

令和元年5月31日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11367

研究課題名(和文)多血小板血漿と脂肪由来幹細胞を利用した新しい乳房再建法確立の試み

研究課題名(英文)A trial in breast reconstruction surgery using platelet rich plasma and adipose derived stem cells

研究代表者

八木 俊路郎(Yagi, Shunjiro)

鳥取大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00378192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々は乳癌に対する乳房温存術後の乳房変形に対し、脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)を用いた研究を行ってきたが、注入脂肪組織の経時的な萎縮が問題となっていた。そこで、血管新生作用や各種の成長因子を多く含むことで知られる多血小板血漿(PRP)を用いて、ADSCの増殖能や分化に与える影響を検討した。至適濃度に希釈したPRPをADSCに添加すると細胞増殖能を持ち、顕微鏡下での細胞の形態観察や免疫染色において分化誘導能が示唆されたが、下肢虚血マウスモデルを用いた生体実験では、PRPを添加しないADSC単独投与群で最も血流改善が良好な結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)と多血小板血漿(PRP)の併用投与により、ADSCの細胞増殖能や血管内皮細胞への分化誘導能があることを証明できた。一方、下肢虚血モデルマウスでの1ヶ月間の血流改善度の追跡評価では、我々の予想に反し併用投与よりもADSCs単独投与で良好なデータが得られた。In vitro実験は5日間と短期的な追跡であったが、局所投与によるvivoの実験は1ヶ月と比較的長期の追跡であったため、この間にPRPの局在性が失われてしまった可能性などが予想された。

研究成果の概要(英文)：We had reported some positive results about using adipose derived stem cells (ADSCs) to breast deformation after breast-conserving surgery in clinical research. However, one problem is that atrophy of adipose tissues. To resolve this problem, we demonstrate the efficacy of adding platelet rich plasma (PRP), contains numerous growth factors useful for angiogenesis, cell proliferation and differentiation. As a results, the proliferation rate of ADSCs was higher in the optimum concentration of PRP, and we suggested that differentiation inducing ability from ADSCs to vascular endothelial cells at a specific concentration. And that, we suggested that the ability of neovascularization using a mouse ischemic hindlimb model according to laser Doppler perfusion scan. Against our expectation, blood flow ratios of ischemic limb to normal limb were significantly higher in only ADSC group.

研究分野：形成外科学

キーワード：脂肪組織由来幹細胞(ADSCs) 多血小板血漿(PRP) 血管新生 細胞増殖能 分化誘導能 下肢虚血モデル 血流改善

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、脂肪組織由来幹細胞 (Adipose derived Stem Cells : ADSCs) を用いた乳がん術後の乳房再建術の基礎研究および臨床研究を行ってきた。この結果、注入脂肪組織の経時的な萎縮が問題となってきた。これらの問題を解決するため、脂肪と ADSCs の移植時に PRP を混合付加することによって、血管新生を誘導し、移植した脂肪組織の萎縮を予防することができる新たな治療法の開発を行うことを計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、乳癌に対する乳房温存術後の乳房変形に対する皮下脂肪細胞と皮下脂肪由来幹細胞 (Adipose derived stem cells: ADSCs) 移植の際に課題となっていた経時的な注入脂肪細胞萎縮を予防するために、多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) を同時に移植することにより脂肪細胞の生着率を向上することを期待し、新たな治療法を開発することである。多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma : PRP) は、血管新生、線維芽細胞の活性化およびコラーゲン産生に関する成長因子を多く含むため、PRP を用いた血管新生、骨再生、血管修復、創傷治癒および抗加齢療法に関する研究が報告されている。これらの性質を持つ PRP を移植した脂肪組織および ADSCs に混合付加すれば、血管新生を誘導し、移植した脂肪組織の萎縮を予防できるのではないかと予想し、試験管内および生体内での検討を行うこととする。

3. 研究の方法

当初は乳房再建モデルマウスを作製し使用する予定であったが、マウスとヒトの皮下組織には構造に違いがあり、マウスへ移植した脂肪組織が定着しなかった。したがって、代用として汎用されている下肢虚血モデルマウスを作製し使用した。

