

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05002

研究課題名(和文) 幹細胞消耗性欠乏組織に対する組織賦活化・肥沃化再生治療の開発

研究課題名(英文) Development of revitalization therapy for stem cell depleted conditions

研究代表者

吉村 浩太郎 (Yoshimura, Kotaro)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：60210762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織中に含まれる脂肪幹細胞や血管内皮前駆細胞を介した組織再生効果は、瘢痕拘縮組織、慢性萎縮性疾患など様々な難治性疾患の質的・機能的改善にもその適応が広がりつつある。マウス背部皮膚へ異なる照射条件で照射して、皮膚皮下組織を採取してその影響を分析するとともに、皮膚欠損を作製して、創傷治癒への影響を確認した。結果として、放射線照射群においては非照射群と比して、明らかな創治癒遅延を認めた。また、放射線照射群においては、総線量が同値でも1回照射量が異なると、創傷治癒期間に大きな差が出た。幹細胞、脂肪移植、結合組織碎片を注入した治療群では有意に治癒が促進された。

研究成果の概要(英文)：Clinical sequelae of irradiation result in tissue devitalization, where wound healing capacity is impaired. Non-lethal irradiation at various doses (5-15 Gy) and frequencies (1-3 times on sequential days) was delivered to dorsal skin of nude mice. Wounds were locally injected with vehicle, cultured adipose-derived stem cells (ASCs), centrifuged fat tissue, or micronized cellular adipose matrix, monitoring therapeutic impact for up to 15 days. Radiation damage was dose-dependent. At highest dosage (15 Gy × 3), open wounds persisted on Day 15. However, wounds injected with cultured ASCs were nearly healed on Day 12, and those treated with injection of centrifuged fat or micronized connective tissue healed faster than untreated controls ($p < 0.05$). Irradiation damage and tissue devitalization were dose-dependent, though fractionated protocols helped to reduce. ASCs and other fat-derived products harboring ASCs successfully revitalized irradiated tissues and accelerated wound healing.

研究分野：形成外科

キーワード：幹細胞 放射線障害

1. 研究開始当初の背景

これまでに、虚血組織を対象とした血管新生治療の研究は広く行われてきた。しかし、これらの研究は血管を新生すること、血流量を上げること、に焦点を絞って目的化されており、そのベースにある幹細胞欠乏という観点に欠けていたために、根本的な治療ができず、表面的・姑息的な対症的療法の域を超えることができなかった。バイパス療法、血管拡張療法、血管新生再生医療、増殖因子療法、細胞外基質療法、高圧酸素療法など数多くの治療法が挙げられるが、その視点は組織の血流を良くすることにとどまっている。

2. 研究の目的

慢性化した虚血・線維性組織は、治癒が悪く、潰瘍は難治化し、外科的治療の適応とならず、治療法がないのが現状である。典型的には、放射線障害組織、慢性炎症性線維性疾患、強皮症などの萎縮性自己免疫疾患、慢性アレルギー疾患、肥厚性瘢痕・瘢痕拘縮などである。このような幹細胞消耗性欠乏組織を、賦活・肥沃化(組織の治癒能・予備能を回復すること)、健常化する治療法を開発することが本研究の目的である。賦活化治療により、この病的組織の血流は良くなり、組織酸素分圧が上がり、組織や皮膚の伸展性が獲得され、組織の治癒能・予備能は回復し正常化される。

3. 研究の方法

我々が想定する複数の病態が幹細胞枯渇組織であることを調べた。この病態群とは、マウス(動物モデル)では放射線障害、慢性難治性潰瘍、慢性虚血性組織、その他の線維性臓器疾患、であり、ヒトでは乳がん温存療法後組織、頭頸部放後組織、限局性強皮症、肥厚性瘢痕拘縮(ケロイド)、アトピー性皮膚炎後組織、などであり、その病態を幹細胞生物学的に分析した。

