

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890251

研究課題名（和文） 放射線性難治性潰瘍に対する脂肪組織由来幹細胞の効果

研究課題名（英文） Effects of Adipose tissue derived stem cells on chronic radiation ulcer

研究代表者

横山 茂和 (YOKOYAMA SHIGEKAZU)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10454761

研究成果の概要：

放射線は検査や治療などで現在の医療において必要不可欠なものであるが、同時に難治性潰瘍や創傷治癒遅延を引き起こすことがある。放射線照射による創傷治癒遅延の根底には、未分化な細胞ほど放射線感受性が高いことから、創傷治癒に深く関わる細胞である幹細胞が局所で放射線によって障害を受けていることがあると考えられる。よって放射線照射後の創部へ、脂肪組織由来幹細胞移植を行い創傷治癒が改善されるかを調査した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：移植・再生医療、外科、放射線

## 1. 研究開始当初の背景

現在、放射線医療は腫瘍に対する照射や虚血性心疾患に対するカテーテル治療など医療の現場において欠くことのできないものとなっている。しかしながら、これら放射線照射後、高線量被曝から患者の皮膚・皮下組織などに晩期障害として潰瘍・瘻孔などの難治性潰瘍が発生し、形成外科へ紹介されてくることも少なくない。そのような場合、デブリードマン、各種軟膏や創傷被覆剤、更には植皮や筋皮弁などの各種形成外科的療法を組み合わせ治療を行うが、放射線療法施行後の創部はデブリードマンを行い十分良好

な出血を確認しても、その後の肉芽形成や癒着等の創傷治癒が起りにくく、治療に難渋することが多い。創傷治癒は結合組織形成、細胞活性、成長因子の活性化等が相互に影響を及ぼしており、様々な細胞が関与している。放射線照射による創傷治癒遅延の根底には、未分化な細胞ほど放射線感受性が高いことから、創傷治癒に深く関わる細胞である幹細胞が局所で放射線によって障害を受けていることがあると考えられる。

近年、難治性潰瘍に対して骨髓細胞を導入し細胞再生系を賦活化したり、術前放射線による術後創傷治癒延に対して小腸粘膜下組

織を用いて、TGF $\beta$ ・FGF2等サイトカインを創傷部で発現させ、放射線による難治性潰瘍の治療を改善しようとする研究が報告されている。私は幹細胞の中でも特に脂肪組織由来幹細胞に着目した。これは、骨髄細胞等に比べ採取量も多くとれること、また幹細胞同士でも由来する組織により性質が異なることから、放射線潰瘍となる際に問題となる脂肪組織には脂肪組織由来のものが良いのではないかと考えたためである。

## 2. 研究の目的

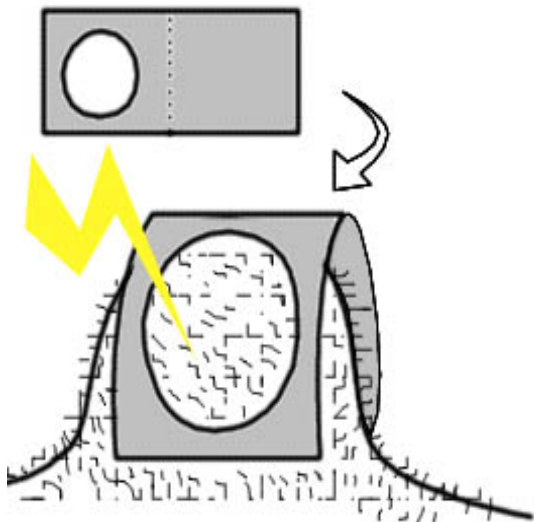
本研究は、難治性放射線潰瘍における脂肪組織由来幹細胞の有用性を、その治癒期間、経時的組織変化所見に基づき評価し、立証するものである。具体的には放射線性潰瘍作成・幹細胞移植後、肉眼的所見の観察を行うとともに免疫染色法にてFGFやVEGFといった創傷治癒に関わる蛋白発現について観察を行う。

さらに幹細胞移植後の創傷に関して、各種ドレッシング材、植皮、皮弁等を用いて、実際の臨床現場と同じ処置モデル作成し、各モデルにおいて治癒期間の評価や経時的な肉眼的・組織学的観察を行い、幹細胞導入がもたらす効果を評価し臨床応用を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1)放射線潰瘍モデルの作成

Wistar ratを用いて、放射線照射を行う。ペントバルビタール麻酔後、厚さ2mm鉛板3枚で他部位への照射を防御し、左右対称に背部2カ所へ、 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ で照射する。照射部の鉛板は折り返し片面のみに穴を開け、これを用いてクリップの要領で皮膚を摘み上げ、この穴より放射線を照射する(図1)。



(図1)

