

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791724

研究課題名（和文） 脂肪幹細胞を用いた血管付人工脂肪弁の開発

研究課題名（英文） Development of vascularized artificial fat flap using
adipose-derived stem cells

研究代表者

濱本 有祐 (HAMAMOTO YUSUKE)

香川大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：10380180

研究成果の概要（和文）：

Tissue engineering chamber（以下、TEC）内に導入した、人工真皮、動静脈血管束と遊離脂肪、または血管柄付き脂肪弁に対して、脂肪由来幹細胞（以下ASCs）を播種することで得られる効果を検討した。遊離脂肪と動静脈血管束を用いた実験1ではControl群、ASCs群の2群、血管柄付き脂肪を用いた実験2ではControl群、ASCs群で実験を行った。再生組織量を比較し、ASCsは1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate（以下DiI）を用いて追跡を行った。結果：実験1での血管付軟組織の再生組織量はControl群 $2.12 \pm 0.48 \text{ cm}^3$ 、ASCs群 $2.20 \pm 0.094 \text{ cm}^3$ 。実験2ではControl群 $1.30 \pm 0.19 \text{ cm}^3$ 、ASCs群 $1.36 \pm 0.22 \text{ cm}^3$ で、どちらの実験でも有意差が認められなかった($p > 0.05$)。また、DiIを用いたASCsの追跡ではTEC内の再生軟組織内にDiI標識細胞は認められなかった。このことよりTEC内ではASCsは早期に壊死していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The effects of adipose-derived stem cells (ASCs) seeded on artificial dermis, arteriovenous vascular bundles with free fat, and a vascularized fat flap placed in a tissue engineering chamber (TEC) were investigated. The samples were divided into control and ASCs groups in Experiment 1 with free fat and arteriovenous vascular bundles, and Experiment 2 with vascularized fat. The amount of regenerated tissue was evaluated, and ASCs were traced using 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI).

Results: The regenerated vascularized soft tissue volumes were 2.12 ± 0.48 and $2.20 \pm 0.094 \text{ cm}^3$ in the control and ASCs groups in Experiment 1, respectively, and 1.30 ± 0.19 and $1.36 \pm 0.22 \text{ cm}^3$ in Experiment 2, respectively, showing no significant difference in either experiment ($p > 0.05$). No significant difference was also noted on

histopathological examination. Moreover, no DiI-labeled cell was observed in the regenerated soft tissue in TEC. These findings suggest that ASCs were necrotized early in TEC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：形成外科学

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：脂肪由来幹細胞、人工脂肪弁、細胞外マトリックス、再生組織

1. 研究開始当初の背景

顕微鏡下手術の発展に伴い、外傷や悪性腫瘍切除後の再建手術として様々な遊離皮弁が開発されてきた。いわゆる臓器移植を除き、基本的に自家組織の犠牲を必要としている。この問題を解決する方法として、再生医療(tissue engineering)が注目され、骨・軟骨・皮膚・筋肉・血管の再構築を目的とする研究が積極的に行われている。しかしながら、独自の栄養血管を有する再生組織(器官: organoid)の報告はまだ見られない。これは組織と血管の再構築を同時に行うという技術的に困難な問題がまだ解決されていないからである。実際の臨床においては栄養血管を有する組織移植が再建の主流となっていることを考えると、血管が組み込まれた組織の再構築が望まれる。我々は人工的に栄養血管を有する組織を再生する方法として、TEC内に既存のvascular carrierを導入し、細胞外マトリックス(人工真皮)と細胞(in vivo)とを併用して作成する方法が現在のところ最も実用的と考え研究を行ってきた。これまでの実験的研究からTECがvascular carrierからの血管新生と移植細胞や組織の増殖・分化に促進的に働くことが示された。このchamberの特徴を利用してわれわれは人工皮弁を、共同研究者のWA Morrisonらは血管付脂肪弁、血管付腓島組織、血管付心筋組織、血管付下垂体組織を作成し報告した。この栄養血管を有する組織の再生はわれわれと Prof. Wayne A Morrison(O'Brien