動物実験において、その病態の細胞治療を行い、その有効性を評価する。初歩的な脂肪移植法から始まり、幹細胞付加脂肪移植法、さらに、幹細胞移植法を行った。

動物実験は、免疫不全動物を使ったヒト細胞治療、およびマウスにヒト幹細胞を投与する異種移植モデル(幹細胞の多くは免疫寛容であることを利用する)まで行った。

Non-lethal irradiation at various doses (5 Gy, 10 Gy, 15 Gy) and frequencies (1-3 times on sequential days) was delivered to dorsal skin of 7-week-old nude mice, evaluating subsequent gross and microscopic changes for up to 4 weeks. Cutaneous punch wounds were then created, to compare wound healing in irradiated and non-irradiated states. Wounds were also locally injected with vehicle, cultured adipose-derived stem cells (ASCs), centrifuged fat tissue, or micronized cellular adipose matrix, monitoring therapeutic impact for up to 15 days.

4. 研究成果

Nude mice given total doses >15 Gy spontaneously developed skin ulcers ~2 weeks after exposure and radiation damage was dose-dependent, but a fractionated irradiation protocol could reduce the damage. Histologic assessment revealed dose-dependent dermal fibrosis/thickening and subcutaneous atrophy (Fig. 1). Dose-dependent (5-15 Gy) impairment of wound healing was also evident. At highest dosage (15 Gy × 3), open wounds persisted on Day 15. However, wounds injected with cultured ASCs were nearly healed on Day 12, and those treated with injection of centrifuged fat or micronized connective tissue healed faster than untreated controls ($p < 0.05$) (Fig. 2, 3). There was no significance between treated groups.

Irradiation damage and tissue devitalization were dose-dependent, though fractionated protocols helped to reduce. ASCs and other fat-derived products harboring ASCs successfully revitalized irradiated tissues and accelerated wound healing.

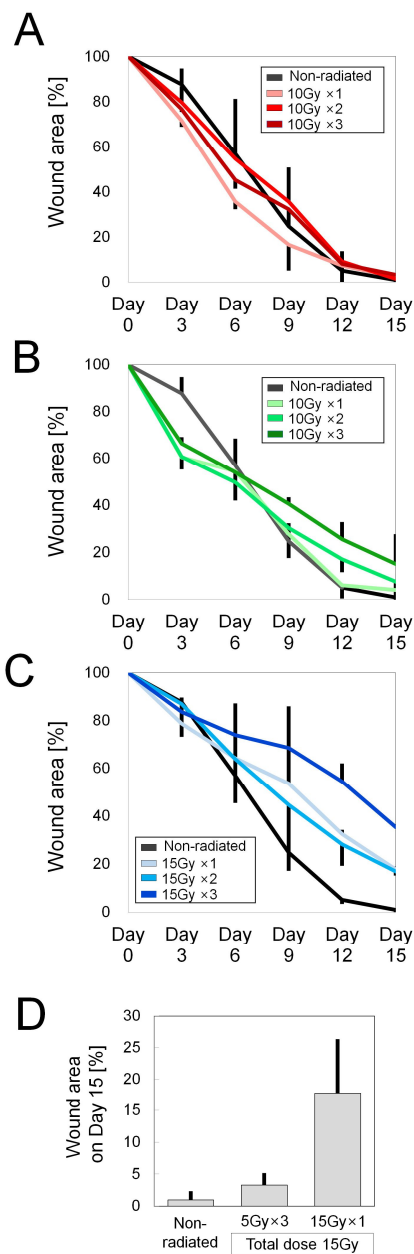


Fig.1 Quantitative evaluation of wound healing in irradiated tissues. Four weeks after various radiation exposures, 6-mm punch defect created, grossly monitoring wound healing until Day 15. (A) Residual wound areas [%] in animal irradiation subsets (5 Gy x 1, 5 Gy x 2, and 5 Gy x 3). (B) Residual wound areas [%] in animal irradiation subsets (10 Gy x 1, 10 Gy x 2, and 10 Gy x 3). (C) Residual wound areas [%] in animal irradiation subsets (15 Gy x 1, 15 Gy x 2, and 15 Gy x 3). (D) Residual wound areas [%] at 4 weeks in animal irradiation subsets (5 Gy x 1 and 15 Gy x 1). Fractionation impacted healing capacity at same total dose.

