

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15653

研究課題名(和文) 神経成長因子の続発性リンパ浮腫、ケロイドへの発現と分子関与

研究課題名(英文) Implication of nerve growth factor in secondary lymphedema and pathogenesis

研究代表者

秋田 定伯 (AKITA, Sadanori)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：90315250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：難治創傷の内でも重症下肢虚血(CLI)は、特に患者状態や状況によって通常の血行再建術が適用できない場合があり、現存の血行を維持しつつ遊離皮弁や全く下肢血行とは独立した血行支配の局所皮弁で治療する事などが選択されることがある。放射線障害は組織線維化を引き起こし、創傷治癒にとって不利であり、外科手術単独では障害範囲が明白でなく局所血行安定部位が救済することは困難な事が多い。脂肪由来幹細胞(Adipose-derived Stem Cells, ASCs)は下肢虚血モデルに有用とされており、細胞の担体として、放射線照射されていない腹部遠隔脂肪弁による血行付加しASCsは血行付加と共に有効であった。

研究成果の概要(英文)：Treatment of critical limb ischemia is sometimes difficult due to the patient's condition. The hindlimbs of Sprague-Dawley rats, after 20 Gy X-ray radiation and surgical occlusion, were divided with superficial fascial flap, 5.0×10^6 adipose-derived stromal/stem cell (ASC) and both combined. There were no significant differences between the flap alone and ASC alone treatment groups. Wound healing was significantly increased in the combined treatment at 1 week and there was no wound by 2 weeks except for the no flap and no ASCs group. Von Willbrand factor, blood vessel, showed a significant increase in the combined treatment group, both at 1 week and 2 weeks. In the cell tracking, at 2 weeks, the GFP-tagged ASCs were significantly more positive in the no flap group than in the flap group. ASCs may be a potent cell source in radiated and occluded limbs by enhancing tissue blood flow and blood vessel density.

研究分野：形成外科

キーワード：ケロイド 放射線 難治創傷 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒における創傷治癒遅延と、ケロイド・肥厚性瘢痕などの過剰線維疾患 (Fibro-Proliferative Disorder) と創傷治癒遅の代表である放射線障害、続発性リンパ浮腫を幹細胞の関与した一連の疾患群として捉えられないかと推定し、その場合の介在因子として、幹細胞とそれを制御する神経系、特に神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF) に着目し、発現程度・分布、転写調節様式について調査することで、神経系のなかでも特に交感神経系、一次感覚ニューロンと創傷の関係、更に痛みに関連して、傷害受容体 (nociceptor) や機械刺激痛覚などとの関連を調査し、ケロイド、放射線障害に伴う疼痛、搔痒とそれに伴う二次的な局所の炎症・浮腫への関連を研究するものである。これまで諸家によりケロイドの病因解析と予防・治療法に貢献する重要な知見が報告され、今後の治療法の開発が期待されるが、当科でも神経系と創傷に関連して、知覚神経 (大腿神経・伏在神経) 再生検討した足底パンチ孔創傷治癒は間葉系幹細胞へ血管茎付浅腹壁結合織膜弁をキャリアーとして用いると直接改善効果を認め、組織像で神経再生を促進するのみならず、機能的にも神経伝達速度の有意な改善、神経軸索の再生となったことから、創傷と神経支配・神経再生に対する詳細な研究への動機となった。またマウス放射線照射後続発性リンパ浮腫モデルにおいて、自家脂肪由来幹細胞は容量依存的に創傷治癒及び、リンパ流再生について検討しており、ラット足底部切開創での創傷治癒過程におけるNGFの発現 (Wu, Brenna TJ, et al. Anesthesiology 107: 128-135, 2007) の経過観察の報告があるものの、神経形成と線維化、神経と疼痛に焦点を絞った研究は見あたらない。更に一連の創傷治癒機転における時間軸毎の評価はなされていない。本研究では、特にケロイド治療目的などのために使用する放射線による放射線障害 (浮腫、疼痛、搔痒感亢進、局所の持続する炎症、潰瘍、壊疽、壊死など) 一連の治療課題として検討するものである。

2. 研究の目的

重症下肢虚血 (CLI) では、特に患者状態や状況によって通常の血行再建術が適用できない場合があり、現存の血行を維持しつつ遊離皮弁や全く下肢血行とは独立した血行支配の局所皮弁で治療する事などが選択されることがある。放射線障害は 2 Gy 程度の照

射から 24~48 時間の早期から、局所組織酸素分圧を低下させ、12 Gy 照射では、3~4 年で組織線維化を引き起こし、創傷治癒にとって不利であり、外科手術単独では障害範囲が明白でなく局所血行安定部位が未確定のため救肢することは困難な事が多い。脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived Stem Cells, ASCs) は下肢虚血モデルに有用とされており、細胞の担体として、放射線照射されていない腹部遠隔脂肪弁による血行付加の効果と共に検討した。

