂肪注入量や注入後の組織内圧、感染や術後出血など合併症の有無といった様々な要因に影響され、これは脂肪移植術における大きな課題のひとつである。これまで、移植脂肪の生着率の向上のために、脂肪の採取法や採取部位、移植脂肪の精製方法などについて様々な検討が行われてきたが(Sommer and Sattler, 2010)、近年では移植脂肪に様々な薬剤やサイトカイン、細胞を添加する試みとして、vascular endothelial growth factor (VEGF) (Topcu et al., 2012)、platelet-rich plasma や platelet-rich fibrin (Liu et al., 2020)、血管内皮前駆細胞(Hamed et al., 2012)、quality and quantity-cultured endothelial progenitor cells (Geeroms et al., 2019)などの添加により移植脂肪の生着率の向上が示されている。

その中でも特に着目されているのが、MSC である。2007 年に Yoshimura らにより脂肪由来 MSC を多く含む SVF を移植脂肪に添加する CAL により移植脂肪の生着率が向上することが示されて以来、脂肪由来 MSC や SVF を付加した脂肪移植に関して基礎研究・臨床研究ともに多くの研究が行われている。脂肪移植における MSC の使用報告は、そのほとんどが脂肪由来 MSC を用いた CAL によるものであり、これまでに基礎研究、臨床報告を含めて 150 以上の報告がある (Toyserkani et al., 2016)。しかしながら、脂肪由来以外の MSC を脂肪移植に用いた報告は、渉猟し得た限り骨髓由来 MSC を用いた 2 報告のみであり (Huang et al., 2017; Zhao et al., 2013)、AMSC を含む胎児付属物由来 MSC の使用報告はこれまでにない。

第一章では、ヒト脂肪およびヒト AMSC をマウス背部へ移植するモデルを用いて、AMSC の移植脂肪生着向上効果を検証した。

1.1.2 目的

マウス脂肪移植モデルにおける羊膜由来間葉系幹細胞による移植脂肪生着向上効果を検証する。

1.2 方法

1.2.1 動物実験計画

本研究は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年環境省告示第 88 号)、その他関係法令等に基づき、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」(平成 19 年 4 月 1 日)に従って、動物実験計画「脂肪移植マウスモデルに対する羊膜由来間葉系幹細胞の異種移植による脂肪生着率向上効果の検討」(承認番号 17-0114)の一研究として行った。

1.2.2 動物実験施設

本研究は、北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設にて行った。マウスの飼育は、3 階小動物飼育実験エリアの小動物飼育室にて 12 時間明暗サイクルの人工蛍光管理、固形飼料および自動給水用ノズルによる標準飲食管理下に行った。動物実験は、3 階解析実験エリアの共同生体試料解析室 2 にて行った。

1.2.3 使用動物・機器・試薬

雄の C.B-17/IcrHsd-Prkdcscid マウス(ブリーダー : Sankyo Labo Service Inc., Tokyo, Japan ; 販売 : Charles River Laboratories Japan Inc., Tokyo, Japan)を 6 週齢(18-22g)で購入した。馴化のため入舎後 2 週間の予備飼育期間を設け、8 週齢で実験に用いた。

全ての処置・手術は、実験動物麻酔装置(Laboratory Animal Anesthesia System; Shinano Manufacturing Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて、イソフルラン(Forane® Inhalant Liquid; AbbVie Inc., Tokyo, Japan) 2.5%吸入による全身麻酔下に行った。

1.2.4 AMSC の分離、培養

AMSC の使用に関しては、北海道大学大学院医学研究院・医学部医学科医の倫理委員会の承認を得て、「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」にしたがって実施した。胎盤の提供につき、採用されたすべての妊婦から書面による同意を得た。帝王切開時に得られる胎盤組織から羊膜を手取的に採取した(図 1)。コラゲナーゼ(Brightase C; Nippi, Tokyo, Japan)とディスパーゼ I (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)で処理を行い AMSC を分離後、10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)と 100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン(Wako Pure Chemical Industries)を加えた α -minimal essential medium (MEM) (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan)を用いて初代培養

を行った。培養環境は 37°C、95% air、5% CO₂ に設定した。3～4 日後に非接着細胞を除去し、接着細胞は 80% confluence に達するまで培養を継続した。0.5% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (Life Technologies) を用いて細胞継代を行い、3～5 継代後に Cell Banker (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて凍結保存した。

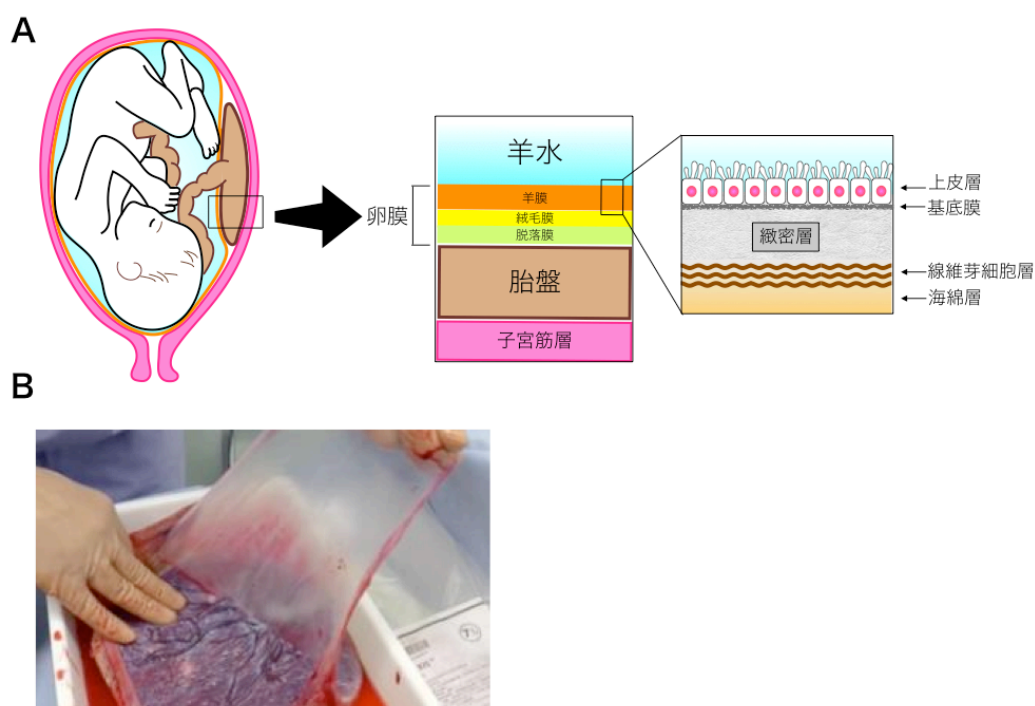


図 1. 羊膜の採取. (A) 妊娠中の子宮と胎盤の構造. (B) 羊膜の用手的剥離.

1.2.5 注入用脂肪の採取、調製

北海道大学病院自主臨床研究委員会の承認を得た実験計画「羊膜由来間葉系幹細胞による移植脂肪生着向上作用に対する検討」(承認番号 017-0357) を遵守し、注入用ヒト脂肪の採取を行なった。当院形成外科で脂肪移植術を施行する患者に同意を得て、脂肪移植術時に生じた余剰脂肪を採取した。コールマン法により患者の腹部、大腿部、臀部などから細分化された皮下脂肪を吸引採取し、700g、3 分間の遠心処理後、油滴成分、血液成分を除去し、中層の脂肪層のみを回収した (Coleman, 1995) (図 2)。

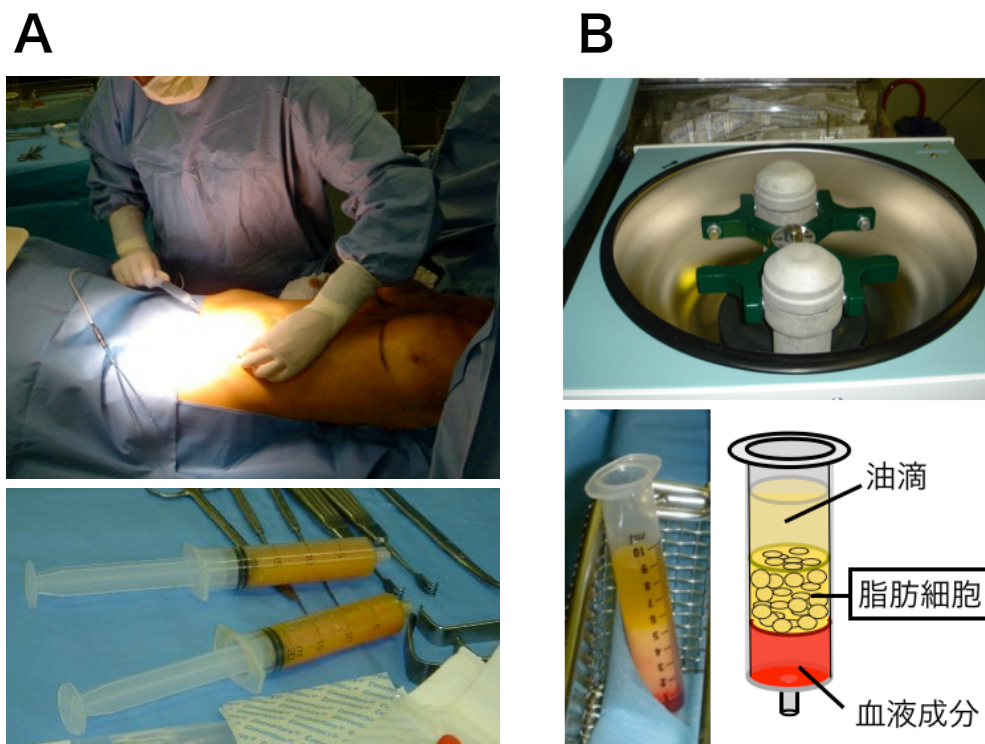


図 2. 移植脂肪の採取と遠心分離による調製. (A) 脂肪採取. (B)遠心分離.

1.2.5 パイロット実験

1.2.5.1 AMSC 混和脂肪の作成と混和状態の確認

1.2.3 により作成した AMSC を 37°C で解凍後、150 mm の培養 dish に播種し、10% FBS、100 U/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシンを加えた α -MEM で培養した(標準設定: 37°C、95% air、5% CO₂)。Subconfluent になった時点で 0.5% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid を用いて細胞継代を行い、6~8 継代の細胞を回収した。AMSC 5.0×10^5 個、 5.0×10^6 個を phosphate buffered saline (PBS; Life Technologies) 100µl に浮遊させ、1ml シリンジ (Terumo syringe, for tuberculin; Terumo, Tokyo, Japan) 内に採取した。1.2.4 により採取したヒト脂肪 0.5g を同シリンジ内に採取し、内筒を手動的に動かすことで混和を行った。Control 群では、AMSC を含まない PBS100µl のみを混和した(図 3)。

作成した脂肪塊を、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液(Wako Pure Chemical Industries)に浸漬して固定した。パラフィン包埋組織標本を切片厚 4 µm に薄切し、以下の手順で、anti-CD105 antibody (1:500; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA) を用いた免疫染色を行った。

キシレン、エタノールで脱パラフィン後、抗原賦活化液 pH9 (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan, dilution 1:10) を用いて 95°C 温浴処理を 20 分行った。常温で 20 分自然冷却後に水洗し、0.3% 過酸化水素水に 10 分浸した。トリス塩酸緩衝液 (tris buffered saline, TBS) で洗浄後、一次抗体 anti-CD105 antibody に室温で 30 分浸漬した。TBS で洗浄後、二次抗体 goat anti-rat secondary antibody conjugated with HRP (Histofine® Simple Stain™ MAX PO (Rat), Nichirei Biosciences Inc.) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、diaminobenzidine (DAB) 基質キット (Histofine® SAB-PO (M) Kit, Nichirei Biosciences Inc.) に浸して常温で 5 分発色した。

Tissue-Tek Carrazzi's Hematoxylin (Sakura Finetek Co., Ltd., Tokyo, Japan) に 7 分浸し、流水水洗を 10 分行った。1% 塩酸 70% エタノール、エタノール (70%) での分別を行い、エタノールでの脱水、キシレンでの透徹を行った。標本用封入剤 NEW M・X (Matsunami Glass Industry, Osaka, Japan) を用いて封入した。

組織スライドは、バーチャルスライドスキャナ (NanoZoomer S210; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を用いてスキャンした。デジタルデータは、画像閲覧ソフトウェア NanoZoomer Digital Pathology.view2 (Hamamatsu Photonics) を用いて観察した。

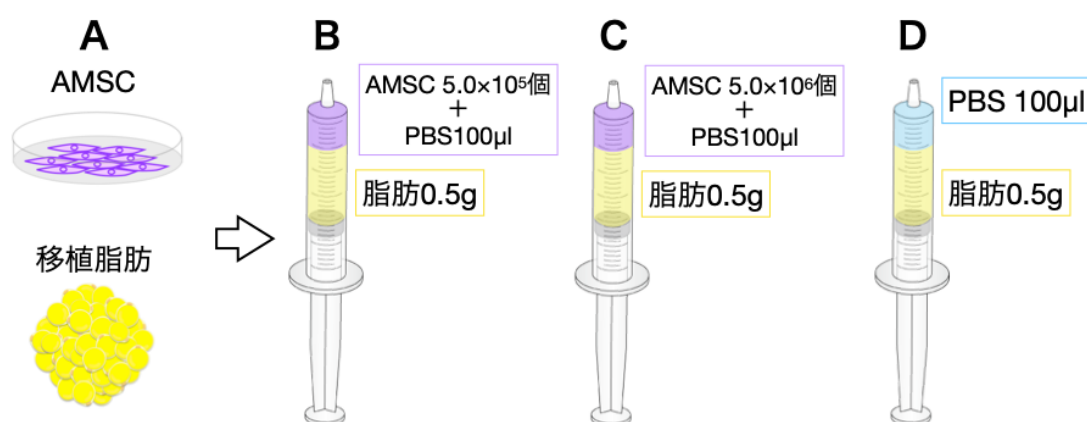


図 3. AMSC 混和脂肪の作成.

(A) 混和前のAMSCと脂肪. (B) AMSC 5.0×10^5 個添加脂肪. (C) AMSC 5.0×10^6 個添加脂肪. (D) Control.

1.2.5.2 モデル作成手技

1.2.5.1 により作成した AMSC 混和脂肪を、マウス背部皮下に注入することでモデルの作成を行なった。上記のシリンジに 18 ゲージ針 (Terumo syringe, for tuberculin; Terumo, Tokyo, Japan) を装着し、マウス背部皮下左側に注入した。背部右側には Control として、AMSC を混和しない脂肪 0.5g を同様に注入した (図 4)。

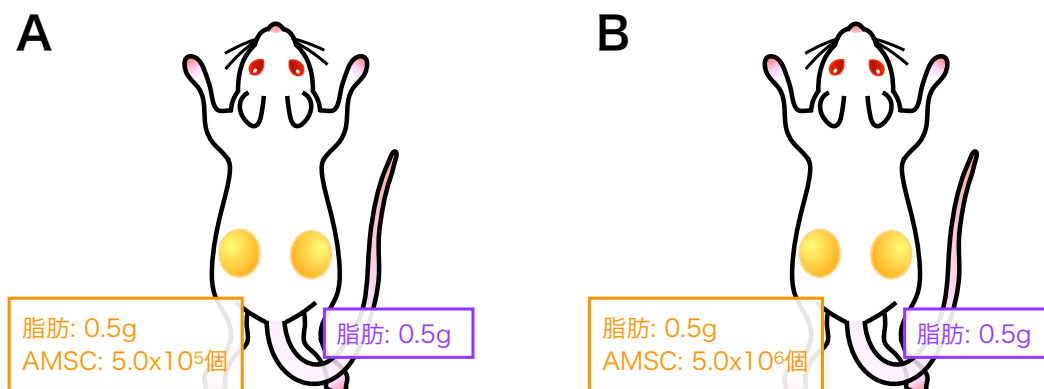


図 4. マウス背部皮下への移植脂肪の注入.