1ヶ月後脱毛した部分の中心に径1cmの全層欠損を作成する。左右対称に同サイズの潰瘍を形成することで、皮膚の血管分布状態や

下床となる皮下組織の組成・状態を同じにすることができる。また放射線は皮膚・皮下組織のみに当たるため、その他の深部臓器への影響による治癒評価の歪みが避けられると考える。

### (2)脂肪由来幹細胞の作成

ラット皮下脂肪組織より幹細胞を採取する。ペントバルビタールにより安楽死させたラットより鼠径部の皮切から皮下脂肪組織を摘出する。脂肪組織を細切し、Hanks液にて洗浄する。これをCollagenase type II 2mg/ml+5%ウシ血清アルブミン溶液にて、37°Cで5分毎に振盪しながら45分間培養する。次に径 $250 \mu\text{m}$ のナイロンメッシュにて濾過し、残渣を除去する。 $250\text{g} \times 2$ 分間で遠心し、上清を捨てることで成熟した脂肪細胞を除去する。沈殿物をHanks液にて再度懸濁し、径 $25 \mu\text{m}$ のナイロンメッシュにて2回濾過を行う。赤血球を除去するため、erythrocyte lysis bufferにて濾過液を37°Cで5分間培養し、 $250\text{g} \times 10$ 分間遠心を行う。その後沈殿物をHanks液にて洗浄し、再度 $250\text{g} \times 10$ 分間遠心を行う。この沈殿物を培養液(DMEM+10%FBS+1%抗生剤/抗真菌剤)にて懸濁し脂肪由来幹細胞を得る。細胞数をカウントし、 $1.5 \times 10^6$ 個の細胞をT75フラスコにて37°C、5%CO<sub>2</sub>で培養する。

### (3)移植する細胞数の条件検討

まず、移植する幹細胞数の至適細胞数を確定するため条件検討を行う。(2)で作成した幹細胞をDiIにて染色し、(1)で作成した放射線潰瘍部分のうち片側へ注射する。放射線潰瘍ラットは15匹用意し、3匹ずつの5群に分け、各群に間質細胞を、 $1 \times 10^7, 5 \times 10^6, 1 \times 10^6, 5 \times 10^5, 1 \times 10^5, 0/\text{cm}^2$ 注射する。対側には同量の生理食塩水とする。移植後4週間創部を肉眼的に観察及びデジタルカメラにて記録し、Image Jソフトウェアにて創の大きさを計測、移植細胞数による創傷治癒過程の差を観察する

### (4)幹細胞の放射線潰瘍部分への移植および創傷治癒過程の観察

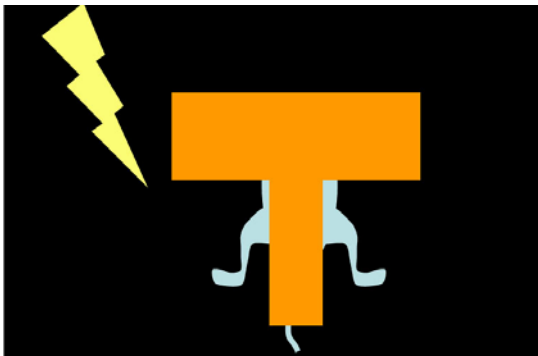
上記(3)にて確定した至適数の幹細胞を放射線潰瘍部に移植し、創部の経時変化を観察する。放射線潰瘍ラットは21匹用意し、3匹ずつの7群に分ける。それぞれ間質細胞移植後0,1,3,7,14,28,60日で創部をデジタルカメラにて記録、コンピュータ上で画像処理し、創の収縮や上皮化について解析する。その後組織を回収・4%ホルマリン固定し、パラフィン包埋、組織切片を作成する。まずHE染色にて組織学的変化を観察する。次に共焦点レーザー顕微鏡にてDiIをトレースしつつ、免疫染色法にてvon-Willebrand

Factor, VEGF, PDGF, TGF  $\beta$ , bFGF,  $\alpha$  SMA, フィブロネクチンといった創傷治癒に関わる蛋白について観察する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 放射線潰瘍モデルの作成

初め rat を用いて上記モデルの作成を試みた。しかしながら皮膚をつまみ上げる際に、皮膚の進展度が恒常的ではないため、定量性のあるモデルを作成できなかった。つぎにモデル動物を C57BL6 マウスに変更し、背部皮膚を皮弁状に挙上し、皮弁以外を鉛板にて遮蔽し放射線照射を行うモデルを考案した。しかし本法では放射線照射量によって皮弁が炎症、全壊死を起したり、逆に炎症後すぐに治癒してしまうなどして、観察に適したある程度の期間にわたり定量性のある難治性潰瘍を作成することが困難であった。このため両下肢以外を鉛板で覆って放射線照射を行い、その後一ヶ月後に両側大腿皮膚にデルマパンチで同じ大きさの皮膚欠損を作成し幹細胞を移植する、というモデルを考案した (図 2、3)。



(図 2)



(図 3)