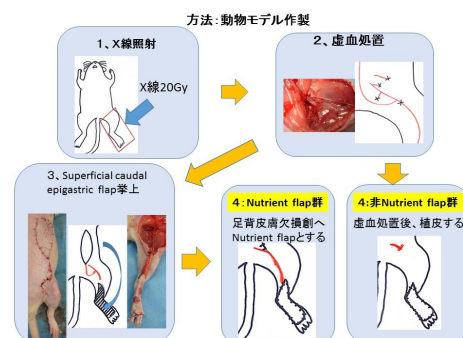
3. 研究の方法

(1) 脂肪由来幹細胞の準備精製

10 週令雄性 SD ラット及び green fluorescent protein (GFP) 遺伝子改変 (付加) SD ラットを用いてそけい部から採取した脂肪組織 (5.25g) を 4mm 大に細片化し、攪拌細分化後、コラーゲン溶解酵素を用いた 37、35 分間消化分解した。懸濁液は、200 × g、4 で 5 分間遠心分離し、沈殿物は 1:1 の MSCND と ES 培地液で培養し、幾何級数成長まで維持し、回収には 200 × g、5 分間二酸化炭素孵卵器で酵素処理し、初代培地から 5 継代までを細胞移植など実験に使用した。

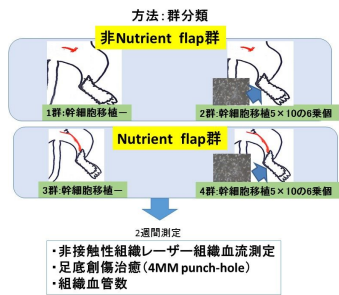
(2) ラット虚血下肢モデル作成と実験群

定時明暗、室温、湿度管理した長崎大学動物実験施設で、長崎大学施設基準承認後 (#1008030872-3)、300-400 g の 10 週令雄性 SD ラットを用いて、左下肢全体に 20Gy の電離放射線照射し、非放射線部位の下腹部から浅腹壁血行を茎とする脂肪弁が左足背に到達可能であることを確認し、元の位置に再縫合した。その後総腸骨動脈の分枝は大腿動脈を含め浅腹壁動脈以外は全て結紮切離した。



実験動物は n=20 以降 4 群に分け、左足背への下腹壁皮弁の有無 (無の場合には皮膚を切離して植皮) ASC を下肢全体に注入の有無で分けた。対照として、下腹壁皮弁も ASC 注入も実施せず放射線照射のみの群を検討した。

また GFP SD ラットからの ASC は下腹壁弁の有無各々に n=10 注入実験した。

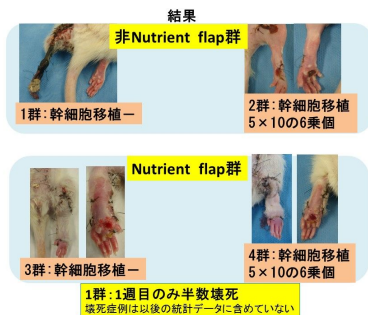


各々の動物の測定には4mmのパンチ孔をあけ、創傷治癒時期を2週までに検討した。

下肢組織の非接触性レーザー血流計にて対側(右側)の血流との比で組織血流を、von Willebrand 因子に組織内の血管新生、GFP の組織内での動向を1週、2週で検討した。

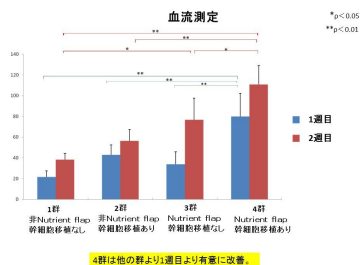
4. 研究成果

(1) 腹壁弁群(グループ3、4)及びASC細胞治療群(グループ2)は全例下肢は生存したが、細胞なし、腹壁弁なしのグループ1は、半数が壊死(壊疽)となった。壊死(阿蘇)した動物は以降の解析には用いなかった。



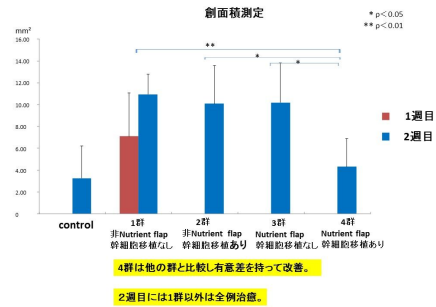
(2) 血行

1週ではグループ4(腹壁弁+ASC)群が他群と比較して優位に血行改善した(P<0.01)。血流量は、以降グループ2(皮弁なし+細胞)群、グループ3(皮弁+細胞なし)群、グループ1群の順番となりグループ1, 2, 3間での有意差はなかった。2週ではグループ4が他の3群と比較して優位に有意に高値を示し、グループ3はグループ1と比較して有意に高値であった(P<0.05)。