(1) PRP の作製

8 週齢の Lewis ラット(雄)を日本 SLC から購入し使用した。

EDTA が添加された採血管チューブに4匹のラットから心臓穿刺して採血する。集めた血液を 450 ×g で 7 分間遠心分離する。Buffy coat を含んだ上清を 1 つのチューブに集め、1,600 ×g で 5 分間遠心分離にかける。沈殿した血小板ペレットを含んだ 1.0mL 血漿を PRP とした。上記とは別に、抗凝固などを含まないチューブ内で 30 分間室温で静置した血液 1.0mL を 2,000 ×g で 8 分間遠心分離した上清を自家トロンピンとする。0.5M CaCl₂ と自家トロンピンを 1:1 の体積比で事前に混和したものをアクティベーターとし、PRP とアクティベーターを 10:1 の体積比で混ぜ、室温にて 10 分間静置し活性化させる。活性化 PRP は各 10 分間ずつ 90 ×g と 9,000 ×g で遠心分離にかけ、使用するまで -40 °C で保管する。

(2) ADSC の作製

PRP と同様 Lewis ラットを用いる。鼠径部から脂肪組織を採取し、それらを細断し、1mg/mL のタイプ コラゲナーゼを添加後に 37 °C で 1 時間振盪して消化させる。100 μL フィルターを用いて濾過し、1,500rpm で 5 分間遠心分離して脂肪細胞を除去すると ADSC が得られる。ADSC は 20% FCS が添加された DMEM を培地とした 10cm dish 内で培養される。継代を繰り返して P3 の細胞を使用する。

(3) 細胞数計測による細胞増殖度の検討

ADSCs を 5.0×10^4 cells/mL に希釈して 24-well プレートに播種、一晩静置した後に 4 つの異なる培地(血清を含まない DMEM, 1%PRP 含有 DMEM, 5%PRP 含有 DMEM, 10%PRP 含有 DMEM) に交換しセルカウンターを用いた細胞数計測で細胞増殖の程度を時系列を追って検討した。

(4) MTT assay による細胞増殖度の検討

1.0×10^4 cells/well 100 μ L の ADSCs を 96well plate に播種した。その 4 時間後に培地交換して試薬を添加し、1 日目と 3 日目の吸光度測定を行う。

(5) Cell scratch assay

ADSCs を 1×10^5 cells/well に希釈して培地を 10%FCS として培養し、翌日に各群の培地に交換する。24h 後に dish の中心部を擦過し一定時間経過したものをトリパンブルー染色して細胞の増殖の程度や迷入の様子を観察する。

(6) 培養液中の成長因子タンパク測定

RT-PCR および real time PCR を用いて各種タンパク (VEGF, HGF, FGF, HIF) の発現量を調べた。

(7) 下肢虚血モデルマウスへの PRP および ADSCs の局所投与

BALB/c-nu/nu マウス (8 週齢, 雄, 日本 SLC, 東京) を用いた。ケタミン (80mg/kg, 三共, 日本), キシラジン (5mg/kg, バイエル, 東京) の混合溶液 0.2mL を腹腔内投与し, 全身麻酔および鎮痛処置を施す。その後右後肢の大腿動脈を 8-0 絹糸で 2 箇所結紮し, その間を切断する。

Control (PBS 投与) 群 (n=5), activated PRP 単独投与群 (n=3), ADSC 単独投与群 (n=3), PRP+ADSC 併用投与群 (n=3) を作製する。ADSC は PBS40uL で希釈して使用し, ADSCs 濃度は 1.0×10^6 cells/40uL とし, 10uL ずつを大腿内転筋の 4 箇所に筋肉内注射する。

(8) マウス下肢の血流評価

以下のプロトコールに準じて, レーザードップラー血流計 (Laser Doppler Perfusion Imager system, Periscan, Sweden) を用いた血流評価を行なった。

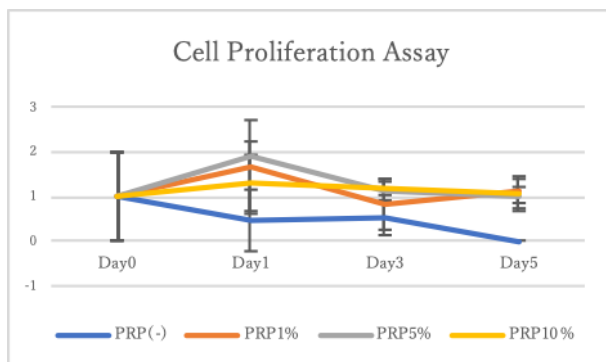
1 週間ごとに LDP での血流評価を行い, 術後 1 日目, 7 日目, 14 日目, 21 日目, 28 日目でのデータを各群にて比較した。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖度の検討