(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群.

1.2.5.3 注入脂肪部位の組織学的検討

マウス皮下への脂肪注入において、注入手技により部位のばらつきが生じないことを確認するため、移植後 2 週にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、マウス皮膚・皮下組織、移植脂肪を一塊に摘出した。パラフィン包埋を行い、以下の手順で Hematoxylin and Eosin (HE) 染色を行った ($n=3$)。

免疫染色と同様に脱パラフィン後、Carrazzi's Hematoxylin に 7 分浸し、流水水洗を 10 分行った。1%塩酸 70%エタノールで分別し、流水水洗後、1%エオシン Y 液 (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan) に 2 分浸漬した。水洗の後、エタノール (70%) での分別を行い、エタノールでの脱水、キシレンでの透徹を行った。標本用封入剤を用いて封入した。

1.2.6. 本実験

1.2.6.1 動物モデルの作成

1.2.5.2 に示した方法により作成したモデルを用いて、本実験を行なった。AMSC 5.0×10^5 個添加群、 5.0×10^6 個添加群をそれぞれ 35 匹作成し、移植後 2、4、8、12、16 週に各群 $n=7$ として評価を行なった (図 5)。

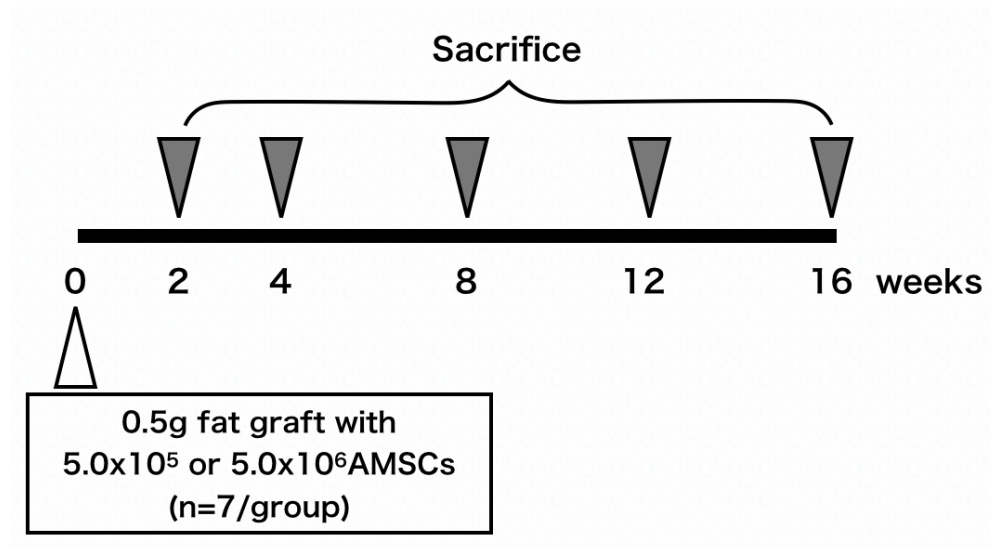


図 5. 実験プロトコール.

1.2.6.2 移植脂肪の摘出、体積、質量の測定

マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、背部正中を皮切し、皮下剥離の上、移植脂肪を傷つけないよう周囲組織から慎重に剥離し、摘出した。デジタル一眼レフカメラ (EOS Kiss X2; Canon Inc., Tokyo, Japan) を使用して、摘出した移植脂肪の写真を撮影した。摘出した移植脂肪に対し、マウス足容積測定装置 (Plethysmometer; Ugo Basile, Gemonio, Italy) を使用し、アルキメデスの原理を用いた水置換式体積測定を行なった。また、電子天秤 (GH-202; A&D Apollo, Tokyo, Japan) を用いて、質量を測定した。体積、質量ともに、各検体に対して 2 回測定を行い、その平均値を算出した。

1.2.6.3 統計学的検討

統計解析には、統計ソフトウェア JMP (version 14.1.0; SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。体積、質量は、平均±標準偏差で表した。2 群間の比較として、対応のある t 検定を用いた。両側 $p < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

1.3 結果

1.3.1 パイロット実験

1.3.1.1 AMSC 混和脂肪の作成と混和状態の確認

間葉系幹細胞マーカーである CD105 染色により、 5.0×10^5 個添加群、 5.0×10^6 個添加群ともに CD105 陽性細胞が比較的均一に点在していることが確認できた。

Control 群では CD105 陽性細胞はごく少数のみ確認できたが、これは元々移植脂肪内に含まれている脂肪由来 MSC と考えられた(図 6)。

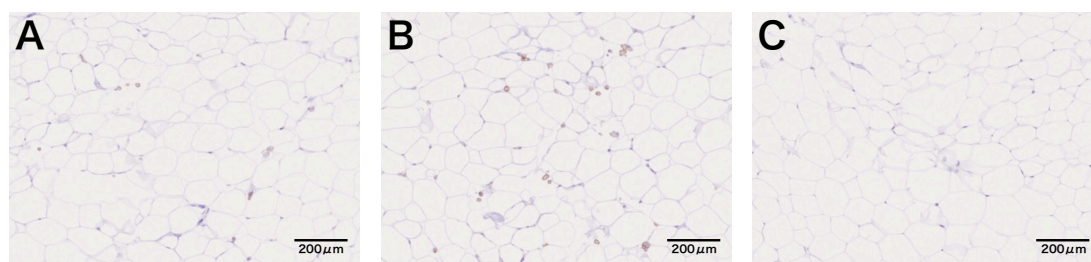


図 6. AMSC 混和脂肪の CD105 染色による評価.

(A) AMSC 5.0×10^5 個添加脂肪. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加脂肪. AMSC は脂肪内に比較的均一に混和された. (C) Control 群. 脂肪由来 MSC が観察された.

1.3.1.2 注入脂肪部位の組織学的検討

HE 染色での評価において、移植脂肪は、全例においてマウスの皮下脂肪および、肉様膜の下層、骨格筋の上層に注入されていた(図 7)。

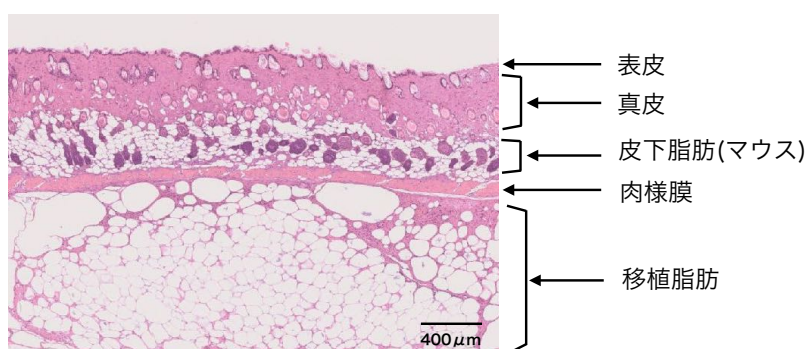


図 7. 注入脂肪部位の HE 染色による評価.

移植脂肪はマウス皮下脂肪および肉様膜の下層、骨格筋の上層に注入された.

脂肪が注入される解剖学的位置は注入の手技に影響されず、ほぼ一定であることが確認できた。またヒト脂肪は既存のマウス皮下脂肪と比較し脂肪滴が大きく、組織学的に区別が可能であることが確認できた。

1.3.2 本実験

1.3.2.1 モデル作製手技

全てのマウスが移植部位の感染などの合併症なく、安楽死させるまで生存した。

1.3.2.2 移植脂肪の摘出、体積、質量の測定

摘出した移植脂肪は、全例において薄い被膜に覆われており、周囲組織からの剥離は比較的容易であった。一部のモデルで、マウス鼠径部 fat pad と近接した部位に移植脂肪が注入されていたが、その場合でも移植脂肪は黄色～オレンジ色、マウス脂肪白色～淡黄色に観察され、肉眼的に区別可能であった。また、両者の剥離操作も可能であった。一部の移植脂肪では被膜内に毛細血管が透見された。毛細血管の程度について、AMSC 添加による差異は明らかではなかった。また、観察される移植脂肪の量も経時的に減少している印象であったが、AMSC 添加による差異は肉眼的には観察できなかった（図 8）。

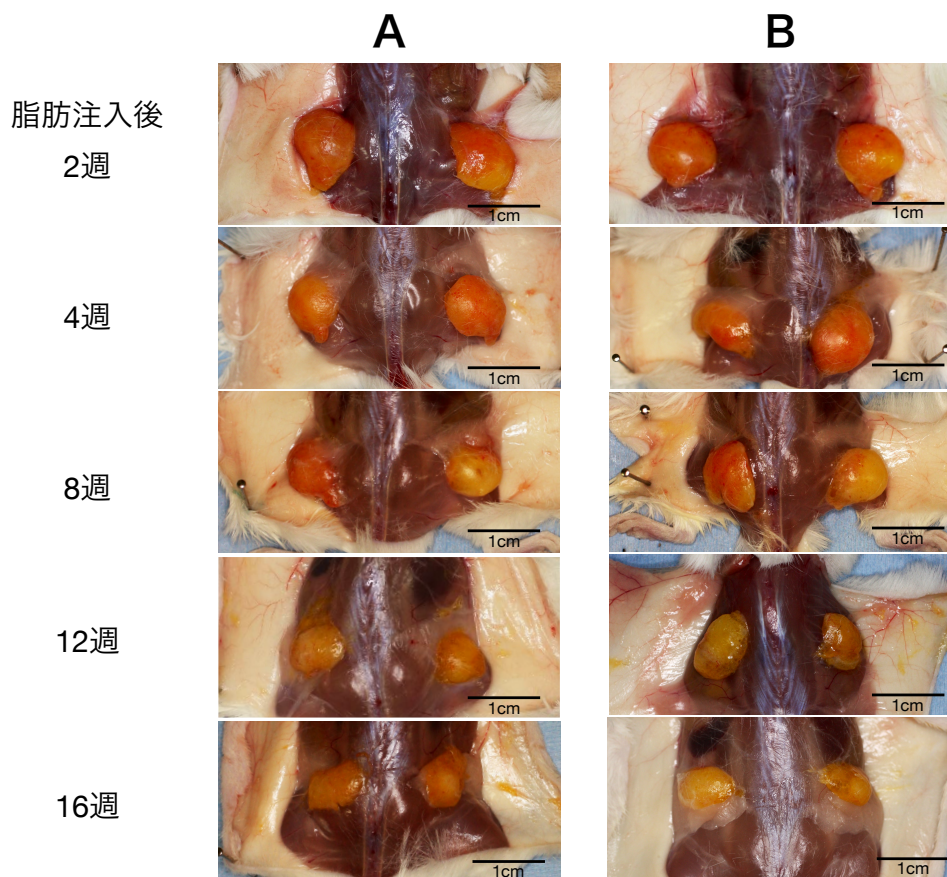


図 8. 移植脂肪の肉眼的所見.

(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群. 残存する移植脂肪の量は経時的に減少する. AMSC 添加による明らかな性状の変化は認めない.

移植脂肪の体積は経時的に減少を認めた。AMSC 5.0×10^5 個添加群、 5.0×10^6 個添加群ともに Control 群と比較して、残存する移植脂肪の体積が大きい傾向を認め、 5.0×10^5 個添加群の 12 週、 5.0×10^6 個添加群の 4、8、12 週では有意差を持って AMSC 添加群で体積が大きい結果となった ($p < 0.05$, 図 9)。

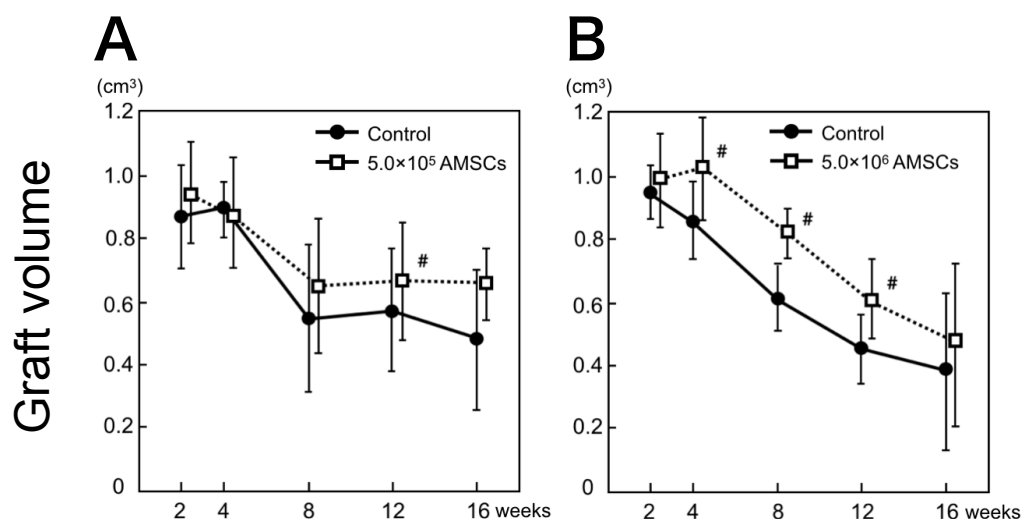


図 9. 移植脂肪の体積の経時的変化.

(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群. 残存する移植脂肪の体積は AMSC 添加群で有意に大きい ($n=7$, $\#p < 0.05$).

移植脂肪の質量についても経時的に減少を認めた。AMSC 5.0×10^5 個添加群、 5.0×10^6 個添加群ともに Control 群と比較して、残存する移植脂肪の質量が大きい傾向を認め、両群ともに 4 週、12 週では有意差を持って AMSC 添加群で質量が大きい結果となった ($p < 0.05$, 図 10)。

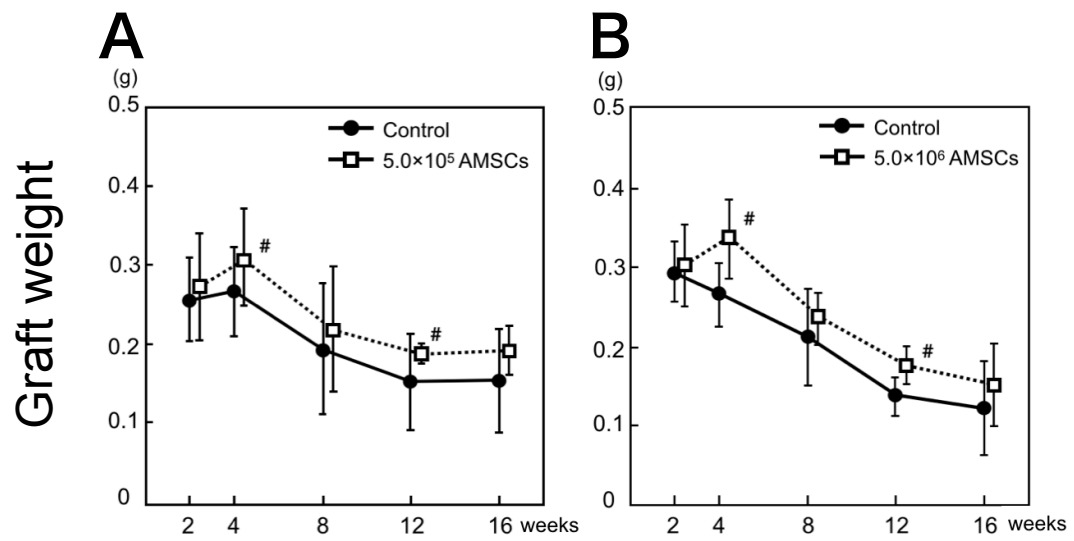


図 10. 移植脂肪の質量の経時的変化.

(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群.