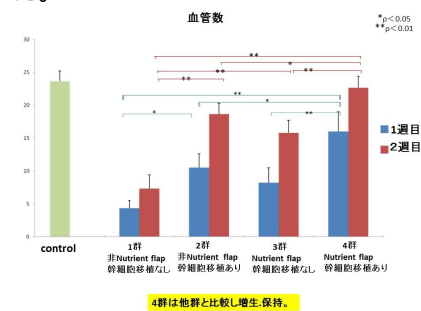
(3) 創傷治癒

足底の創傷治癒は、4mmパンチ孔で開け、当初12.56mm²であったが、1週の対照、グループ1、グループ2、グループ3、グループ4では各々3.3 ± 2.96, 11.0 ± 1.84, 10.1 ± 3.48, 10.2 ± 3.63 and 4.3 ± 2.59 mm²であり、グループ4は他の3群と比較して、有意に創傷治癒促進していた(p<0.01)。2週ではグループ1は1, 7.1 ± 3.99 mm²の創を認めたが、他は完全に閉鎖した。



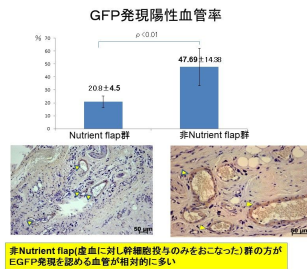
(4) von Willebrand 因子免疫染色

1週では対照群では、23.7 ± 1.52 細胞/視野、グループ1、グループ2、グループ3、グループ4では各々、4.3 ± 1.15、10.5 ± 2.08、8.2 ± 2.08、16.0 ± 3.00 細胞/視野であった。1週ではグループ4がグループ1-3のいずれとの比較でも優位に高値となった(P<0.01:グループ1と3、P<0.05:グループ2)。グループ2はグループ1と比較して優位に高値であった(P<0.05)。2週では、グループ1、グループ2、グループ3、グループ4では各々7.3 ± 2.08、18.7 ± 1.63、15.8 ± 1.92、22.7 ± 1.75 細胞/視野であった。グループ3はグループ1と比較して有意であった(P<0.01)。1週、2週でグループ2と3の間に有意差はなかった。



(5) GFP の組織内での発現

GFPの発現は、非脂肪弁群では47.7 ± 21.22 細胞/視野、脂肪弁群で20.8 ± 8.58 細胞/視野で有意差を認めた(p<0.01)。



(6) まとめ

浅腹壁脂肪弁は、細胞やサイトカインの担体として既に報告しているが、放射線障害下肢モデルでも有用であることが分かった。Von Willebrand 因子は組織内の血管数を明示化し血行の客観的評価となる。血管数は1週で、グループ2(脂肪弁なし+ASC細胞)群とグループ4(脂肪弁+ASC)群がグループ1(脂肪弁なし+ASCなし)群と比較して有意に高値であり、グループ4は2週でも他の3群と比較し有意に高値となった。

GFPは脂肪弁無群は脂肪弁群とひかくして、有意に2倍の高値となった。移植ASCは脂肪弁無群、放射線照射後の無血行環境ではより分化更新していくものと推察された。結論として、最も効果的な下肢の血行再建はASCに血管茎付脂肪弁で治療した群であり、2週までにASCは増殖し移植後分化もすると考えられた。

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)

[雑誌論文](計4件)

1. Singh A, Alavi A, Wong R, Akita S. Radiodermatitis: a review of our current understanding. Am J Clin Dermatol, 査読有、in press.
2. Yoshida S, Yoshimoto H, Hirano A, Akita S. Wound healing and angiogenesis through combined use of a vascularized tissue flap and adipose-derived stem cells in a rat hindlimb irradiated ischemia model. Plast Reconstr Surg., 査読有、in press
3. Akita S. Lower extremity wounds in idiopathic thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus patients. Int J of Low Extrem Wounds

(2015, 14:224-230), 査読有

4. Yoshida S, Hamuy R, Hamada Y, Yoshimoto H, Hirano A and Akita S. Adipose-derived stem cell transplantation for therapeutic lymphangiogenesis in a mouse secondary lymphedema model. Regen Med (2015, 10:549-562), 査読有

[学会発表](計11件)