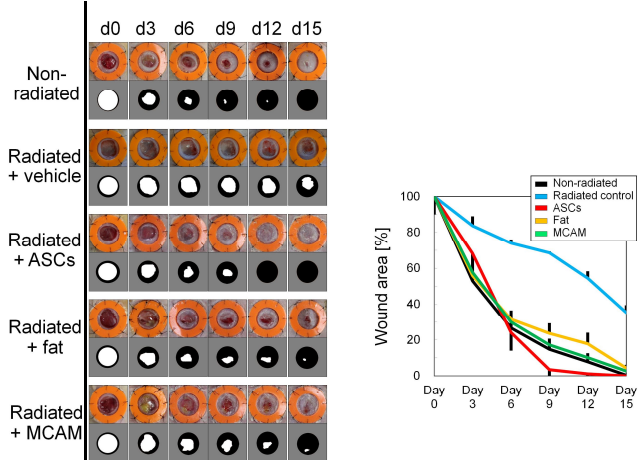


Fig 2. Therapeutic effects of three human adipose-derived products on wound healing in irradiated tissue. One of three human adipose-derived products (ASCs: cultured adipose-derived stem cells; fat: centrifuged lipoaspirate; MCAM: micronized adipose connective tissue) was injected into skin surrounding 6-mm punch defects, evaluating wound sizes grossly until Day 15 (left column: representative photos and pixelated images of residual wounds; right graph: quantitative data on wound sizes).

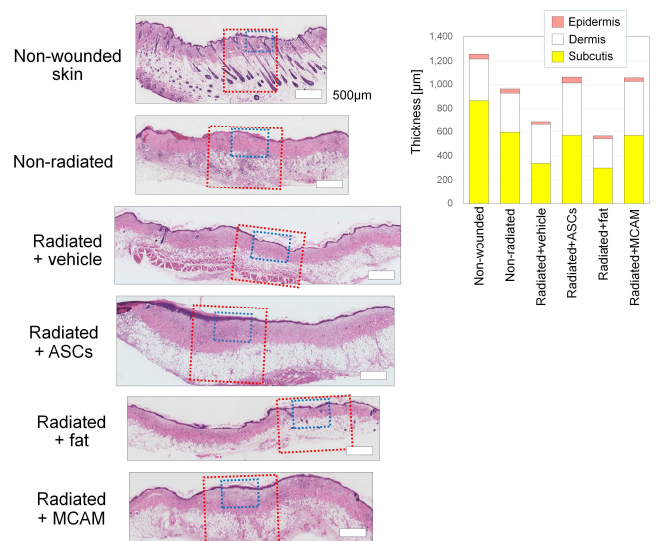


Fig 3. Histologic sections of irradiated skin after wound healing (Left) Photomicrographs of H&E-stained sections (low magnification) on Day 15 (high-power views [red and blue squares] shown in Supplemental Figure S5). Unlike intact skin, irradiated skin healed with scarring and subcutaneous atrophy. Histologic examination confirmed that wound healing improved with use of any adipose-derived product. Scale bars=500 µm. (Right) Quantitative data for the

thickness of epidermis, dermis and subcutaneous fatty layer on Day 15.

研究者番号：

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(4) 研究協力者

()

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1) Wu SH, Shirado T, Mashiko T, Feng J, Asahi R, Kanayama K, Mori M, Chi D, Sunaga A, Sarukawa S, Yoshimura K. Therapeutic effects of human adipose-derived products on impaired wound healing in irradiated tissue. *Plast Reconstr Surg*, in press.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村浩太郎 (YOSHIMURA, Kotaro)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：60210762

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()