残存する移植脂肪の質量は AMSC 添加群で有意に大きい($n=7$, $\#p<0.05$).

1.4 考察

1.4.1 モデル作成手技

脂肪移植における動物モデルを用いた基礎研究としては、マウス (Lei et al., 2019)、ラット (Kim et al., 2019)、ウサギ (Brucker et al., 2018) などの小動物から、ブタ (Jin et al., 2020)、イヌ (Kruschewsky et al., 2007) など大動物まで様々なモデルが使用されている。特殊部位における移植脂肪の生着を評価する必要はない場合は、安価で扱いやすく、抗体等の試薬も充実しているマウスを使用する報告が多い (Liu et al., 2020)。また、脂肪採取に関して、臨床の脂肪移植術の際は、腹部、大腿部、殿部など皮下脂肪が潤沢な部位から、吸引カニューレを用いて鈍的に細片化された脂肪を採取する。マウスは皮下脂肪がほぼ存在しないため、マウスからの脂肪採取は鼠径部の fat pad を使用するが (Matsumoto et al., 2006)、脂肪採取量が少量であること、脂肪塊を採取したのちに体外で細片化を行う処理が臨床での脂肪採取手技と大きく異なることから、脂肪移植術や脂肪吸引術時に余剰として生じたヒト脂肪検体を免疫不全マウスに移植する異種移植モデルを用いた報告が多い (Toyserkani et al., 2016)。また、その多くで、背部左右にそれぞれ脂肪注入を行い、比較検討を行うモデルが使用されている (Li et al., 2013)。本研究でもそれらに準じてモデル作成を行い、注入手技に左右されない安定した結果を得ることが可能であった。

1.4.2 移植脂肪の摘出、体積、質量の測定

CAL による脂肪移植における過去の報告では、摘出時の肉眼的所見として、CAL 群で脂肪塊表面に観察される血管が多く、赤色調に観察されたとの報告もあるが (Matsumoto et al., 2006)、本研究では、AMSC の添加による肉眼的所見の変化は認めなかった。AMSC による血管増生効果は CAL によるものと比較して劣る可能性も否定できず、今後の研究で、移植脂肪内の血管増生に関する病理組織学的評価、および血管増生以外の機序に対する検討が重要と考えた。

移植脂肪の体積、質量に関しては、AMSC の添加により生着率は有意に向上し、AMSC 5.0×10^5 個添加群、 5.0×10^6 個添加群ともにほぼ同様の傾向を認めていた。体積、質量ともに安定して有意差が得られた移植後 12 週では、AMSC 添加群で残存する移植脂肪の量は、Control 群と比較して約 1.3 倍であった。本研究と同様に免疫不全マウスの背部皮下に対して脂肪移植を行なった研究では、AMSC や SVF の添加により、残存する移植脂肪の量は 1.19~2.37 倍となったと報告されており (Xu et al., 2014, Zhu et al., 2013)、比較しても遜色ない結果が得られたと考えている。

臨床における脂肪移植においては、最終的な移植脂肪残存量が患者満足度に大きく影響することから、本研究では脂肪移植後の観察期間を最大 16 週と比較的長期に設

定した。その結果、移植後 12 週では両群で体積、質量ともに有意な結果が得られたが、移植後 16 週では AMSC 添加群で残存する脂肪量が多い傾向を認めるものの有意差を得ることができなかった。その理由として、時間経過とともに各個体間の残存脂肪量のばらつきが大きくなったことが考えられる。検討数を増やすべきと考えられたが、検体としてヒト脂肪を用いるという本研究の性質上困難であり、これについては本研究の限界として 1.4.3 で述べる。

移植脂肪に対する脂肪由来 MSC の添加量は、 1.0×10^4 個/ml $\sim 8.0 \times 10^7$ 個/ml と報告によって大きく異なる (Li et al., 2017; Zhu et al., 2010; Toyserkani et al., 2016)。また、移植脂肪に添加する脂肪由来 MSC の量に関して、 $1 \sim 8 \times 10^6$ 個/ml の範囲で検討を行ったところ、最高用量である 8×10^6 個/ml で移植脂肪の生着率が最も良好であったとの報告もある (Luo et al., 2013)。これらの背景を踏まえて、本研究では、添加する AMSC の量を脂肪 0.5g あたり 5.0×10^5 個および 5.0×10^6 個と設定した。注入時の移植脂肪は 1ml あたり約 0.9g であることから (Matsumoto et al., 2006)、これは約 9.0×10^5 個/ml、 9.0×10^6 個/ml に相当し、本研究の投与量は、既報の範囲内かつ有意な結果が期待できると思われた。脂肪由来 MSC と比較した AMSC の利点として、前述の通り、医療廃棄物である胎盤から大量に採取可能であることが挙げられる。この投与量で有意な結果が得られなかった場合、より大量の投与を行うモデルの作成を検討していたが、体積、質量において有意差が得られたため、これ以上の AMSC 投与量の検討は行わず、この 2 群を用いて第 2 章として移植脂肪生着向上効果の機序を検討することとした。

1.4.3 限界

一般的な脂肪移植においては、移植脂肪は採取、精製後、迅速に注入することが望ましく、凍結保存は細胞活性、生着率の低下を引き起こすとされる (Lidagoste et al., 2000)。近年では保存技術の上昇により、凍結保存を行なった移植脂肪でも生着率の低下を認めなかったとの報告もあるが (Ha et al., 2015)、新鮮脂肪と凍結脂肪を同様に扱うことが可能かは、いまだ議論が必要な部分である。これらを踏まえ、本研究では採取直後の脂肪を用いてモデル作成を行っている。しかし、本研究では当院形成外科で脂肪移植術を施行する患者に同意を得て、脂肪移植術時に生じた余剰脂肪を採取し使用しているため、モデル作成は脂肪移植の手術時に限られ、また手術内容によっては十分量の脂肪採取が困難な場合もあった。これらの理由で、最低限の検討数としたため、検体間のばらつきにより、移植後 16 週で有意差が得られなかったと考えている。

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

2.1 緒言

2.1.1 背景

MSC は直接的な分化・増殖能のみならず、様々なサイトカイン、ケモカインのパラクラインによる多岐な効果を持つ。それらは、血管新生や組織再生には促進的に働き、線維化、過剰な炎症、アポトーシスなどに対しては抑制的に働く (Yan et al., 2013)。例えば、MSC 自体が VEGF、basic fibroblast growth factor (b-FGF) などの各種増殖因子を分泌するのに加え、それらの増殖因子の存在下では MSC から CD31 陽性血管内皮細胞への分化誘導が生じ、この複合的な作用により、血管新生やそれに伴う組織再生に対して促進的に働くと考えられている (Hamou et al., 2009)。また、抗炎症・免疫調整作用として、T リンパ球、B リンパ球、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞など、幅広い免疫細胞に対して調節的效果を持つほか (Stagg, 2007)、interleukin-10 (IL-10)、hepatocyte growth factor (HGF) などの分泌により、線維芽細胞の活性化を抑制するとともに、細胞外マトリックスのリモデリングを活性化し、抗線維化作用をもたらす (Parekkadan et al., 2007)。また、stromal cell-derived factor 1、HGF、insulin-like growth factor 1 (IGF-1) などの分泌により抗アポトーシス効果を持ち (Sakaida et al., 2004)、これらの機序が複合的に作用して、種々の効果をもたらすと考えられている。

脂肪移植における MSC の作用としてもパラクライン効果に注目が集まっており、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促進や、血管新生の促進により、脂肪生着率を向上させるとの報告されている (Merrifield et al., 2018)。第一章において、AMSC が移植脂肪の生着率を向上させることが検証されたが、MSC のもつ分化・増殖能、血管新生作用、抗線維化作用、抗炎症・免疫調整作用、抗アポトーシス作用といった様々な効果のうち、どの作用によりもたらされるのか、第二章で検証を行う。

2.1.2 目的

第一章で立証された、AMSC の移植脂肪生着向上効果の機序について、移植脂肪内の病理組織学的検索、および遺伝子発現の評価により検証を行う。

2.2 方法

2.2.1 動物モデルの作成と検体の採取

1.2.6.1 で作成した AMSC 5.0×10^5 個添加群、 5.0×10^6 個添加群それぞれ 35 匹を用いて、2、4、8、12、16 週後に各群 $n=7$ として評価を行なった。1.2.6.2 により摘出した移植脂肪を用いて検討を行なった。

2.2.2 移植脂肪の病理組織学的検討

採取した脂肪塊を半割し、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液(Wako Pure Chemical Industries)に浸漬して固定した。パラフィン包埋を行い、1.2.5.3 と同様の手順で HE 染色を行った。また以下の手順で Elastica-Masson (E-M) 染色を行なった。

脱パラフィン後、前田変法レゾルシン・フクシン液(Muto Pure Chemicals Co., Ltd.)に 90 分浸し、100%エタノールで分別後、水洗した。1%酢酸水で洗浄し、0.75% オレンジ G 液(Muto Pure Chemicals Co., Ltd.)、マッソン染色液 B (Muto Pure Chemicals Co., Ltd)、2.5%リントングステン酸液(Wako Pure Chemical Industries)、アニリンブルー液(Wako Pure Chemical Industries)への浸漬を行い、脱水・透徹・封入した。

また、各種免疫染色を 1.2.5.1 と同様の手順で行なった。使用抗体およびそのプロトコールを表 1、表 2 に示す。Avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC) 法は、二次抗体 biotinylated rabbit anti-rat IgG secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, dilution 1:200) と検出試薬 VECTASTAIN® *Elite*® ABC Kit (Vector Laboratories) を用いた。ポリマー法は、二次抗体 goat anti-rat secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (Histofine® Simple Stain™ MAX PO (Rat)) もしくは goat anti-mouse secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (Histofine® Mouse Stain Kit, Nichirei Biosciences Inc.) を使用した。

組織スライドはスキャンの上、画像閲覧ソフトウェア NanoZoomer Digital Pathology.view2 を用いて観察した。E-M 染色および α -smooth muscle actin (α -SMA)、CD31、CD105 に対する免疫染色では、ランダムに選択された 20 視野(400 倍)の平均陽性面積を画像解析ソフト ImageJ により測定した。

また、*in situ* apoptosis detection kit (Takara Bio) を用い TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色によるアポトーシス細胞の染色により、移植脂肪内のアポトーシス評価を行なった。パラフィン包埋切片に対して、脱パラフィン、蒸留水で洗浄後、Proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany) を添加した。3% H_2O_2 水溶液

による内因性ペルオキシダーゼのブロッキング処理を行い、ラベリング反応液(TdT Enzyme および Labeling Safe Buffer)をスライド上にのせ、37°Cで90分反応させた。PBSで洗浄後、Anti-FITC HRP Conjugateを添加し、37°Cで30分反応させ、PBSで洗浄した。DAB・H₂O₂ 反応液を添加し室温で15分発色させた。3%メチルグリーン染色を施行後、アルコールでの脱水、キシレンでの透徹を行い、共焦点レーザ走査型顕微鏡 FluoView 1000-D 倒立型顕微鏡 IX81 仕様(Olympus Corporation, Tokyo, Japan)を用いて観察し、画像データ閲覧ソフトウェア FV10-ASW (version 03.01.02.02, Olympus)上で画像データを取得した。

表 1. 免疫染色での使用抗体

一次抗体	Clone	反応性	濃度	Catalog No	販売元
α-SMA	1A4	Mouse/Human	1:500	M0851	DAKO, Glostrup, Denmark
CD31	PECAM-1 (M20)	Mouse/Human	1:500	sc-1506-R	Santa Cruz Co, Santa Cruz, CA, USA
Cytoplasm	STEM121	Human	1:300	Y40410	Takara Bio
CD45/LCA	2B11 PD7/26	Human	1:500	145M-94-RUO	Novus Biologicals
CD3	SP7	Mouse/Human	1:100	ab16669	Abcam, Cambridge, UK
CD20	L26	Human	1:100	422742	Nichirei Biosciences
MPO	Polyclonal	Human	1:2000	A0398	DAKO
CD68	PG-M1	Human	1:100	M0876	DAKO
CD45/LCA	30-F11	Mouse	1:100	103101	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD105	Polyclonal	Human	1:300	NBP1-35471	Novus Biologicals

表 2. 免疫染色のプロトコール

一次抗体		抗原賦活化処理		検出系
α -SMA	室温 30 分	無処理		ポリマー法
CD31	室温 30 分	抗原賦活化液 pH9	95°C20 分	ポリマー法
Cytoplasm /STEM121	室温 60 分	抗原賦活化液 pH9	95°C20 分	ポリマー法
CD45/LCA (Human)	室温 60 分	抗原賦活化液 pH9	95°C20 分	ポリマー法
CD3	室温 60 分	抗原賦活化液 pH9	95°C20 分	ポリマー法
CD20	室温 30 分	抗原賦活化液 pH9	95°C20 分	ポリマー法
MPO	室温 60 分	抗原賦活化液 pH9	95°C20 分	ポリマー法
CD68	室温 20 分	抗原賦活化液 pH9	95°C20 分	ポリマー法
CD45/LCA (Mouse)	4°C一晩	抗原賦活化液 pH9	95°C20 分	ABC 法
CD105	室温 60 分	抗原賦活化液 pH9	95°C20 分	ポリマー法

2.2.3 AMSC の蛍光染色による組織学的評価（凍結切片）

AMSC の脂肪組織内でのトレースのため、PKH26 赤色蛍光細胞リンカーキット (PKH26GL; Sigma-aldrich, St. Louis, Missouri, USA) を用いて蛍光染色を行った AMSC を添加して脂肪移植モデルを作成し、摘出脂肪の凍結切片による組織標本の観察により、その動態を評価した。PKH26 は赤色の細胞膜標識用蛍光色素であり、溶出半減期は 100 日以上と、*in vivo* における長期間の細胞追跡に有用とされる。

1.2.5.1 と同様に継代培養した AMSC を回収し、PBS により洗浄した。希釈液 (Diluent C) を添加、懸濁後、希釈液と PKH26 色素エタノール溶液の混合液を添加し

た。37°C、95% air、5% CO₂ の条件下で5分インキュベートを行い、10% FBS、100 U/mL 添加 α -MEM での洗浄により反応を停止させた。トリパンブルー (Trypan Blue Stain; Life Technologies) 染色により、自動セルカウンター装置 (Countess™ automated cell counter, Countess™ Cell Counting Chamber Slides; Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Germany) を用いて細胞数および viability の測定を行い、手技により細胞の生存性が低下していないことを確認した。1.2.5.1、1.2.5.2 と同様に AMSC のヒト脂肪への混和、マウスモデル (5.0×10^5 個添加群および 5.0×10^6 個添加群、各群 n=3、計6匹) の作成を行い、移植後2、4、8週で、頸椎脱臼により安楽死させ、移植脂肪を摘出した。

摘出脂肪を凍結組織切片作製用包埋皿 (Tissue-Tek® Cryomold 1; Sakura Finetek Co., Ltd.) 内で凍結組織切片作製用包埋剤 (Tissue-Tek® O.C.T. Compound; Sakura Finetek Co., Ltd.) に包埋の上、液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結し、-80°C の超低温フリーザーに保存した。凍結切片作成装置 (Microm™ HM550 Cryostat; Thermo Fisher Scientific) を用いて、凍結組織標本を切片厚 40 μ m に薄切した。切片を共焦点レーザ走査型顕微鏡を用いて蛍光観察した。

2.2.4 移植脂肪の quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

【TotalRNA 抽出】

採取した脂肪塊を半割したものを、採取直後に RNAlater (Qiagen) 0.5ml に浸漬し、total RNA の抽出まで -80°C で保存した。解凍後の組織を PBS で洗浄し、Micro Smash MS-100 (TOMY, Tokyo, Japan) を使用して破碎した。組織をろ過後、スピнкаラム法にて total RNA を抽出した (QIA Shredder, RNeasy Mini Kit; Qiagen)。ゲノム DNA のコンタミネーションを防ぐ目的で DNase 処理を行った (RNase-Free DNase Set; Qiagen)。得られた RNA の濃度は分光光度計 (Nano Drop ND-1000; Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