Institute of Microsurgery, Melbourne University)らの報告が文献的にみられるだけの独創的で先進的な研究である。Dolderer JHらは浅下腹壁動静脈を血管茎とする脂肪組織(脂肪弁)を大きな多孔質chamberに入れて皮下に6週間埋入しておいたところ体積比で12.5倍の大きさの脂肪弁が形成されたと報告している。また脂肪幹細胞(ASCs)は脂肪・骨・軟骨・神経等への分化能を持ち、簡便に多量に得られる幹細胞として注目されている。今回われわれは実験動物にウサギを用い、support cellにASCsを併用して、臨床応用を目的とした人工脂肪弁を開発することを目標としている。

2. 研究の目的

Chamber内に作製した脂肪弁へ、脂肪由来幹細胞が与える影響について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

実験動物には2.5~3kgのJapan White系の雄ウサギを用いる。

(2) 脂肪由来幹細胞の抽出

ウサギ肩甲間脂肪を1×1mmの碎片とし、PBS+コラゲナーゼにて35分間処理を行う。260Gにて5分遠心分離し、脂肪幹細胞を抽出する。10%FBSを加えたDMEMにて脂肪由来幹細胞を培養し、3継代行う。

(3) コラーゲンスポンジへの脂肪幹細胞播種

TECあたり 1.0×10^8 個の細胞を 1ml の PBS とともにコラーゲンスポンジに播種し、TEC 内に導入する。

(4)

1, 1'-Diocadecyl-3, 3', 3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (DiI) による ASCs の標識

DiI を添加した PBS に播種前の ASCs を浮遊させ、氷上にて 5 分間静置する。PBS にて希釈後、260G にて 5 分間遠心分離し細胞を回収する。

(5) 人工脂肪弁の作製

chamber 内に浅大腿動静脈 + 2 cm^3 の遊離脂肪、または浅腹壁動静脈に 1 cm^3 の脂肪を付着させた AV bundle を導入し、コラーゲンスポンジを併用して人工脂肪弁を作製する。

① 遊離脂肪を用いた人工脂肪弁の作製

ウサギの浅大腿動静脈を血管柄として採取し、TEC 内に 2 cm^3 の遊離脂肪とともに導入する。

実験は $n=5$ で行う。

Control group : 浅大腿動静脈 + 遊離脂肪 + コラーゲンスポンジ

Experimental group : 浅大腿動静脈 + 遊離脂肪 + コラーゲンスポンジ + ASCs

② 血管柄付き脂肪弁を用いた人工脂肪弁の作製

ウサギの腹壁を栄養する、浅腹壁動静脈に 1 cc の脂肪を付着させた AV bundle を TEC 内に導入する。

実験は $n=5$ で行う。

Control group : 脂肪弁 + コラーゲンスポンジ

Experimental group : 脂肪弁 + コラーゲンスポンジ + ASCs

(6) 評価

4 週間後に TEC を露出して増殖した組織の組織標本作製し、再生組織の細胞構築を解析する。組織染色は 10%ホルマリンにて 3 日間固定後、HE 染色を行う。

再生組織から AV bundle の直角方向に沿った 3mm の厚さの切片を得て、各切片における $10 \mu\text{m}$ の標本組織を作成する。この各標本の再生組織の面積を MCIDE-3B イメージ形成装置で測定し、Planimetry 法で体積を求める。統計学的処理は independent Student t test で行い、 $P < 0.05$ をもって有意差ありと判定する。

ホルマリン固定を行った組織で凍結切片を作製し、標識された ASCs の追跡を行った。

4. 研究成果

(1) 遊離脂肪を用いた人工脂肪弁

① 皮弁体積に与える影響

Control group $2.12 \pm 0.48 \text{ cm}^3$

Experimental group $2.20 \pm 0.094 \text{ cm}^3$

有意差なし

② 病理組織像

Control group (Fig. 1)、Experimental group (Fig. 2) とも同様の脂肪壊死像を認め、壊死範囲にも差が見られなかった。

③ DiI 標識 ASCs の分布

DiI 標識 ASCs は Experimental group 組織内に認められなかった。

(2) 血管柄付き脂肪弁を用いた人工脂肪弁

① 皮弁体積に与える影響

Control group $1.30 \pm 0.19 \text{ cm}^3$

Experimental group $1.36 \pm 0.22 \text{ cm}^3$

有意差なし

② 病理組織像

Control group (Fig. 3)、Experimental group (Fig. 4) とも脂肪壊死像はほとんど認められなかった。新生組織の量には壊死範囲にも有意差が見られなかった。

