

平成22年5月28日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2008～2009  
 課題番号： 20791318  
 研究課題名 (和文) regenerative flap 開発

研究課題名 (英文) The development of regenerative flaps.

## 研究代表者

木下 幹雄 (KINOSHITA MIKIO)  
 杏林大学・医学部・助教  
 研究者番号：50422308

## 研究成果の概要 (和文)：

自家培養脂肪幹細胞を様々なモデルに移植して、移植床の最適条件を検証した。2008年度は、幹細胞を移植するモデルとしてマウスの背部に皮膚観察装置 (skin chamber) の作成を行った。2009年度の研究ではラットから脂肪を採取し、脂肪幹細胞の培養の標準化を行った。次に培養し免疫染色を行った脂肪幹細胞を元の個体へ戻し、注入局所へ定着することを確認した。循環不全のモデルとして、背部全体の広さで、一本の動静脈を茎とした有茎皮弁を作成した。このモデルへ幹細胞移植を行ったマウスでは皮弁生着範囲が明らかに拡大した。脂肪幹細胞は皮弁の循環不全を改善し生着範囲を拡大させることが確認された。

## 研究成果の概要 (英文)：

We tried to transplant the cultured adiposal stem cells (ASCs) into the various types of ischemic models, and evaluated the optimum conditions of wound bed for transplantation. In 2008, we created a skin chamber system in the back of mouse as a model for ASC transplantation. In 2009, we standardized the technique for the culture of the ASCs which had harvested from the groin region of the Wistar rat. Next, the cultured ASCs were immunostained and were injected to the back of originated mouse. By using the fluorescent microscope, we could confirm that the ASCs were colonized at the injected region. As a ischemic model, we made a single pedicle flap by the area of all dorsal surface in the back of Wistar Rat. The flaps which had injected ASCs showed apparently more expanded survival area than non-injected control models. We confirmed that ASCs could improve the circulation of the ischemic tissues and expand the survival area of the ischemic flaps.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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： 脂肪幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

近年、骨髄幹細胞や間葉系幹細胞を用いた再生医療の研究が目ざましい発展をとげ、臨床応用され始めている。これらの再生医療においては、幹細胞を選択的に、組織内へ局所注射し組織内へ生着をはかるものが多い。細胞をどのレベルまで分化させて、どのような条件で移植するかという研究は多く行われているが、移植する母床の研究はほとんどない。再生医療において骨髄幹細胞が臨床応用される場合には、移植床は機能不全状態に陥っている場合が多い。これは移植床を純粋に細胞移植する母床として考えた場合には、細胞が生着する条件としては至適とはいえない。

また、臨床的には人工真皮へ骨髄幹細胞を浸透し、難治性潰瘍へ貼付することで創傷治癒を促進する手技が報告されているが、血流不良な組織への当手技の応用は効果不十分であると考えられる。

### 2. 研究の目的

- (1) 研究に必要な虚血モデルを作成し、幹細胞移植における移植母床の最適な条件をみつける。
- (2) 虚血モデルに対する脂肪幹細胞移植が組織に与える影響を確認する。
- (3) 遊離複合組織皮弁へ脂肪幹細胞を導入し、組織再生を促す皮弁を作成する。

### 3. 研究の方法

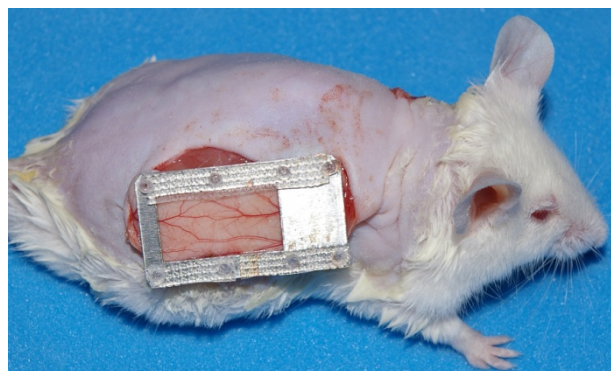
- (1) 移植母床を観察するモデルとしてマウスの背部に筋膜上の皮弁を挙上し、周囲を枠組みで囲うことで、皮膚観察装置 (skin

chamber) の作成を行う。

- (2) ラットより脂肪採取および脂肪幹細胞の抽出をおこない、培養の標準化を行う。
- (3) 培養脂肪幹細胞を免疫染色し、元の個体へ注入して戻し、局所へ定着することを確認する。
- (4) 循環不全のモデルとして皮下茎を一本のみ有する有茎皮弁をラットの背面全体に作成し、ここへ培養脂肪幹細胞を注入して幹細胞が組織へ与える影響を観察した。