【逆転写反応】

HighCapacityRNA-to-cDNAKit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用し、total RNA から逆転写反応により cDNA を作成した。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) による逆転写反応条件は、37°C・60分、95°C・5分 4°C・ ∞ に設定した。

【Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)】

初期熱変性 95°C・10分、熱変性 95°C・15秒、アニーリング/伸長反応 60°C・1分 $\times$ 40 サイクルのプロトコールで qPCR を行った。PCR 装置は StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用した。cDNA 5 μ l および Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 10 μ l を含む total 20 μ l のリア

クシオンミックスを用い、インターカレーション法により PCR 増幅産物生成量を測定し、 $\Delta\Delta CT$ 法により解析した。内在性コントロールとして glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。使用したプライマーを表 3 に示す。

表 3. プライマー配列 (Human)

Gene	Primer Sequence
GAPDH	
Forward	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
Reverse	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
Collagen I	
Forward	GGGATTCCCTGGACCTAAAG
Reverse	GGAACACCTCGCTCTCCA
α -SMA	
Forward	ATAGAACATGGCATCATCACCAAC
Reverse	GGGCAACACGAAGCTCATTGTA
TGF- β	
Forward	GGCTTTCGCCTTAGCGCCCA
Reverse	CTCGGCGGCCGGTAGTGAAC
MMP-2	
Forward	GTTCCCCTTCTTGTTCAATG
Reverse	CTTGCCATCCTTCTCAAAGT
TIMP-1	
Forward	CCAGCGTTATGAGATCAAGA
Reverse	AGTATCCGCAGACACTCTCC
EGF	
Forward	GGACAACAGTGCTTTGTAAATTGTG
Reverse	CCAGTGTGACTGTCTGCTTTAACC
b-FGF	
Forward	GTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATG
Reverse	CCAGTTCGTTTCAGTGCCACA
VEGFA	
Forward	TCACAGGTACAGGGATGAGGACAC
Reverse	CAAAGCACAGCAATGTCCTGAAG

2.2.4 統計学的解析

1.2.6.3 と同様に、統計解析には統計ソフトウェア JMP を使い、平均±標準偏差で表した。2 群間の比較として、対応のある t 検定を用いた。両側 $p < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

2.3 結果

2.3.1 移植脂肪内の線維化に対する AMSC の効果

摘出した移植脂肪組織の HE 染色により、病理組織学的検討を行った。経時的に脂肪滴成分が徐々に減少し、その他の細胞成分や細胞外基質が増加していたが、AMSC 添加群では脂肪滴の性状が比較的保たれている印象であった(図 11)。

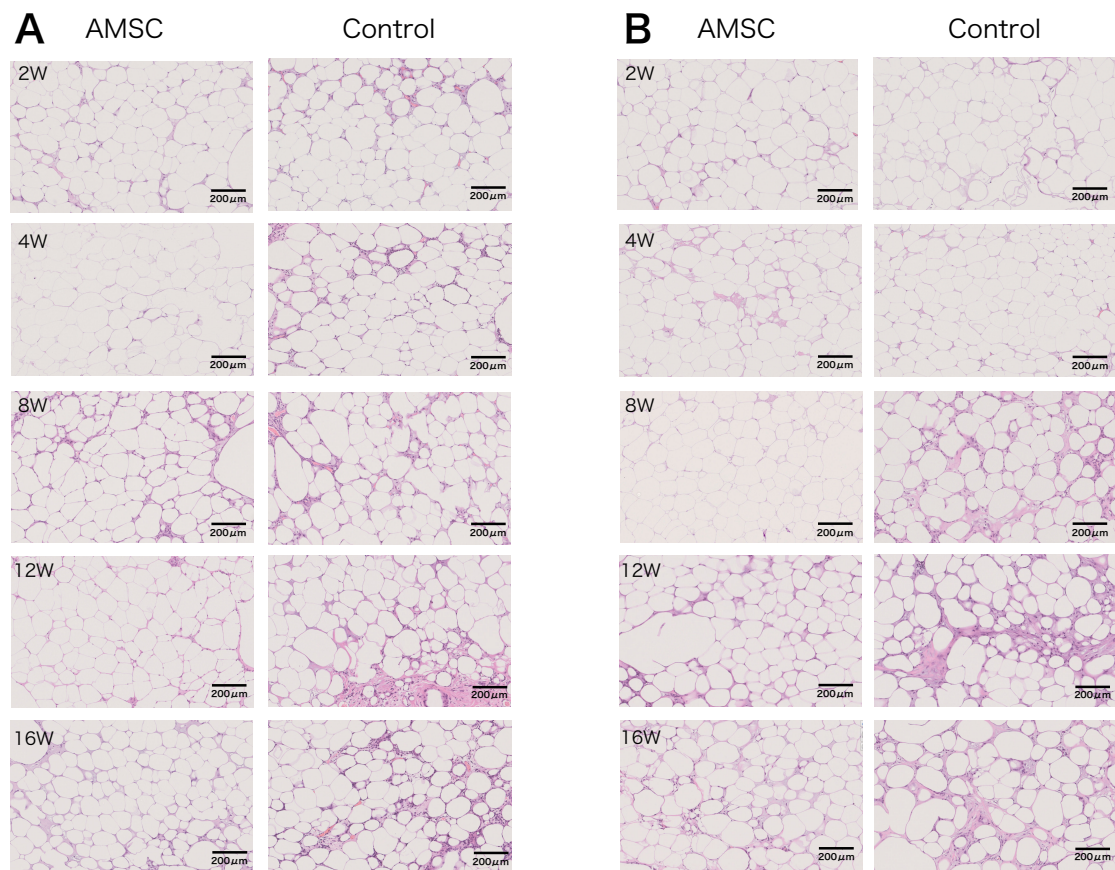


図 11. 移植脂肪の HE 染色による病理組織学的評価.

(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群.

AMSC が脂肪組織内の細胞外基質の産生を抑制し、線維化抑制に寄与している可能性が考えられたため、E-M 染色による移植脂肪内の線維化の評価を行った。青色に染色される膠原線維の占める面積は、AMSC 5.0×10^5 個添加群、 5.0×10^6 個添加群ともに、AMSC の添加により抑制される傾向を認めた。定量化を行ったところ、線維化は移植後 8 週以降増加傾向を認めたが、Control 群と比較し、AMSC 添加群で線維化が有意に抑制された(図 12)。

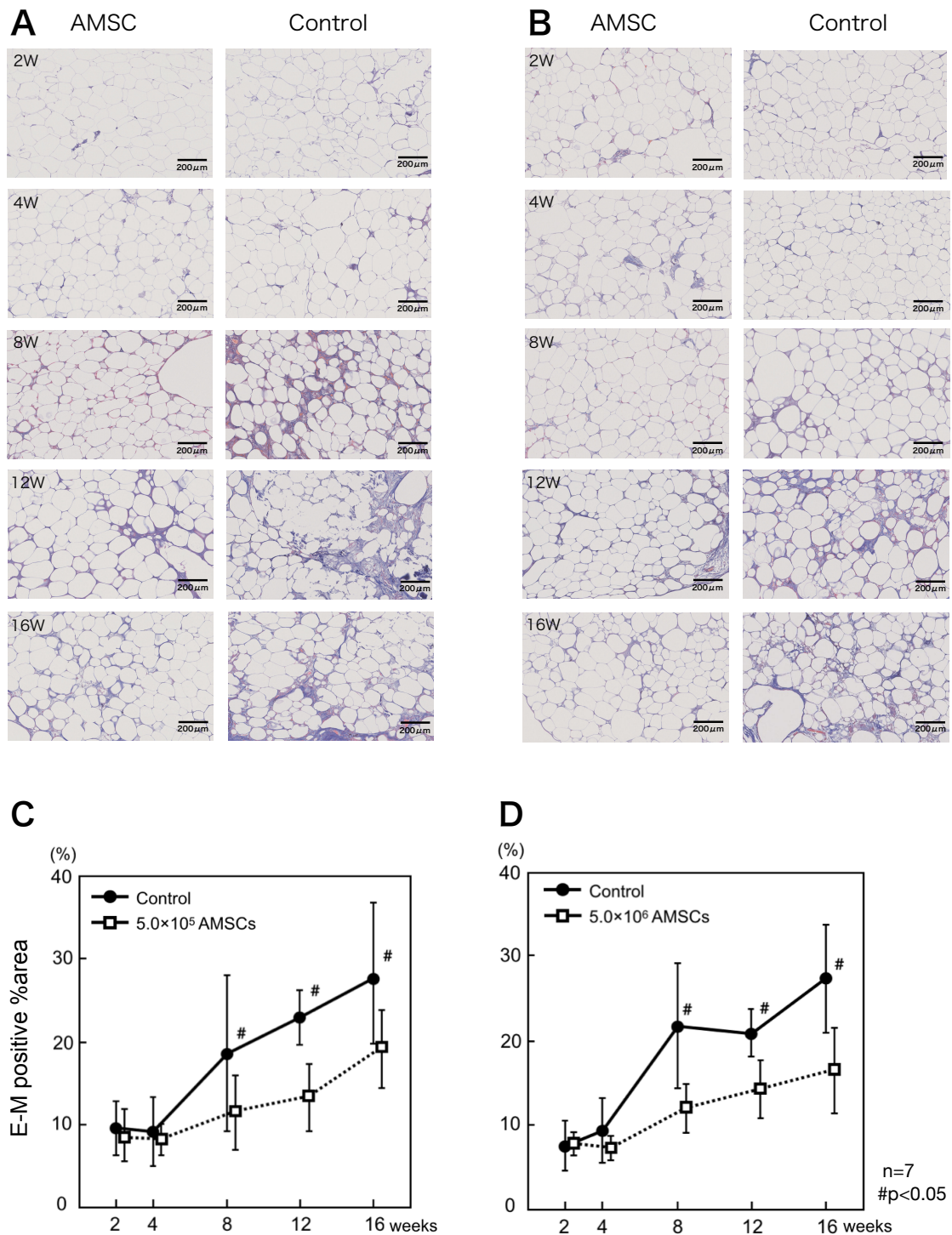


図 12. 移植脂肪の E-M 染色による病理組織学的評価.

(A) 組織学的所見. AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群. (C) Elastica-Masson 染色陽性面積. AMSC 5.0×10^5 個添加群. (D) AMSC 5.0×10^6 個添加群. AMSC の添加により膠原線維の占める面積は有意に減少した (n=7, #p<0.05).

筋線維芽細胞や血管周皮細胞のマーカーである α -SMA の免疫染色では、 α -SMA の発現は移植後 4～12 週にかけて徐々に増加し、16 週では減少する傾向を認めた。AMSC 添加により、移植後 4～12 週においては、 α -SMA の発現は抑制される傾向を認め、 5.0×10^5 個添加群の移植後 8 週では有意に抑制された (図 13)。

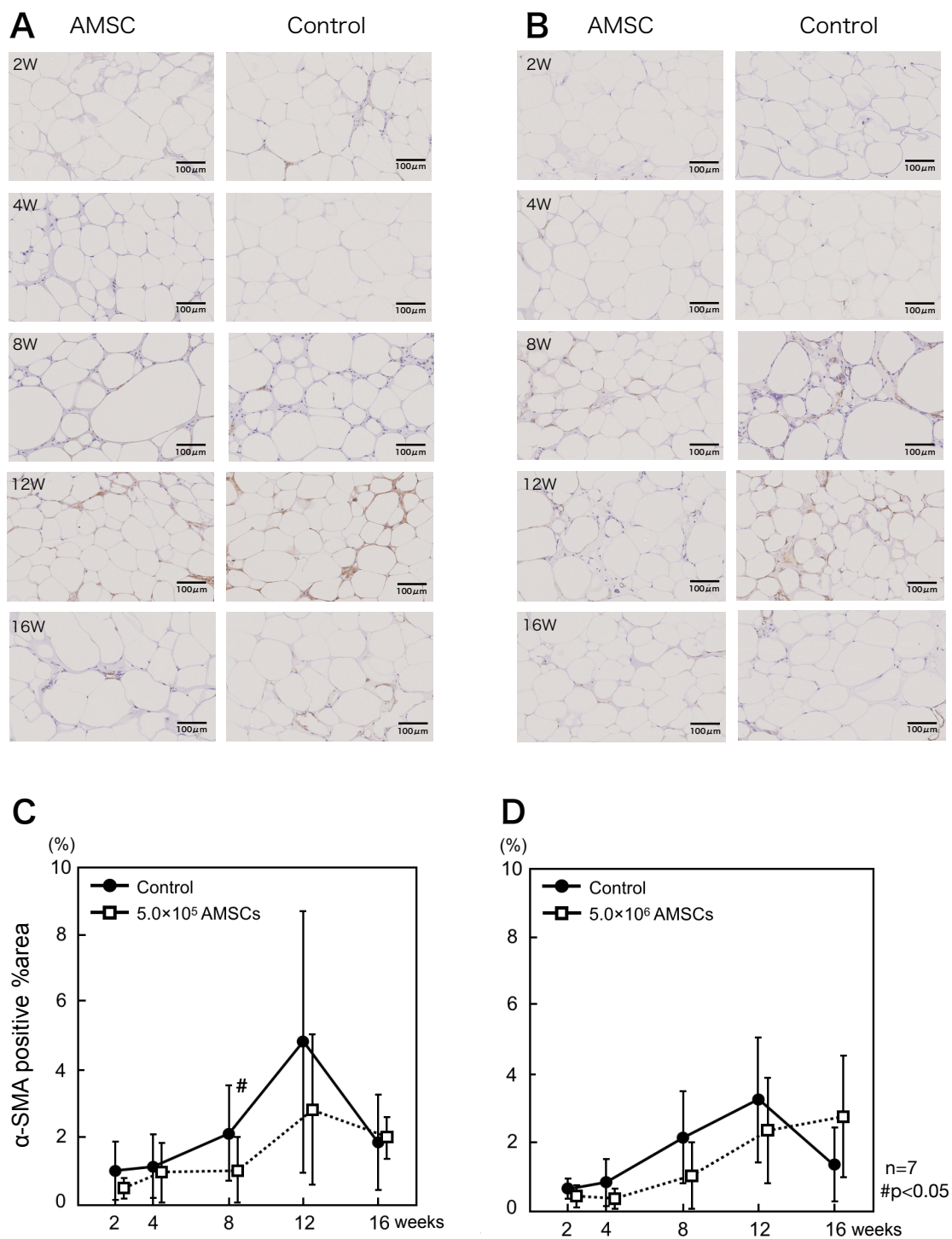
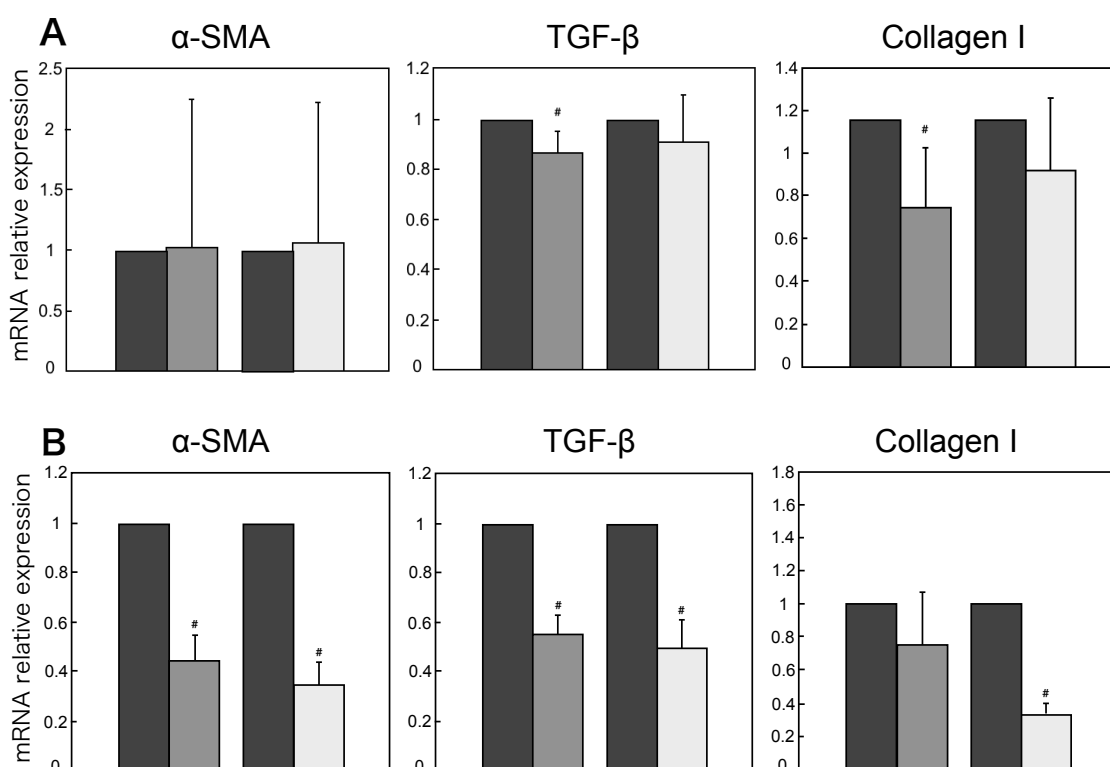


図 13. 移植脂肪の α -SMA 染色による病理組織学的評価.