1 日目では 5%PRP 添加群において有意に細胞増殖を来したが, 3 日目, 5 日目にかけて差はほとんどなくなった。

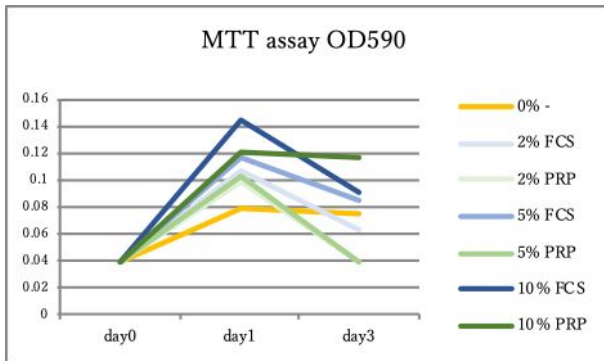
図 1



(2) MTT assay

結果的に 10%FCS 群と比較して 10%PRP 群で有意に吸光度が高くなった。

図 2



(3) Cell scratch assay

細胞の局在性は確認できたが、図 4 のグラフに示すように細胞密度は 5%FCS 群と比較して差が出ない結果となった。

図 3 (左上：コントロール群，右上：5%PRP 添加群，左下： 5%FCS 添加群)

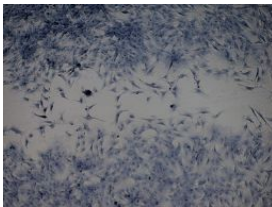
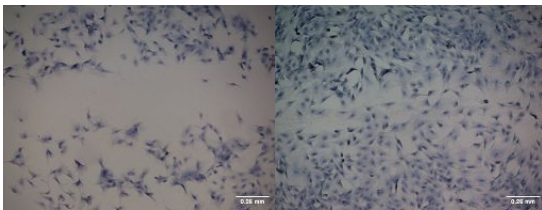
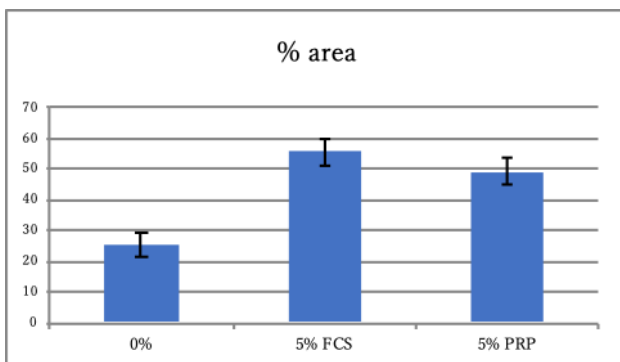


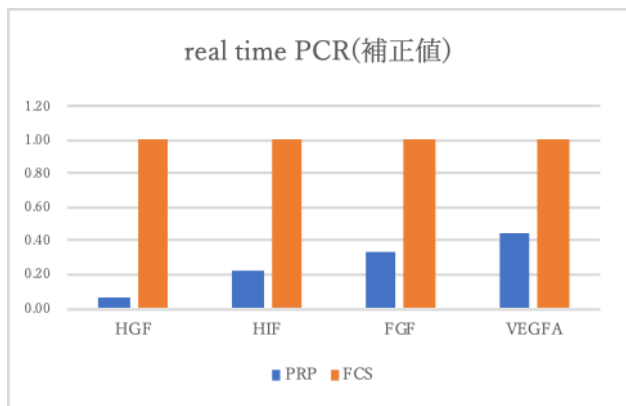
図 4



(4) 培養上清中の VEGF, HGF, FGF, HIF 測定

RT-PCR にて全てのマーカーでバンドの発現を認めた。一方で Real time PCR ではコントロール群と比較して成長因子マーカーの発現量が少ない結果となった。