③ DiI 標識 ASCs の分布

DiI 標識 ASCs は Experimental group 組織内に認められなかった。

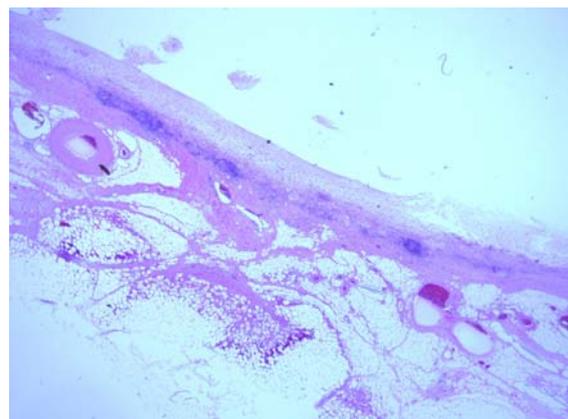


Fig. 1 Control group

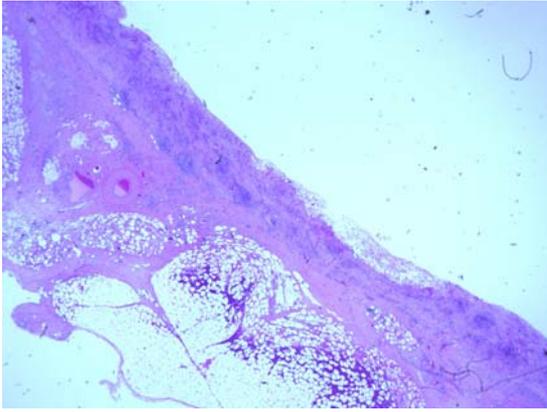


Fig.2 Experimental group

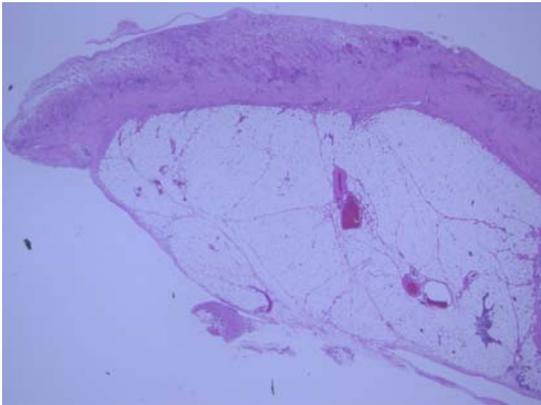


Fig3 Control group

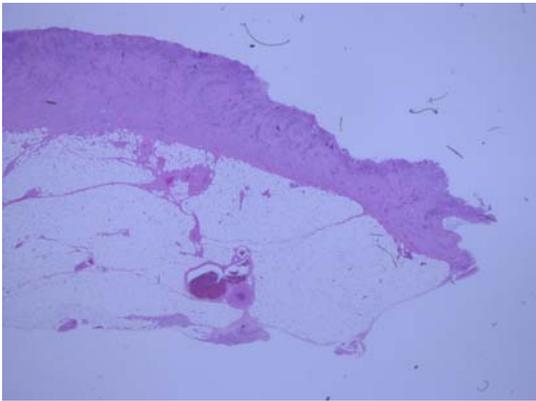


Fig.4 Experimental group

(3) 考察

上記の結果より TEC 内に導入した ASCs には移植した脂肪組織の生着率や組織量を向上させる影響は認められなかった。DiI 標識された ASCs が組織内に認められなかったことから、通常の TEC 内環境では ASCs は早期に壊死することが示唆された。

TEC 内で移植組織を生着させ、将来的には器官形成 (=人工臓器) させるためには、培養

細胞の生着率を上げることが必要である。今後 ASCs 壊死原因の究明、飼育環境の変更、成長因子添加、移植細胞の耐性獲得などの検討を行う。

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 1 件)

第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会

「Tissue engineering chamber 内の脂肪弁に与える脂肪由来幹細胞の影響」

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱本 有祐 (HAMAMOTO YUSUKE)

香川大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号: 10380180