(A) 組織学的所見. AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群. (C) α -SMA 染色陽性面積. AMSC 5.0×10^5 個添加群. (D) AMSC 5.0×10^6 個添加群. AMSC の添加により α -SMA 染色陽性細胞は有意に減少した ($n=7$, $\#p<0.05$).

また、移植脂肪内の線維化関連遺伝子の発現について、PCR による評価を行った。遺伝子発現の変化は、実際に組織内の線維化が抑制される移植後 8 週よりも早期に生じていると予想し、移植後 2 週および 4 週での評価を行なった。移植後 2 週において、transforming growth factor (TGF)- β 遺伝子および collagen1 遺伝子の発現は、AMSC 5.0×10^6 個添加群で有意に抑制された。 α -SMA 遺伝子の発現は明らかな傾向を示さなかった。移植後 4 週においては、 α -SMA、TGF- β の遺伝子発現は AMSC 5.0×10^5 個添加群、 5.0×10^6 個添加群ともに有意に抑制された。collagen1 遺伝子の発現も AMSC 5.0×10^6 個添加群では有意に抑制された。collagen の分解に働く matrix metalloproteinase (MMP)-2、抑制に働く tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 遺伝子の発現に関しては、AMSC の添加による明らかな傾向は認めなかった(図 14)。



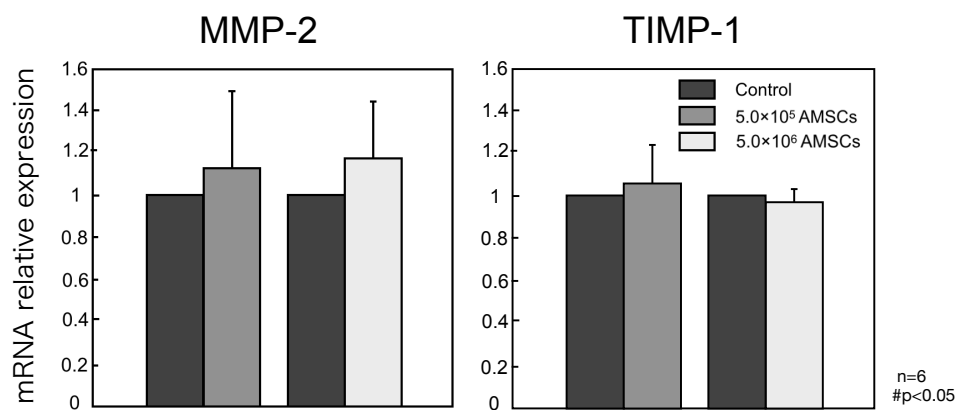


図 14. 移植脂肪内の線維化関連遺伝子の発現.

(A) 移植後 2 週. (B) 移植後 4 週. AMSC の添加により α -SMA、TGF- β 、Collagen1 遺伝子発現は有意に抑制された (n=6, # p <0.05)

2.3.2 移植脂肪内の血管増生に対する AMSC の効果

移植脂肪に、脂肪由来 MSC もしくは SVF を添加するこれまでの報告では、血管新生作用により移植脂肪内の血管増生が増加するとされているため、血管内皮細胞に対して CD31 による免疫染色を行なった。しかしながら、AMSC の添加により CD31 陽性面積は増加せず、明らかな血管増生促進効果は認めない結果となった(図 15)。

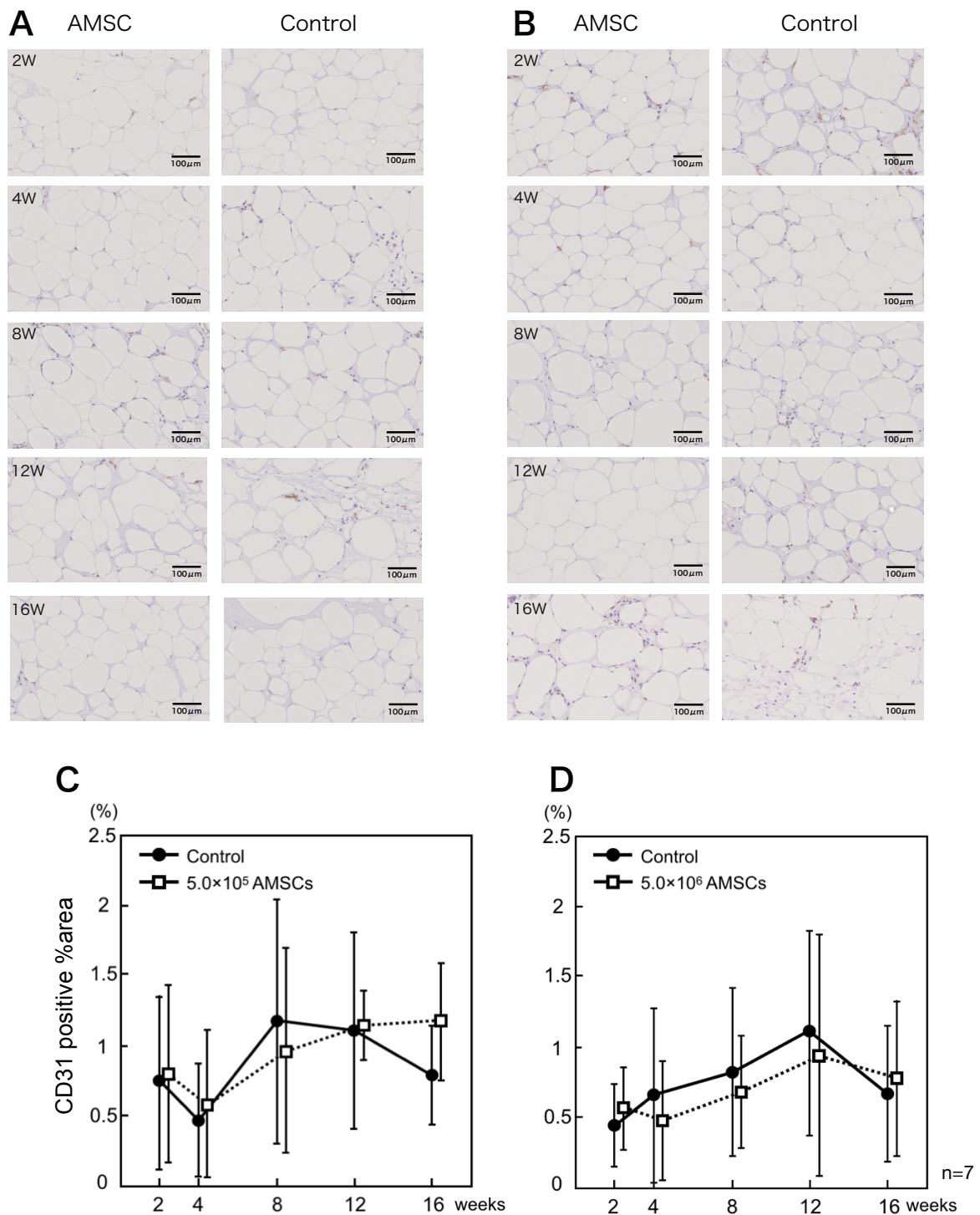


図 15. 移植脂肪の CD31 染色による病理組織学的評価.

(A) 組織学的所見. AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群. (C) CD31 染色陽性面積. AMSC 5.0×10^5 個添加群. (D) AMSC 5.0×10^6 個添加群. AMSC の添加による CD31 染色陽性細胞の増加は認めなかった (n=7).

また、血管新生に関連する遺伝子発現として、移植後2週の検体に対して EGF、b-FGF、VEGFA 遺伝子について PCR による評価を行なったが、明らかな傾向は認めなかった (図 16)。

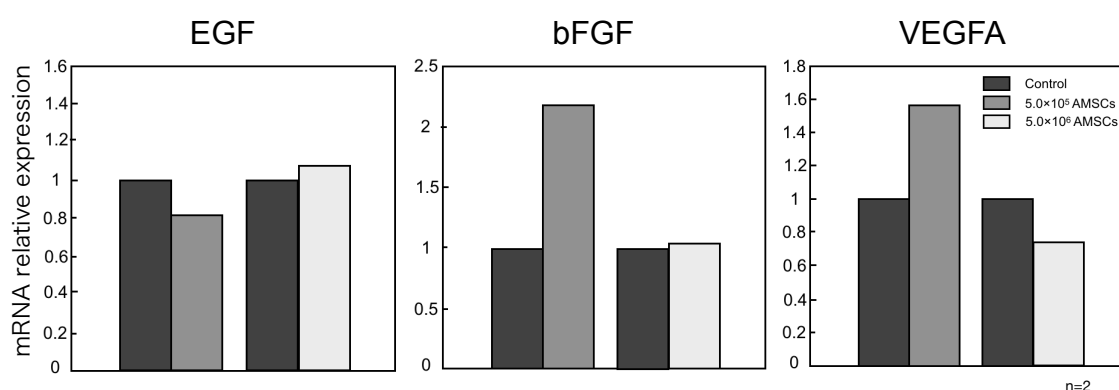


図 16. 移植後 2 週における移植脂肪内の血管新生関連遺伝子の発現. 明らかな傾向は認めない (n=2).

2.3.3 移植脂肪内の炎症に対する AMSC の効果

HE 染色での所見では、AMSC の添加により移植脂肪内の細胞外基質だけでなく細胞成分も減少している印象であった。移植脂肪内の線維化の抑制を認めたことから、これらの細胞成分には炎症細胞が含まれており、AMSC の抗炎症・免疫調整作用により、炎症細胞の浸潤が抑制されている可能性があると考えた。脂肪内に含まれる細胞群がどのような細胞で構成されているかを検討するために、ヒト細胞の細胞質を染色する Cytoplasm/STEM121 により免疫染色を行った。その結果、AMSC の添加の有無や評価の時期に関わらず、ヒト由来細胞およびマウス由来細胞が混在していた (図 17)。

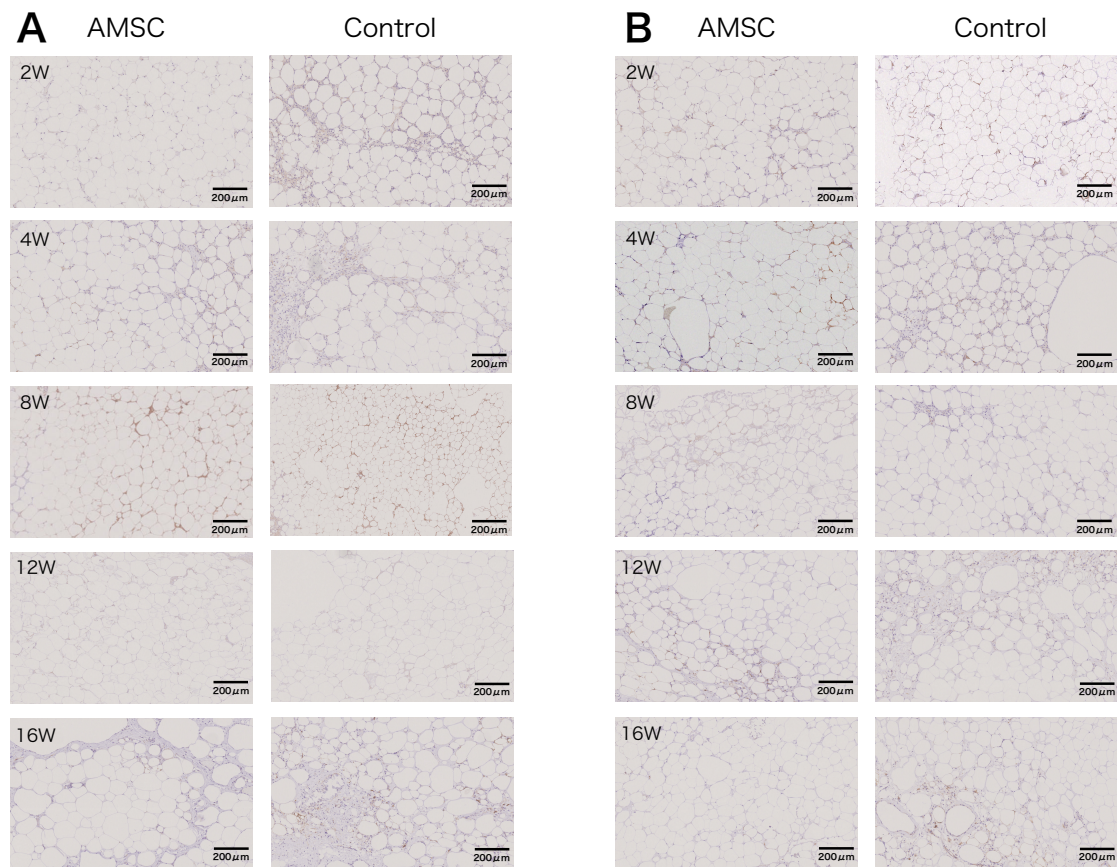


図 17. 移植脂肪の Cytoplasm/STEM121 染色による病理組織学的評価.

(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群. 脂肪滴間に認める細胞成分の中には陽性・陰性の細胞が混在しており、ヒト由来細胞、マウス由来細胞の両者が存在している.