1. Akita S. Treatment of Diabetic (Foot) Ulcer and intractable wounds. A life that is born makes life grow. Cord blood: current experiences and future programs. Invited lecture, Milan (Italy), June 6, 2015.
2. Akita S. Growth factors related to wound healing and regeneration. 2015 Global perspective and new innovations for best wound and scar management, invited lecture, Kaohsiung(Taiwan), June 27, 2105
3. Akita S. Future of plastic surgery research and practice. 2015 Global perspective and new innovations for best wound and scar management, invited lecture, Kaohsiung (Taiwan), June 28, 2105
4. Akita S. Functional and esthetic reconstruction and regeneration in wound healing. 10th National Congress on Trauma in China, invited lecture, Zhengzhou (China), August 28, 2015
5. Akita S. Various causes of challenging wounds. 2015 The 4th Asian Wound Healing Association Conference and Peking

- University Hospital Wound Healing International Forum, Invited lecture, Beijing (China), September 24, 2015.
6. Akita S. Innovative view of Wound Healing & Vascular Anomalies. International Wound & Biotherapy conference 2015, invited lecture, Kuala Lumpur (Malaysia), October 16, 2015
 7. Akita S. Recent advancement on Cultured Epithelia Autografts (CEA). International Wound & Biotherapy conference 2015, invited lecture, Kuala Lumpur (Malaysia), October 16, 2015
 8. Akita S-Radiation- a friend or an enemy-That's a big question to plastic surgeons. Visiting professor lecture, Plastic Surgery department, Ohio State University, Columbus (USA), November 20, 2015.
 9. Akita S. How to treat and manage difficult wounds. Conference in update advances in wound care, invited lecture, Ho Chi Minh City (Vietnam), November 27, 2015.
 10. 秋田定伯 - 間葉系幹細胞を用いた創傷治療 - 再生医学 久留米大学形成外科 力丸英明教授 就任記念講演、萃香園ホテル (福岡県、久留米市) 2015年4月18日、2015年
 11. 秋田定伯 デブリードマンの工夫 日本創傷治療学会 コンセンサスガイドライン講演会、JP タワーホール&カンファレンス (東京、千代田区) 2015年11月29日
- 〔図書〕(計 7 件)
1. 創傷治療 / 秋田定伯 - T E X T形成外科学 第3版、波利井清紀(監修)、中塚貴志、亀井 譲(編集)7頁、in press、南山堂、東京、査読有
 2. 秋田定伯
第6章生体材料と生体組織工学・再生医療 / 4. 成長因子
形成外科治療手技全書 形成外科の期本手技1 波利井清紀、野崎幹弘(監修)、平林伸一、川上重彦(総編集)、鈴木茂彦、貴志和生(編集) in press、克誠堂出版、東京、査読有
 3. Imaging, vascular assessment: Extension in depth and vascular anomalies / Akita S, Houbara S, Akatsuka M- Skin Necrosis. (Eds.) Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S and Ennis WI, Springer-Verlag, Heidelberg, (2015, 19-24)、査読有
 4. How to manage radiation injuries / Murakami C, Fujioka M, Akita S- Skin Necrosis. (Eds.) Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S and Ennis WI, Springer-Verlag, Heidelberg, (2015, 71-74)、査読有
 5. Infection context: Necrotizing fasciitis / Akita S- Skin Necrosis. (Eds.) Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S and Ennis WI, Springer-Verlag, Heidelberg, (2015, 83-88)、査読有
 6. Toxic syndromes / Hayashida K, Fujioka M, Murakami C, Akita S- Skin Necrosis.

(Eds.) Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S and Ennis WI, Springer-Verlag, Heidelberg, (2015, 105-108)、査読有

7. Surgical debridement / Akita S, Akatsuka M- Skin Necrosis. (Eds.) Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S and Ennis WI, Springer-Verlag, Heidelberg, (2015, 257-264)、査読有

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称：RANSGENIC MOUSE MODEL FOR PITUITARY DISORDERS ASSOCIATED WITH LIF OVER-EXPRESSION AND/OR GH UNDEREXPRESSION AND ITS USE FOR TESTING THERAPEUTIC DRUGS FOR THE CONDITIONS

発明者：Melmed S, Akita S, Readhead C
権利者：Melmed S, Akita S, Readhead C
U.S. Patent No.: 5,824,838,
Issued: October 20, 1998

Expiration: May 9, 2016 [expiration date is 20 years from the file date of May 9, 1996

European Patent No.: 0 914 419 B1,
Issued: June 30, 2004

Expiration: April 29, 2017 [expiration date is 20 years from the file date of April 29, 1997

Japan - pending, Filed: April 29, 1997

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/plastics/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

秋田定伯 (AKITA, Sadanori)
研究者番号：90315250
長崎大学・病院(医学系)・助教

(2)研究分担者

吉本 浩 (YOHIMOTO, Hiroshi)
研究者番号：90513309
長崎大学・病院(医学系)・助教

(3)連携研究者

松瀬 美智子 (MATSUSE, Michiko)
研究者番号：30533905
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

中沢 由華 (NAKAZAWA, Yuka)
研究者番号：00533902
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教