放射線照射量の検討として 10Gy, 30Gy, 50Gy に分けて照射したものについて調査した。30Gy, 50Gy では下肢全体が萎縮してきた。10Gy では創傷治癒遅延が確認されたため本法での至適照射量を 10-20Gy とした。

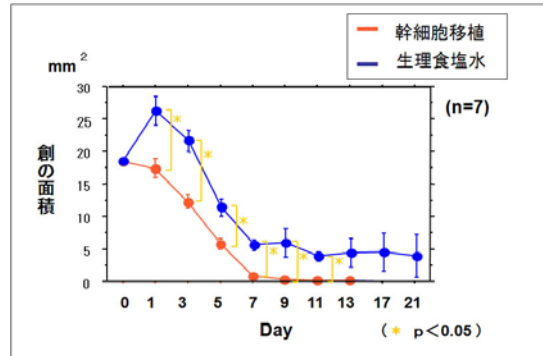
本モデルでは、重要臓器は遮蔽されているため、長期生命予後には大きな影響を与えず、さらに当初考案したモデルと比べると皮下

の筋肉組織や骨髄などには放射線が当たるため、より実際の臨床に近いモデルとなったと考えられる。

##### 2) 幹細胞の放射線潰瘍部分への移植および創傷治癒過程の観察

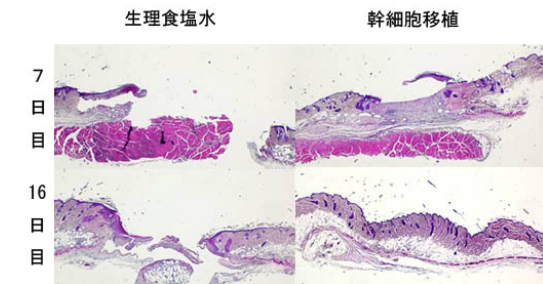
脂肪組織由来幹細胞の採取は予定通り行い、Pilot Study および文献的考察より至適細胞移植量を  $1 \times 10^6$  個とした。

DiI ラベルした幹細胞を、放射線性潰瘍部に移植し、まず肉眼的観察を行った。その結果、細胞移植した側において創収縮が早く、移植後 9-13 日で上皮化が終了した (図 4)。



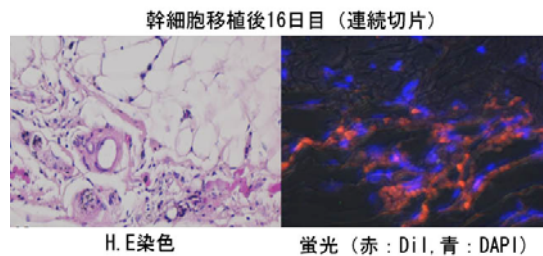
(図 4)

組織学的にも、HE 染色にて細胞移植側において創治癒傾向が顕著であり、移植後 7 日目にて創はほぼ上皮科していた。16 日目の時点では、生理食塩水を注入した創はまだ癒痕組織がはっきり見て取れるのに対し、幹細胞移植を行った創部では癒痕組織はわずかで、より成熟した創部となっていた (図 5)。



(図 5)

幹細胞の生着は共焦点顕微鏡を用いてラベルした DiI を確認することで行った (図 6)。



H. E 染色

蛍光 (赤: DiI, 青: DAPI)

(図 6)

また、免疫組織染色を行ったところ、細胞移植側ではコントロール側と比べ、TGF $\beta$ 、VEGF、FGF2、IL-6の発現のピークが早期にあり、細胞移植群でより早く創治癒する傾向があるように思われた。

当初予定していた各種ドレッシング材、植皮、皮弁等を用いた実際の臨床現場と同じ処置モデルに関しては、基となる放射線潰瘍モデルの作成に手間取ったこともあり今後検討が必要である。

安全性などのさらなる検討が必要であるが、本研究により放射線照射により引き起こされる創傷治癒障害に対し、脂肪組織由来間質細胞移植の有用性が示唆された。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 妻野知子 横山茂和 河合建一郎 西本聡 福田健児 小島正裕 蔭山晶子 藤田和敏 柳井亜矢子 垣淵正男  
マウスを用いた難治性放射線潰瘍モデル作成に関する検討  
第17回日本形成外科学会基礎学術集会  
2008年10月2日  
東京

(2) 妻野知子 横山茂和 河合建一郎 西本聡 福田健児 小島正裕 蔭山晶子 藤田和敏 柳井亜矢子 垣淵正男  
放射線潰瘍に対する脂肪組織間質細胞の有用性の検討  
第17回日本形成外科学会基礎学術集会  
2008年10月2日  
東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横山 茂和 (YOKOYAMA SHIGEKAZU)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10454761

### (2) 研究協力者

妻野 知子 (TUMANO TOMOKO)  
兵庫医科大学・医学部・病院助手  
研究者番号：90449877  
河合 建一郎 (KAWAI KENICHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80428177