その結果をふまえ、ヒト由来の各種炎症細胞について CD45/ leucocyte common antigen (LCA)、CD3、CD20、myeloperoxidase (MPO)、CD68 による免疫染色を行ったが、炎症細胞は AMSC 添加の有無に関わらずごく少数しか認めず、評価は困難であった(図 18)。

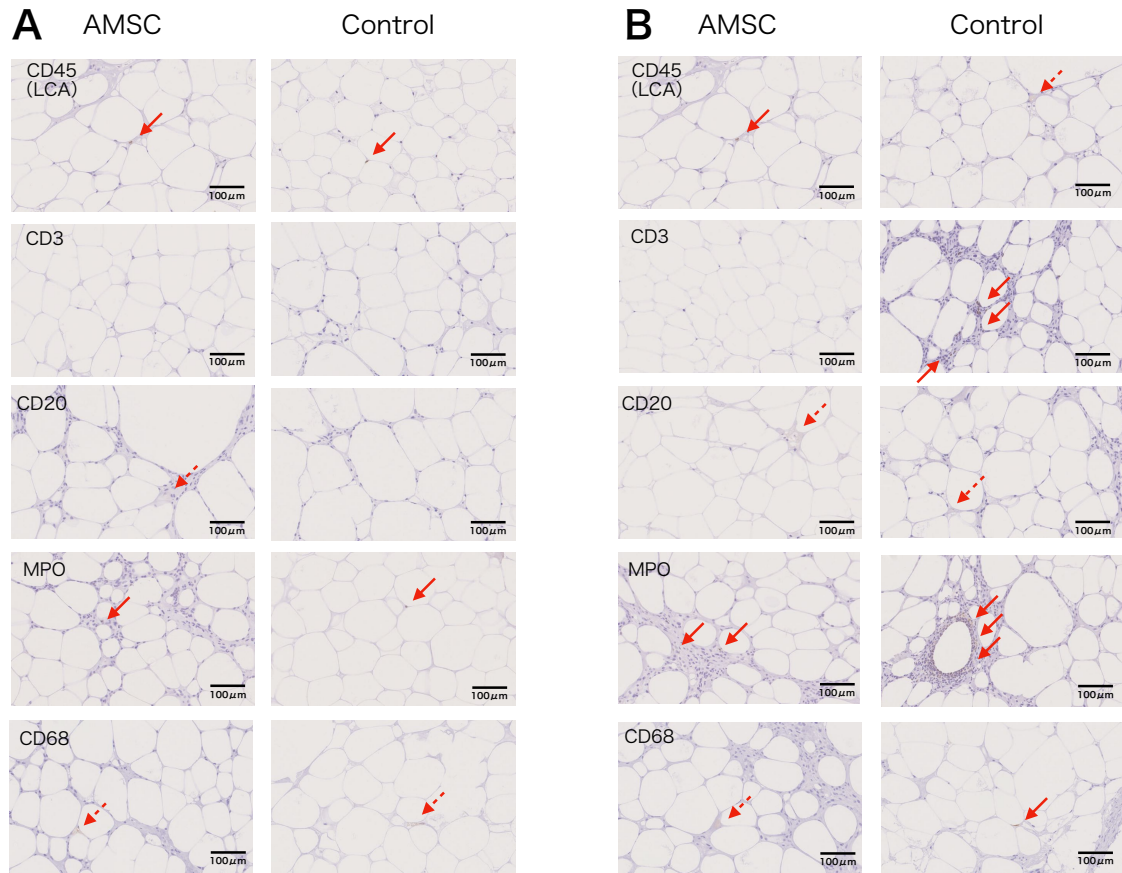


図 18. 移植脂肪のヒト由来炎症細胞に対する免疫染色による病理組織学的評価.
(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群. (実線矢印:濃染部、
点線矢印:淡染部). AMSC の添加の有無に関わらず、ヒト由来炎症細胞はごく
少数しか認めない.

マウス由来の炎症細胞についても CD45/LCA による免疫染色で評価を行ったが、
マウス炎症細胞の浸潤を認めるものの、AMSC 添加による明らかな抑制効果は認めず、
AMSC による抗炎症・免疫調整効果を示すことはできなかった(図 19)。

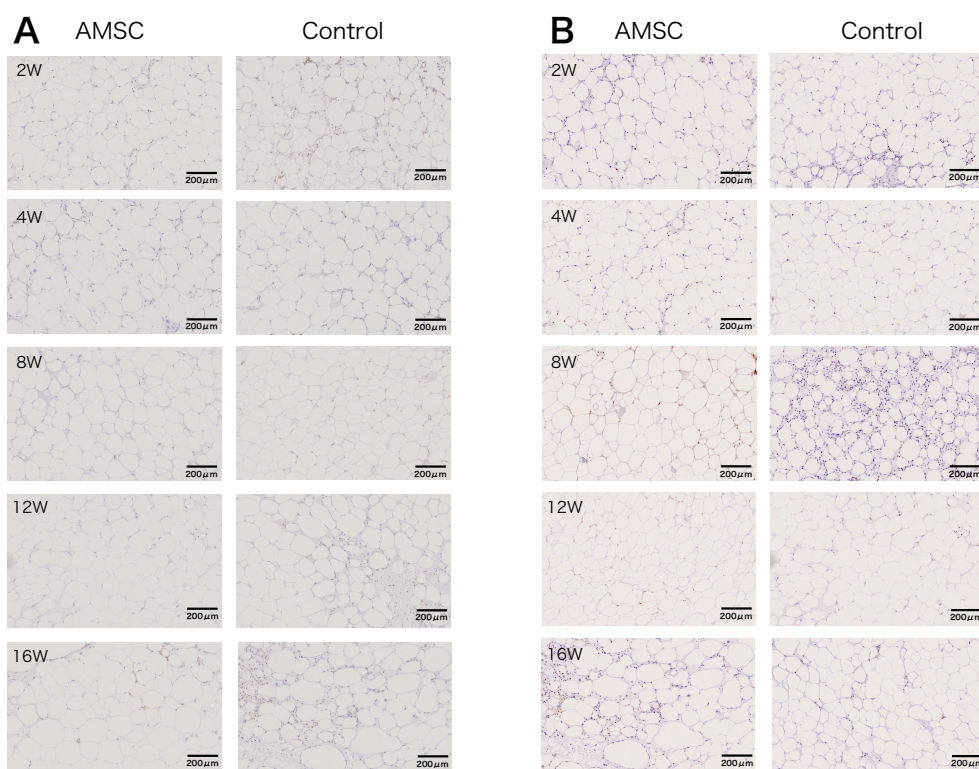


図 19. 移植脂肪の mouse CD45 染色による病理組織学的評価。

(A) AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群. マウス炎症細胞の浸潤を認めるが、AMSC の添加による明らかな抑制効果は認めない。

2.3.4 移植脂肪内の AMSC の動態

添加した AMSC が幹細胞の性質を残したまま生存しているのか、他の細胞への分化傾向を認めるのか検討するため、幹細胞マーカーである CD105 により免疫染色を行った。CD105 陽性細胞は AMSC 添加の有無に関わらず経時的に観察されたが、1.3.1.1 で行なった、脂肪組織と AMSC を混和した注入前の検体と比較すると、染色が非常に淡く、定量化が困難であった。ここで検出される MSC には添加した AMSC と、元来脂肪に含まれる脂肪由来 MSC が含まれるため、注入後早期には AMSC 添加群で CD105 陽性細胞が多く、他の細胞への分化などにより徐々に減少する結果が予想されたが、実際には各検体でのばらつきも大きく、明らかな傾向は認めなかった(図 20)。

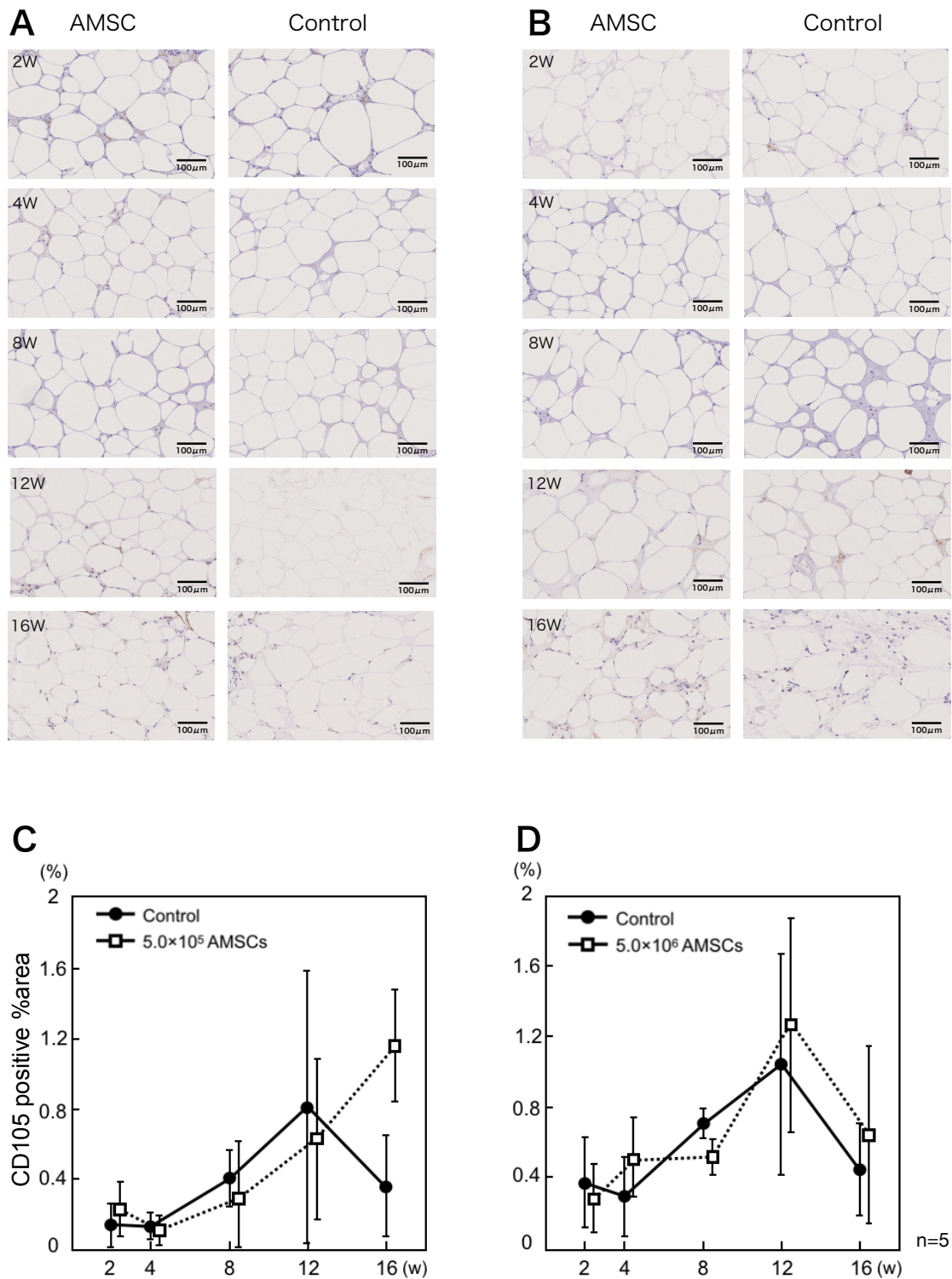


図 20. 移植脂肪の CD105 染色による病理組織学的評価.

(A) 組織学的所見. AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群. (C) CD105 染色陽性面積. AMSC 5.0×10^5 個添加群. (D) AMSC 5.0×10^6 個添加群. AMSC の添加による CD105 陽性細胞の増加は明らかではない(n=7).

また、PKH26 を用いた AMSC の蛍光染色により脂肪組織内での AMSC の動態を観察した。蛍光染色された AMSC と脂肪と混和した移植前の検体では、脂肪滴の間に蛍光を示す AMSC が粒状に確認された。移植後 2 週の検体では、AMSC 添加群では、赤色の蛍光が脂肪滴間に広がるように観察され、移植後 4 週の検体でも同様の傾向を認めた。移植後 8 週の検体では、凍結切片作成装置を用いて凍結組織標本を薄切する際に組織を破損したため、蛍光観察を行えなかった。また、作成した切片は非常に脆弱であり、HE 染色や免疫染色などの追加染色が困難であったため、凍結切片による PKH26 による蛍光観察は断念した(図 21)。

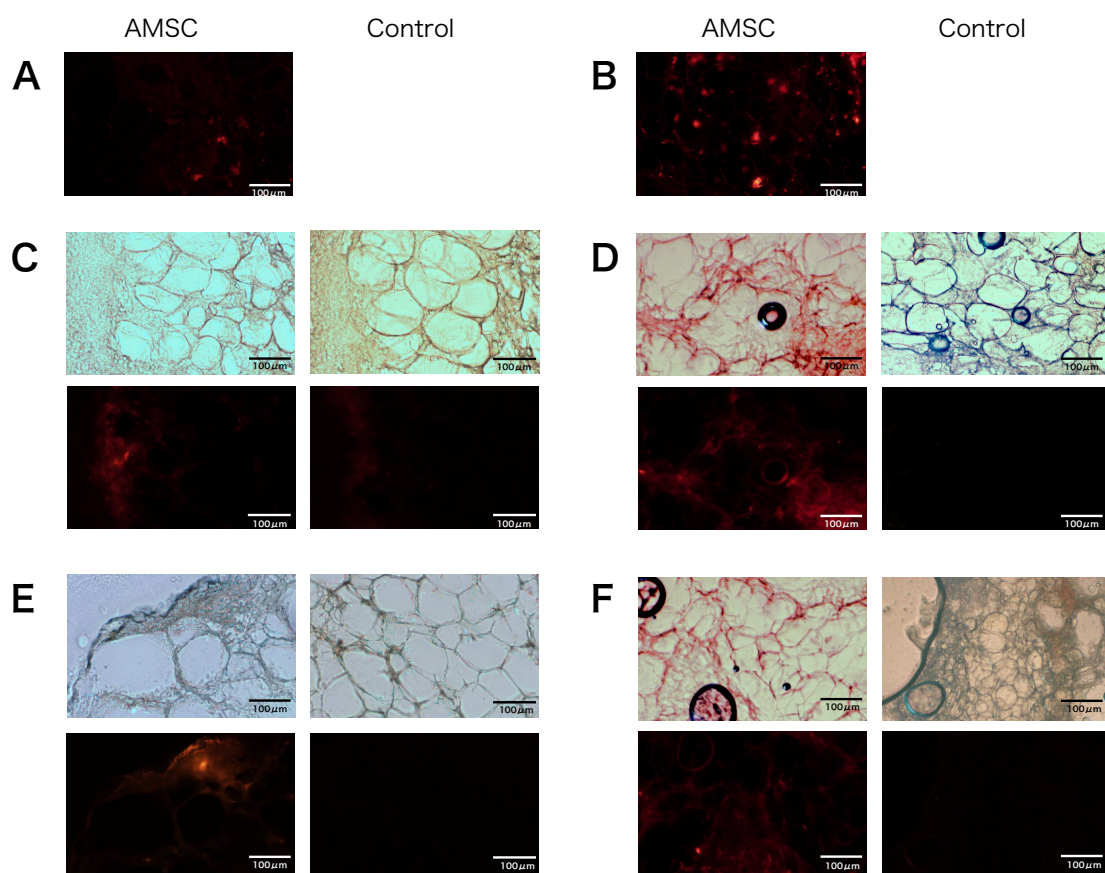


図 21. PKH26 蛍光染色による移植脂肪内の AMSC のトレース。

(A) 注入前の蛍光染色 AMSC 添加脂肪. AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) AMSC 5.0×10^6 個添加群. (C) 注入後 2 週の蛍光観察所見と同部位の通常観察所見. AMSC 5.0×10^5 個添加群. (D) 5.0×10^6 個添加群. (E) 注入後 4 週の蛍光観察所見と同部位の通常観察所見. AMSC 5.0×10^5 個添加群. (F) 5.0×10^6 個添加群.