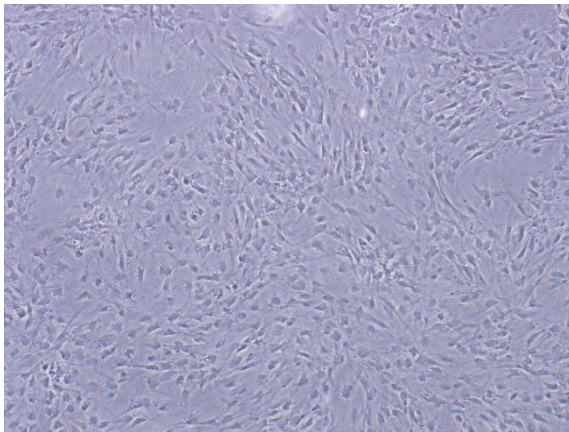
### 4. 研究成果

- (1) マウスの背部に筋膜上の皮弁を作成し、周囲を枠組みで囲うことにより皮膚観察装置 (skin chamber) を作成した。この skin chamber により皮弁内を走行する血管を肉眼的に直接観察することが可能となった。また、この皮弁に幹細胞を移植することにより血管新生の相違や血流の評価などを可視化することが可能となった。

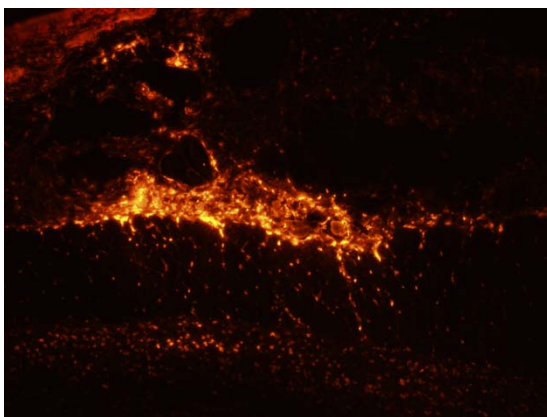


- (2) ウィスターラットからの脂肪採取および脂肪幹細胞の抽出、ならびに幹細胞の培養の標準化を行った。ラットの両側鼠径部から

脂肪組織の採取を行い、剪刀を用いて小片に裁断する。コラゲナーゼを約 30 分間反応させたのち遠心分離を行い、沈殿成分より脂肪幹細胞を採取する。採取した脂肪幹細胞は DMEM 培地を用いて 2 週間培養を行うことにより 300 万~500 万個の脂肪幹細胞を得ることに成功した。

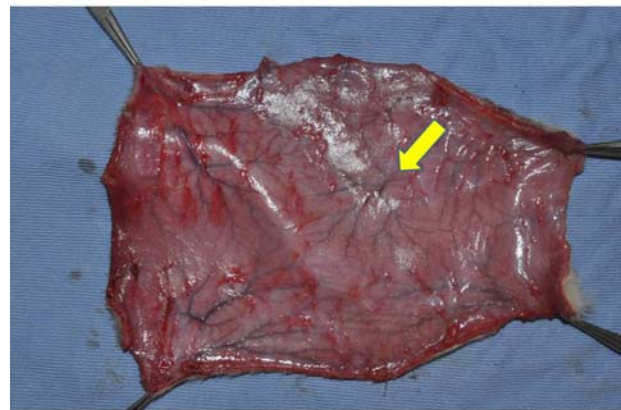


(3) 培養した脂肪幹細胞を元の個体へ戻した際に、移植細胞が局所へとどまるかを確認するため、事前に免疫染色を行った脂肪幹細胞を背部へ注入し、1 週間後に組織を採取して蛍光顕微鏡下に確認を行った。その結果、大部分の細胞が注入した局所へ定着していることが確認された。

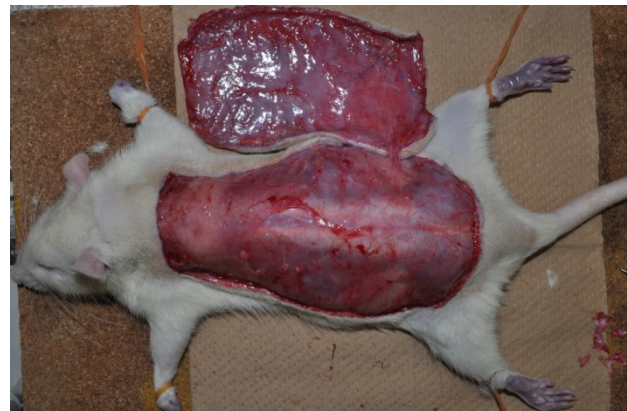


(4) さらに培養脂肪幹細胞をラットの背部皮下へ局所注射した後、一週間後に筋膜上で皮膚を剥離し、血管新生の状態を肉眼的に確認した。幹細胞を局所注射した部位に明らか

な血管の増生を認める所見が得られた。



な血管の増生を認める所見が得られた。弁を背部全体の広さで挙上した。通常、このモデルでは茎より半径 2 cm 程度の範囲のみが生着するが、皮弁内へ脂肪幹細胞移植を行ったマウスでは皮弁生着範囲が明らかに拡大した。



右腰部の皮下動静脈を茎とした皮弁の挙上



対象モデルの生着範囲：血管茎周囲のみが生着している





幹細胞注射後 2 週間：皮弁生着範囲が拡大している

つまり脂肪幹細胞は循環不全を起こした組織へ血管新生を促し、局所の血流を改善して皮弁生着範囲を拡大させることが確認された。

#### 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 幹雄 (KINOSHITA MIKIO)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：50422308