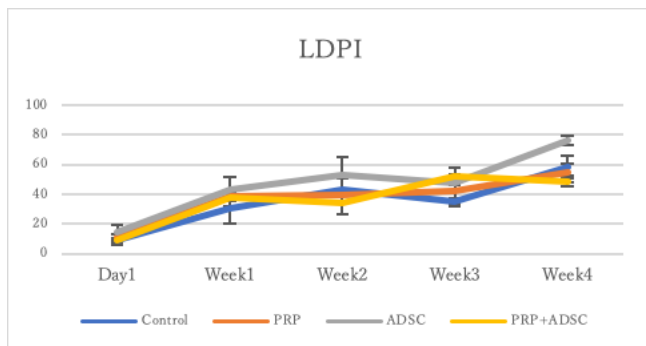
図 5



(5)レーザードップラー血流計による下肢血流回復度の検討

投与から4週間後までの追跡を行った.3週目で有意差はないもののPRP+ADSC併用投与群における血流回復を認めたが,最終的には我々の当初の予想と反して,ADSCとPRPの併用投与よりもADSC単独投与にて顕著に血流改善を認めることが分かった.

図 6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Yamamoto K, Kurata Y, Inoue Y, Adachi M, Tsuneto M, Miake J, Ogino K, Ninomiya H, Yoshida A, Shirayoshi Y, Suyama Y, Yagi S, Nishimura M, Yamamoto K, Hisatome I., Pretreatment with an angiotensin II receptor blocker abolished ameliorating actions of adipose-derived stem cell sheets on cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction., Regen Ther., 査読有, Vol.19, 2018, 79-88.
DOI: 10.1016/j.reth.2018.08.005. eCollection 2018 Dec.
2. Morishita T, Toriyama K, Takanari K, Yagi S, Ebisawa K, Hishida M, Narita Y, Osaga S, Nishida Y, Kamei Y., Effect of postoperative doxorubicin administration on ischemic wound healing., Nagoya J Med Sci., 査読有, Vol.80, 2018, 357-366.
DOI: 10.18999/nagjms.80.3.357.
3. Yagi S, Suyama Y, Yamaga K, Morita M, Fukuoka K., Use of Fat Grafts for Stabilizing Microvascular Pedicle Geometry in Lower Limb Reconstruction., Plast Reconstr Surg Glob Open., 査読有, Vol.13, 2018, e1799.
DOI:10.1097/GOX.0000000000001799. eCollection 2018 Jul. No abstract available.
4. 野津智美, 櫻木哲詩, 陶山淑子, 八木俊路朗, 久留一郎., フコイダン前投与により誘導さ

れる虚血肢の血管新生作用に関する研究., 米子医学雑誌, 査読有, Vol.69, 2018, 16-24.
DOI:なし.

5. Shunjiro Yagi, Yoshiko Suyama, Kohei Fukuoka, Maki Morita, Miki Kambe, Kazuhiro Toriyama, Yuzuru Kamei., Analysis of Fat Grafts for Stabilizing Microvascular Pedicle Geometry in Head and Neck Reconstruction., Journal of Reconstructive Microsurgery Open, 査読有, Vol. 2, 2017, e140-e144.

DOI: 10.1055/s-0037-1608671.

6. 陶山 淑子, 福岡 晃平, 森川 久未, 久留 一郎, 八木 俊路朗.,【脂肪注入移植を用いた乳房再建術】自己皮下脂肪由来幹細胞移植による乳房再建.,形成外科,査読有,Vol.59, 2016, 486-495.

DOI: なし

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 陶山 淑子,非培養皮下脂肪由来再生幹細胞(ADSCs)を用いた乳癌術後乳房変形に対する乳房再建の臨床試験,第18回日本再生医療学会総会,2019年.
2. 陶山 淑子,自己皮下脂肪組織由来幹細胞(ADSC)による乳房再建術の長期経過,第18回日本再生医療学会総会,2019年
3. 八木 俊路朗,遊離腓骨皮弁を用いた下顎再建において皮弁採取側を考慮することの重要性,第36回日本頭蓋顎顔面外科学会,2018年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:福岡 晃平

ローマ字氏名:FUKUOKA, kohei

所属研究機関名:鳥取大学

部局名:医学部附属病院

職名:医員

研究者番号(8桁):40548781

研究分担者氏名:久留 一郎

ローマ字氏名:HISATOME, ichiro

所属研究機関名:鳥取大学

部局名:医学系研究科

職名:教授

研究者番号(8桁):60211504

研究分担者氏名:陶山 淑子

ローマ字氏名:SUYAMA, yoshiko

所属研究機関名:鳥取大学

部局名:医学部附属病院

職名:医員

研究者番号(8桁):90448192

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。