2.3.3 移植脂肪内のアポトーシスに対する AMSC の効果

in situ apoptosis detection kit によるアポトーシス細胞の評価を行った。アポトーシス細胞は TUNEL および DAB 染色により茶色に、生細胞はメチル染色により緑色に染色される。注入後 2 週の組織標本に対して評価を行なったが、染色性が不十分であり、各染色細胞の定量的評価は困難であった。また、AMSC 添加群でアポトーシス細胞が多い印象であった(図 22)。

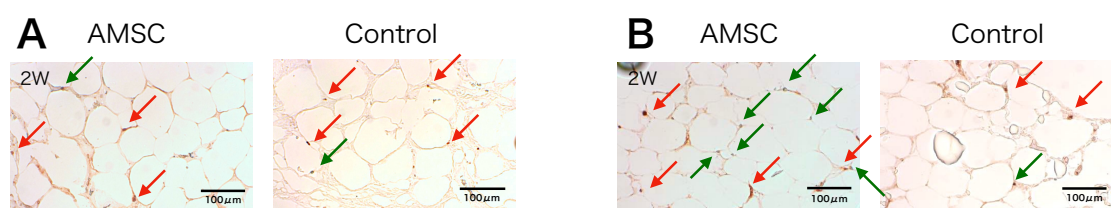


図 22. *in situ* apoptosis detection kit による移植脂肪内のアポトーシスの評価. (A) AMSC 5.0×10^5 個添加群. (B) 5.0×10^6 個添加群. (赤矢印: アポトーシス細胞、緑矢印: 生細胞). 各染色細胞の定量的評価は困難であったが、AMSC 添加群でアポトーシス細胞が多い印象であった.

2.4 考察

2.4.1 移植脂肪内の線維化に対する AMSC の効果

移植脂肪内の膠原線維が占める面積は、AMSC 5.0×10^5 個添加群、 5.0×10^6 個添加群ともに移植後 8 週以降では、有意に抑制された。 α -SMA は筋線維芽細胞や血管周皮細胞で陽性となるが、移植後 12 週までは脂肪細胞間に比較的びまん性に広がる染色パターンであることから、筋線維芽細胞が主に染色されていると考えられた。対して移植後 16 週では、一部内腔を伴う円筒形の染色パターンが多く観察されたことから、血管周皮細胞が主に染色されていることが予想された。AMSC 添加により、筋線維芽細胞が主に染色されていると思われる移植後 4~12 週においては、 α -SMA の発現は抑制される傾向を認めることから、AMSC の添加は線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を抑制し、過剰な線維化の抑制に寄与していると考えられる。

線維化に関連する遺伝子発現に関しては、特に移植後 4 週において Collagen1 遺伝子および Collagen の産生に関わる α -SMA、TGF- β の発現が有意に抑制されたが、Collagen 分解に関わる因子に関しては明らかな傾向は認めなかった。肝線維症における肝星細胞に対する MSC の効果として、MMP-2 を含む各種 MMP の発現増加、TIMP-1 の発現減少を認めたと報告されているが(Morikawa et al., 2009)、本研究では同様の傾向を示すことはできなかった。本実験系における AMSC による線維化抑制は Collagen 産生の低下によるものであり、Collagen 分解の亢進ではない可能性が考えられる。

これまでの脂肪由来 MSC もしくは SVF による報告では、移植脂肪生着向上効果の機序としては血管増生に着目したものが多く、線維化に関しては一定の見解は得られていない。脂肪由来 MSC、およびそれに VEGF を添加することで、移植脂肪の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もあるが(Lu et al., 2009)、逆に SVF は移植脂肪内の線維化の抑制効果に乏しいとの報告もある(Hong et al., 2017; Geeroms et al., 2019)。また、Kakudo らは $3.0 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^6$ 個/ml の SVF を添加して脂肪移植を行なったところ、移植脂肪内の線維化は濃度依存性に亢進し、 1.5×10^6 個/ml、 3.0×10^6 個/ml 投与群では SVF を付加しない Control 群よりも有意に線維化面積が大きかったと報告している。これは投与細胞数のみで比較すると、本研究の 5.0×10^6 個添加群のそれぞれ約 6 分の 1、3 分の 1 の量に相当し、本研究はより多量の投与にもかかわらず線維化抑制効果が得られている。

一方、これまでの他疾患における AMSC の基礎研究としては、線維化抑制に関する内容も多い。ブタの大腸、および食道内視鏡的粘膜下層剥離術後の癒痕に対する AMSC 培養上清の塗布により、狭窄が予防され、病理組織学的に線維化が抑制され(Mizushima et al., 2017; Tsuda et al., 2018)、薬剤誘発性ラット肝線維症モデルにつ

いても、AMSC による炎症、線維化抑制効果が示された (Kubo et al., 2018)。また、皮膚線維芽細胞においても、TGF- β 刺激により活性化されるケロイド由来線維芽細胞の増殖および α -SMA、Collagen1 遺伝子の発現を AMSC 培養上清が抑制した (Sato et al., 2018)。このように、AMSC は明らかな線維化抑制作用を持ち、本研究の脂肪移植モデルにおいても同様の効果が発揮されたと推測される。

2.4.2 移植脂肪内の血管増生に対する AMSC の効果

前述の通りこれまでの脂肪由来 MSC、SVF による移植脂肪生着向上効果は MSC の各種増殖因子のパラクリンによる、移植脂肪内の血管増生による効果が大いと考えられてきた。移植脂肪の生着のためには、血管新生による十分な血流の確保が重要であり、血流不足は脂肪壊死を引き起こし生着率の低下につながると報告されている (Khouri et al., 2014)。

Toyserkani らの報告によると、これまでの脂肪由来 MSC、SVF による脂肪移植における動物モデルを用いた基礎研究において、約半数で脂肪組織内の血管新生が認められ (Toyserkani et al., 2016)、本研究と同様に CD31 染色での免疫染色により移植脂肪内の血管数を評価し、有意な血管増生を認めたとする報告もある (Lu et al., 2009)。しかしながら本研究においては AMSC の添加による移植脂肪内の明らかな血管増生は認めず、AMSC の移植脂肪生着向上効果の主体は抗線維化を含むその他の作用によるものと考えられた。

この要因の1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 (Jin et al., 2013; Dabrowski et al., 2017)。また、SVF は脂肪組織から脂肪滴を多く含む脂肪細胞をコラゲラーゼ処理などにより除去することで精製されるため、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含む (Suga et al., 2008)。SVF による血管増生作用は、SVF に含まれる MSC 以外の細胞群による作用、もしくはそれらと MSC の相互作用により生じている可能性も否定できない。

2.4.3 移植脂肪内の炎症に対する AMSC の効果

2.4.1 で示した通り、本研究では、AMSC の移植脂肪生着向上効果の機序として、移植脂肪内の線維化抑制が示唆された。線維化と炎症は密接な関わりを持ち (Mack, 2008)、AMSC は、他疾患でのこれまでの検討においても抗炎症・免疫調整作用を持つことが示されており (Kubo et al., 2015; Ono et al., 2015)、移植脂肪内の炎症・免疫についても評価すべきであると考えた。

本モデルはマウスにヒトAMSCを含むヒト脂肪を移植したxenograftのモデルである。移植脂肪内に存在する脂肪細胞以外の細胞には、各種炎症細胞や線維芽細胞が含まれるが、それらは、脂肪に混入して移植されたヒト由来の細胞と、移植脂肪内に遊走したマウス由来の細胞が混在していることが予想された。まずこれらを区別するため、ヒト細胞の細胞質に特異的に染色される Cytoplasm/STEM121 ヒト細胞質抗体による免疫染色によってマウス由来、ヒト由来細胞の混在を確認した。これをふまえ、移植脂肪内の炎症細胞の評価として、マウス由来、ヒト由来の両者を評価すべきと考えたが、ヒト由来炎症細胞はごく少数しか確認されなかった。脂肪組織内の炎症細胞のほとんどはマウス由来と考えられたが、マウス由来炎症細胞は免疫染色により観察されるものの、AMSCの添加により明らかな傾向は認めなかった。

この要因として、本研究は免疫不全である C.B-17/1crHsd-Prkdcscid マウスを用いていることが挙げられる。本マウスは胸腺機能の欠落のため機能的な B 細胞、T 細胞が欠如していることから (McCune, 1991)、脂肪移植における本来の免疫反応を再現できていない可能性が高い。このため、AMSC の脂肪移植内の炎症調整作用について評価するためには、免疫不全でないモデルを用いた同種脂肪移植モデルでの評価が必要と考えられた。

2.4.4 移植脂肪内の AMSC の動態

MSC による生着向上効果は各種サイトカインのパラクライン作用によるとする報告が多いが、MSC は脂肪、骨、軟骨など間葉系幹細胞への分化能を持ち (Le Blanc and Ringden et al., 2007)、移植脂肪内で直接的に脂肪細胞や血管内皮細胞へ分化し、移植脂肪の生着率を高めるという報告もある (Moseley et al., 2019; Miranville et al., 2004)。

移植脂肪に添加後の AMSC の動態について、その MSC としての特徴を保持したまま残存しているのか、他の細胞への分化傾向を認めるのかを検証するため、CD105 免疫染色によって評価を行ったが、非常に淡い染色状態であり、検体間のばらつきも大きく、定量化には不適であった。そのため、AMSC の動態を確認する他の方法として報告されている PKH26 蛍光染色による AMSC のトレースを行った (Ling et al., 2019)。これにより AMSC の残存を確認することができたが、この染色された MSC が他の細胞への分化傾向を示すのか、AMSC として残存し、パラクライン効果により移植脂肪制作向上効果を示すのかを解明するためには、対比染色が必要となる。また、PKH26 は細胞膜に対する蛍光染色であることから死細胞やそれがマクロファージに貪食された場合も蛍光を発する場合があるため (Wang et al., 2019)、それらを除外するためにも対比染色による評価が必要と考える。

2.4.5 移植脂肪内のアポトーシスに対する AMSC の効果

MSC の持つパラクライン作用の 1 つとして、アポトーシス抑制作用があり、(Yin et al., 2019; Parekkadan et al., 2007)、これは、VEGF、HGF、TGF- β 、b-FGF などの分泌によるとされている (Carrion and Figueroa et al., 2011)。脂肪内のアポトーシスの評価として、既報に準じて (Oashi et al., 2012)、移植脂肪内のアポトーシス細胞数の評価を行なったが、各染色細胞の定量的評価は困難であり、AMSC 添加群でアポトーシス細胞が多い印象であった。これは、AMSC 添加群とコントロール群で、存在する細胞数に相違があり、AMSC 添加群では添加した AMSC の一部がアポトーシスを起こしている可能性が考えられる。これらの正確な評価については、対比染色によりアポトーシス細胞の細胞種を同定することが必要と考えられる。

2.4.6 限界

本研究には次に述べる限界がある。第一に検体数が少ないことが挙げられる。1.4.3 で述べた通り、脂肪移植術時に生じた余剰脂肪を使用しているため、モデル作成は脂肪移植の手術時に限られることから、n は最小限に設定している。また、PKH26 による蛍光染色での評価など、モデル作成時に介入が必要な評価においては十分な検討ができなかった。

第二に、本モデルが免疫不全マウスを用いた異種移植モデルであることが挙げられる。本来臨床において施行する脂肪移植は、患者自身から採取し精製した脂肪を注入する自家移植であり、そこに同種移植としてヒト由来 AMSC を添加することとなる。本研究では、十分な移植脂肪量を確保するために、手術検体から採取したヒト脂肪を用いたが、それにより、モデル数の不足や、抗炎症・免疫調整作用に関する評価困難などの問題が生じた。特に本研究では AMSC による有意な線維化抑制効果を認めたことから、線維化抑制機序の解明という点でも、抗炎症・免疫調整作用について、免疫不全でないモデルを用いて評価することが望ましい。

移植脂肪はその脂肪塊の大きさにより生着率が大きく左右される。周囲からの血流により確実に生着する範囲は表面から最大 300 μ m であり、MSC はさらに内部の本来であれば脂肪細胞が死滅する regenerative zone において、移植脂肪の生着向上効果を発揮することから (Eto et al., 2012)、実際の臨床に近い動物モデルとして、ある程度の脂肪注入量が確保されるべきと思われる。また、移植脂肪の採取手技として、脂肪塊採取後の手動的な破碎よりも、臨床での脂肪採取時と同様、細分化脂肪の吸引採取によるコールマン法を用いた採取が望ましい。これらを同種移植モデルにおいて再現するためには、皮下脂肪をほぼ認めないため鼠径部の fat pad の使用が必要となるマウスではなく、それ以外の動物モデルでの検討が必要と思われる。例えば、ウサギは、小動物モデルの中では比較的皮下脂肪が均一かつ潤沢であるため、コールマン法

を用いた自家脂肪の採取が可能とされるため(Brucker et al., 2018)、ウサギによる同種脂肪移植モデルを用いた AMSC 添加による抗炎症・免疫調整効果の検討は可能と思われる。

第三に脂肪由来MSCおよびSVFとの移植脂肪生着向上効果の差異を直接的に検討できていない点が挙げられる。本研究ではAMSC添加群で残存する移植脂肪の量は、Control群の約1.3倍と、MSCおよびSVFと比較して遜色なかったが、機序に関しては血管新生効果に乏しく強い線維化抑制効果を示すという、異なる結果となった。同一のモデルを用いて複数種類のMSCの直接的な比較検討を行うことで、この移植脂肪生着向上効果の機序の差が、MSCの由来の違いに起因するものであるかを解明したい。

3 総括および結論

3.1 本研究から得られた新知見

第一章

- ・ 免疫不全マウスの背部皮下を用いた脂肪移植モデルを作成した。
- ・ AMSC 添加による移植脂肪の肉眼的所見の変化は認めなかった。
- ・ AMSC 添加により残存する移植脂肪の体積、質量は有意に増加した。

第二章

- ・ AMSC 添加により移植脂肪内の線維化は有意に抑制された。
- ・ AMSC 添加により移植脂肪内の α -SMA の発現は有意に抑制された。
- ・ AMSC 添加により移植脂肪内の α -SMA、TGF- β 、Collagen1 の mRNA 発現は有意に抑制された。
- ・ AMSC 添加による移植脂肪内の血管新生の増加は認めなかった。

3.2 新知見の意義

第一章において AMSC も脂肪由来 MSC や SVF と同様に移植脂肪の生着向上効果を有することを示した。これまでに脂肪由来以外の MSC を脂肪移植に応用した報告は、骨髄由来 MSC において少数認めるのみである (Huang et al., 2017; Zhao et al., 2013)。移植用の脂肪に加え、MSC 精製用の脂肪採取の必要がある脂肪由来 MSC や、採取に侵襲的な手技が必要となる骨髄由来 MSC と比較して、AMSC は医療廃棄物である胎盤から非侵襲的に大量に採取可能であることから、同種他家移植が可能な MSC の特色を生かした安定供給が期待できる。

第二章において、AMSC の移植脂肪生着向上効果は、これまで脂肪由来 MSC や SVF で報告されていた血管増生よりも、線維化抑制機序が関わっている可能性が示唆された。MSC による移植脂肪内の線維化抑制効果については、これまでに脂肪由来 MSC で少数の報告を認めるのみである。移植脂肪内の線維化抑制は移植脂肪の生着率の向上のみならず (Kononas et al., 1993)、乳房を含めた軟部組織の再建における質感の柔らかさの維持という点で非常に有用であり (Silva et al., 2018)、より患者満足度の高い脂肪移植術の実現につながると考える。

3.3 今後の展開

まずは AMSC による移植脂肪内の線維化抑制作用のより詳細な解析のために、炎症・免疫調整作用を含めた、免疫不全でない動物モデルでの検証が必要である。前述の通りウサギを用いたより臨床に近い同種移植モデルが実現可能であれば、脂肪移植

内の炎症細胞の動態や関連する因子について、詳細な検討が可能と思われる。

また、⁴

3.4 今後の課題

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、この投与量が最適であるかについては検討できていない。AMSC は医療廃棄物から侵襲なく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である。

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 (Orbay et al., 2012)、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、十分な検証が必要と考える。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 18K09472 の助成を受けたものである。

本研究の全般において御指導、御助言をいただいた北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室・山本有平教授、舟山恵美准教授、村尾尚規先生、大澤昌之講師、ならびに前田 拓助教、石川耕資助教、佐藤千草先生、高橋周子先生、同教室員、ならびに秘書の皆様、北海道大学 大学院歯学研究院 口腔病態学分野 口腔顎顔面外科学教室・林 利彦准教授、および北海道大学医学研究院内科学教室・大西俊介准教授、帝王切開による羊膜採取にご協力いただいた北海道大学産科・千葉健太郎先生、動物実験においてご指導、ご協力いただいた北海道大学 大学院医学研究院 附属動物実験施設・土佐紀子先生ならびに技術職員の皆様に深く感謝申し上げます。

(順不同)

利益相反

この研究は株式会社カネカとの共同研究として施行した。

引用文献

(引用文献数 68)

Borghesi, J., Mario, L.C., Carreira, A.C., Miglino, M.A., and Favaron, P.O. (2017). Phenotype and multipotency of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) amniotic stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* *8*, 27.

Brucker, M., Sati, S., Spangenberg, A., and Weinzwieg, J. (2008). Long-term fate of transplanted autologous fat in a novel rabbit facial model. *Plast. Reconstr. Surg.* *122*, 749-754.

Carrion, F.A., and Figueroa, F.E. (2011). Mesenchymal stem cells for the treatment of systemic lupus erythematosus: is the cure for connective tissue diseases within connective tissue? *Stem Cell Res. Ther.* *2*, 23.

Coleman, S.R. (1995). Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthet. Plast. Surg.* *19*, 421-425.

Dabrowski, F.A., Burdzinska, A., Kulesza, A., Sladowska, A., Zolocinska, A., Gala, K., Paczek, L., and Wielgos, M. (2017). Comparison of the paracrine activity of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord, amniotic membrane and adipose tissue. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* *43*, 1758-1768.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* *8*, 315-317.

Eom, Y.W., Shim, K.Y., and Baik, S.K. (2015). Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J. Intern. Med.* *30*, 580-589.

Eto, H., Kato, H., Suga, H., Aoi, N., Doi, K., Kuno, S., and Yoshimura, K. (2012). The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plast. Reconstr. Surg.* *129*, 1081-1092.

Geeroms, M., Hamdi, M., Hirano, R., Hagiwara, H., Fujimura, S., Mizuno, H., and Tanaka, R. (2019). Quality and Quantity-Cultured Murine Endothelial Progenitor Cells Increase Vascularization and Decrease Fibrosis in the Fat Graft. *Plast. Reconstr. Surg.* *143*, 744e-755e.

Ha, K.Y., Park, H., Park, S.H., Lee, B.I., Ji, Y.H., Kim, T.Y., and Yoon, E.S. (2015). The Relationship of a Combination of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Frozen Fat with the Survival Rate of Transplanted Fat. *Arch. Plast. Surg.* *42*, 677-685.

Hamed, S., Ben-Nun, O., Egozi, D., Keren, A., Malyarova, N., Kruchevsky, D., Gilhar, A., and Ullmann, Y. (2012). Treating fat grafts with human endothelial progenitor cells promotes their vascularization and improves their survival in diabetes mellitus. *Plast. Reconstr. Surg.* *130*, 801-811.

Hamou, C., Callaghan, M.J., Thangarajah, H., Chang, E., Chang, E.I., Grogan, R.H., Paterno, J., Vial, I.N., Jazayeri, L., and Gurtner, G.C. (2009). Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization. *Plast. Reconstr. Surg.* *123*, 45S-55S.

Hong, K.Y., Yim, S., Kim, H.J., Jin, U.S., Lim, S., Eo, S., Chang, H., and Minn, K.W. (2017). The fate of the adipose-derived stromal cells during angiogenesis and adipogenesis after cell-assisted lipotransfer. *Plast. Reconstr. Surg.* *141*, 365-375.

Huang, H., Feng, S., Zhang, W., Li, W., Xu, P., Wang, X., and Ai, A. (2017). Bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles improve the survival of transplanted fat grafts. *Mol. Med. Rep.* *16*, 3069-3078.

Jiang, A., Li, M., Duan, W., Dong, Y., and Wang, Y. (2015). Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by adipose-derived stem-cells-assisted lipotransfer combined with bFGF. *TheScientificWorldJournal* *2015*, 968057.

Jin, H.J., Bae, Y.K., Kim, M., Kwon, S.J., Jeon, H.B., Choi, S.J., Kim, S.W., Yang, Y.S., Oh, W., and Chang, J.W. (2013). Comparative analysis of human

mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 17986-18001.

Jin, S., Yang, Z., and Li, F. (2020). Cell-Enriched Fat Grafting Improves Graft Retention in a Porcine Model: A Dose-Response Study of Adipose-Derived Stem Cells versus Stromal Vascular Fraction. *Plast. Reconstr. Surg.* *145*, 1005e.

Kalluri, R., and LeBleu, V.S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* *367*.

Khoury, R.K., Rigotti, G., Cardoso, E., Khoury, R.K., Jr., and Biggs, T.M. (2014). Megavolume autologous fat transfer: part I. Theory and principles. *Plast. Reconstr. Surg.* *133*, 550-557.

Kim, J., Park, M., Jeong, W., Lee, H.W., Lee, G., Suk Lee, K., Park, S.W., and Choi, J. (2019). Recipient-Site Preconditioning with Deferoxamine Increases Fat Graft Survival by Inducing VEGF and Neovascularization in a Rat Model. *Plast. Reconstr. Surg.* *144*, 619e-629e.

Kononas, T.C., Bucky, L.P., Hurley, C., and May, J.W., Jr. (1993). The fate of suctioned and surgically removed fat after reimplantation for soft-tissue augmentation: a volumetric and histologic study in the rabbit. *Plast. Reconstr. Surg.* *91*, 763-768.

Kruschewsky Lde, S., de Mello-Filho, F.V., dos Santos, A.C., and Rosen, C.A. (2007). Autologous fat graft absorption in unilateral paralyzed canine vocal folds. *Laryngoscope* *117*, 96-100.

Kubo, K., Ohnishi, S., Hosono, H., Fukai, M., Kameya, A., Higashi, R., Yamada, T., Onishi, R., Yamahara, K., Takeda, H., *et al.* (2015). Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Liver Fibrosis in Rats. *Transplant. Direct* *1*, e16.

Le Blanc, K., and Ringden, O. (2007). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J. Intern. Med.* *262*, 509-525.

- Lei, X., Liu, H., Pang, M., Zheng, Z., Tan, X., and Cheng, B. (2019). Effects of Platelet-Rich Plasma on Fat and Nanofat Survival: An Experimental Study on Mice. *Aesthet. Plast. Surg.* *43*, 1085-1094.
- Li, K., Gao, J., Zhang, Z., Li, J., Cha, P., Liao, Y., Wang, G., and Lu, F. (2013). Selection of donor site for fat grafting and cell isolation. *Aesthet. Plast. Surg.* *37*, 153-158.
- Li, K., Li, F., Li, J., Wang, H., Zheng, X., Long, J., Guo, W., and Tian, W. (2017). Increased survival of human free fat grafts with varying densities of human adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *11*, 209-219.
- Lidagoster, M.I., Cinelli, P.B., Levee, E.M., and Sian, C.S. (2000). Comparison of autologous fat transfer in fresh, refrigerated, and frozen specimens: an animal model. *Ann. Plast. Surg.* *44*, 512-515.
- Ling, L., Feng, X., Wei, T., Wang, Y., Wang, Y., Wang, Z., Tang, D., Luo, Y., and Xiong, Z. (2019). Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism. *Stem Cell Res. Ther.* *10*, 46.
- Liu, R., Long, Y., Liu, L., and Zhao, X. (2020). Effect of Platelet-Rich Fibrin on Fat Grafting in Animal Models: A Meta-Analysis. *Aesthet. Plast. Surg.* *44*, 570-578.
- Lu, F., Li, J., Gao, J., Ogawa, R., Ou, C., Yang, B., and Fu, B. (2009). Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. *Plast. Reconstr. Surg.* *124*, 1437-1446.
- Luo, X., Cao, W., Xu, H., Wang, L., Zhang, Z., Lu, Y., Jin, X., Ren, X., He, J., Fu, M., *et al.* (2015). Coimplanted endothelial cells improve adipose tissue grafts' survival by increasing vascularization. *J. Craniofac. Surg.* *26*, 358-364.

- Mack, M. (2018). Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol.* *68-69*, 106-121.
- Matsumoto, D., Sato, K., Gonda, K., Takaki, Y., Shigeura, T., Sato, T., Aiba-Kojima, E., Izuka, F., Inoue, K., Suga, H., *et al.* (2006). Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng.* *12*, 3375-3382.
- McCune, J.M. (1991). SCID mice as immune system models. *Curr. Opin. Immunol.* *3*, 224-228.
- Meirelles Lda, S., Fontes, A.M., Covas, D.T., and Caplan, A.I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 419-427.
- Merrifield, B.A., Chang, A., Hostetter, G., and Komorowska-Timek, E. (2018). Volume Retention, Metabolism, and Cellular Composition of Human Fat Xenografts. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open* *6*, e1869.
- Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C.A., Busse, R., and Bouloumie, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* *110*, 349-355.
- Morikawa, S., Mabuchi, Y., Kubota, Y., Nagai, Y., Niibe, K., Hiratsu, E., Suzuki, S., Miyauchi-Hara, C., Nagoshi, N., Sunabori, T., *et al.* (2009). Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J. Exp. Med.* *206*, 2483-2496.
- Moseley, T.A., Zhu, M., and Hedrick, M.H. (2006). Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* *118*, 121S-128S.
- Oashi, K., Furukawa, H., Akita, S., Nakashima, M., Matsuda, K., Oyama, A., Funayama, E., Hayashi, T., Hirano, A., and Yamamoto, Y. (2012). Vascularised fat flaps lose 44% of their weight 24 weeks after transplantation. *J. Plast. Reconstr.*

Aesthet. Surg. **65**, 1403-1409.

Ohara, M., Ohnishi, S., Hosono, H., Yamamoto, K., Yuyama, K., Nakamura, H., Fu, Q., Maehara, O., Suda, G., and Sakamoto, N. (2018). Extracellular Vesicles from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Inflammation and Fibrosis in Rats. *Stem Cells Int.* **2018**, 3212643.

Ono, M., Ohnishi, S., Honda, M., Ishikawa, M., Hosono, H., Onishi, R., Nakagawa, K., Takeda, H., and Sakamoto, N. (2015). Effects of human amnion-derived mesenchymal stromal cell transplantation in rats with radiation proctitis. *Cytotherapy* **17**, 1545-1559.

Orbay, H., Hinchcliff, K.M., Charvet, H.J., and Sahar, D.E. (2018). Fat Graft Safety after Oncologic Surgery: Addressing the Contradiction between In Vitro and Clinical Studies. *Plast. Reconstr. Surg.* **142**, 1489-1499.

Parekkadan, B., van Poll, D., Megeed, Z., Kobayashi, N., Tilles, A.W., Berthiaume, F., and Yarmush, M.L. (2007a). Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 247-252.

Parekkadan, B., van Poll, D., Suganuma, K., Carter, E.A., Berthiaume, F., Tilles, A.W., and Yarmush, M.L. (2007b). Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* **2**, e941.

Parrish, J.N., and Metzinger, S.E. (2010). Autogenous fat grafting and breast augmentation: a review of the literature. *Aesthet. Surg. J.* **30**, 549-556.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147.

Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L., Johnstone, B.H., Considine, R.V., and March, K.L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells.

Circulation *109*, 1292-1298.

Sakaida, I., Terai, S., Yamamoto, N., Aoyama, K., Ishikawa, T., Nishina, H., and Okita, K. (2004). Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* *40*, 1304-1311.

Saulnier, N., Loriau, J., Febre, M., Robert, C., Rakic, R., Bonte, T., Buff, S., and Maddens, S. (2016). Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells? *Vet. Immunol. Immunopathol.* *171*, 47-55.

Silva, A.B.D., Haupenthal, F., Morais, A.D., Ascenço, A.S.K., Sebastião, A.P.M., Cavalcanti, M.A.R., and Freitas, R.S. (2018). Relationship between Tamoxifen and the Absorption of Subfascial Autologous Fat Grafts. *Plast. Reconstr. Surg.* *141*, 1408-1415.

Sommer, B., and Sattler, G. (2000). Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol. Surg.* *26*, 1159-1166.

Stagg, J. (2007). Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens* *69*, 1-9.

Suga, H., Matsumoto, D., Inoue, K., Shigeura, T., Eto, H., Aoi, N., Kato, H., Abe, H., and Yoshimura, K. (2008). Numerical measurement of viable and nonviable adipocytes and other cellular components in aspirated fat tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* *122*, 103-114.

Topcu, A., Aydin, O.E., Unlu, M., Barutcu, A., and Atabey, A. (2012). Increasing the viability of fat grafts by vascular endothelial growth factor. *Arch. Facial Plast. Surg.* *14*, 270-276.

Toyserkani, N.M., Quaade, M.L., and Sorensen, J.A. (2016). Cell-Assisted Lipotransfer: A Systematic Review of Its Efficacy. *Aesthet Plast. Surg.* *40*, 309-318.

Tsuda, M., Ohnishi, S., Mizushima, T., Hosono, H., Yamahara, K., Ishikawa, M., Abiko, S., Katsurada, T., Shimizu, Y., and Sakamoto, N. (2018). Preventive effect of mesenchymal stem cell culture supernatant on luminal stricture after endoscopic submucosal dissection in the rectum of pigs. *Endoscopy* *50*, 1001-1016.

Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 654-659.

Wang, Y., Liu, J., Chen, X., Sun, H., Peng, S., Kuang, Y., Pi, J., Zhuang, T., Zhang, L., Yu, Z., *et al.* (2019). Dysfunctional endothelial-derived microparticles promote inflammatory macrophage formation via NF- κ B and IL-1 β signal pathways. *J. Cell. Mol. Med.* *23*, 476-486.

Xu, F.T., Li, H.M., Yin, Q.S., Liu, D.L., Nan, H., Zhao, P.R., and Liang, S.W. (2014). Human breast adipose-derived stem cells transfected with the stromal cell-derived factor-1 receptor CXCR4 exhibit enhanced viability in human autologous free fat grafts. *Cell. Physiol. Biochem.* *34*, 2091-2104.

Yamahara, K., Harada, K., Ohshima, M., Ishikane, S., Ohnishi, S., Tsuda, H., Otani, K., Taguchi, A., Soma, T., Ogawa, H., *et al.* (2014). Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* *9*, e88319.

Yan, J., Tie, G., Xu, T.Y., Cecchini, K., and Messina, L.M. (2013). Mesenchymal Stem Cells as a Treatment for Peripheral Arterial Disease: Current Status and Potential Impact of Type II Diabetes on Their Therapeutic Efficacy. *Stem Cell Rev. Rep.* *9*, 360-372.

Yin, S., Ji, C., Wu, P., Jin, C., and Qian, H. (2019). Human umbilical cord mesenchymal stem cells and exosomes: bioactive ways of tissue injury repair. *Am. J. Transl. Res.* *11*, 1230-1240.

Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Hirohi, T., and Harii, K. (2007). Cell-Assisted Lipotransfer for Cosmetic Breast Augmentation: Supportive Use of

Adipose-Derived Stem/Stromal Cells. *Aesthet. Plast. Surg.* *32*, 48-55.

Zhao, J., Yi, C., Zheng, Y., Li, L., Qiu, X., Xia, W., Su, Y., Diao, J., and Guo, S. (2013). Enhancement of fat graft survival by bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy. *Plast. Reconstr. Surg.* *132*, 1149-1157.

Zhu, M., Dong, Z., Gao, J., Liao, Y., Xue, J., Yuan, Y., Liu, L., Chang, Q., and Lu, F. (2015). Adipocyte regeneration after free fat transplantation: promotion by stromal vascular fraction cells. *Cell Transplant.* *24*, 49-62.

Zhu, M., Zhou, Z., Chen, Y., Schreiber, R., Ransom, J.T., Fraser, J.K., Hedrick, M.H., Pinkernell, K., and Kuo, H.C. (2010). Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann. Plast. Surg.* *64*, 222-228.