

平成 26 年 4 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659783

研究課題名(和文) 移植皮弁知覚の向上を目指してー脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた研究ー

研究課題名(英文) Differentiated adipose-derived stem cells promote reinnervation of rat skin flaps

研究代表者

富田 興一 (Tomita, Koichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90423178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：シュワン細胞(SC)の皮弁内移植に着目し、脂肪幹細胞(ASC)より分化誘導したSC様細胞(dASC)の皮弁知覚向上効果を検討した。ラット鼠径皮弁を挙上、GFPラットより得た各細胞を移植、再縫着した。20週後、皮弁遠位・中心部の神経密度を評価した。移植後各細胞は約2週間の生存を認めた。遠位部ではdASCとSC移植による有意な神経密度増加を認め、その程度は非知覚皮弁でより顕著であった。一方、ASC移植は神経密度に有意な影響を与えなかった。中心部では何れの細胞移植も神経密度に影響しなかった。移植後早期、皮弁遠位部に限定されるもののdASC移植が皮弁知覚向上への新規アプローチとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate if Schwann cell (SC)-like cells differentiated from adipose-derived stem cells (ASCs) could improve the cutaneous nerve regeneration in skin flaps. Island groin flaps were elevated bilaterally in 32 rats. ASCs, SC-like cells differentiated from ASCs (dASCs), or SCs were injected to the flaps, and the reinnervation density was immunohistochemically assessed. Although a long-term survival of the transplanted cells was not found, dASCs and SCs significantly increased reinnervation density in the periphery of flaps, and this was more pronounced in noninnervated flaps. On the other hand, ASC showed no statistically significant effect on the peripheral reinnervation. In the center of flap, there was no statistically significant increase in reinnervation density in all groups irrespective of flap innervation. In addition to the use of innervated flaps, dASC transplantation therapy could be a new approach to improve the sensory recovery of skin flaps.

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：移植皮弁知覚 脂肪組織由来間葉系幹細胞 シュワン細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の穿通枝皮弁などの新しい概念の登場により、欠損部位の性状に応じて様々な部位から皮弁移植が行えるようになってきた。そして今後は形状のみではなく機能性をも重視した再建が求められると考えられる。特に**移植皮弁の知覚回復は神経付皮弁としない限り非常に乏しい**ことが多く、例えば手指において無知覚皮弁はその**機能性**に影響を与え、また再建乳房等においては**低温熱傷**の原因となり得る。これまで知覚神経付皮弁として挙上できる皮弁が数多く報告されているが、すべての皮弁に適用できるわけではなく、またドナー神経の犠牲が問題となることもある。

2. 研究の目的

一般に移植皮弁の知覚回復は植皮の場合と同じように、移植床及び皮弁辺縁からの知覚神経軸索伸長により起こると考えられる。しかしながら、**移植床からの軸索再生は皮弁皮膚との間に介在する脂肪組織により阻まれ、また皮弁辺縁からの軸索再生は瘢痕形成により阻害される**と私は考えている(Tomita et al. Ann Plast Surg. 2011 66(4):334-8)。本研究では新たな移植皮弁の知覚向上の手段として、**シュワン細胞移植**という手法に着目した。末梢神経内に存在するシュワン細胞は神経軸索再生に先立って遊走し、**ビュングナー帯**を形成することによって**再生軸索の橋渡し役として機能**することが知られている。そこで、本研究ではシュワン細胞を皮弁の移植床及び皮弁辺縁へ移植することにより、レシピエントから皮弁内への知覚神経軸索伸長が促進されるのではないかという仮説を立て、それを検証する。移植するシュワン細胞としては、ドナー神経の犠牲が問題となる従来の神経組織由来培養シュワン細胞に代えて、最近我々の研究グループが報告した脂肪組織由来間葉系幹細胞より分化誘導させたシュワン細胞を用いる。

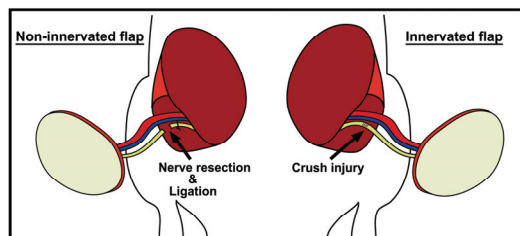
3. 研究の方法

すべての細胞に蛍光タンパク GFP を発現するラットより皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理、遠心分離により間葉系幹細胞(ASC)を得た。第2継代目においてシュワン細胞への分化誘導(dASC)を行った。プロトコールとしては海外共同研究者であるマンチェスター大学ブロード・マッキンドー研究所 Terenghi 教授のグループが用いている3段階分化誘導法を使用した。比較対象としての坐骨神経由来シュワン細胞培養に関しては過去に報告されているプロトコールを用いた(Nat Protoc. 2007 2(1):99-104)。

皮弁モデルとしてはRanneらが過去に報告した groin flap モデルを用いた(Eur J Plast Surg 1998 21:222-226)。

すなわち野生型ラットにおいて以下のモデルを作成した。

- A 腹壁動静脈のみを温存し、神経束は切断・結紮する(神経付加なしのモデル、図1左)
- B 腹壁動静脈及び神経束の全てを温存する(知覚皮弁モデル、図1右)



(図1)

A・Bそれぞれのモデルにおいて目的とする細胞を移植床、及び皮弁辺縁へ移植した後、皮弁を元の場所へ縫合固定する。移植する細胞別に以下の4群を作成した。

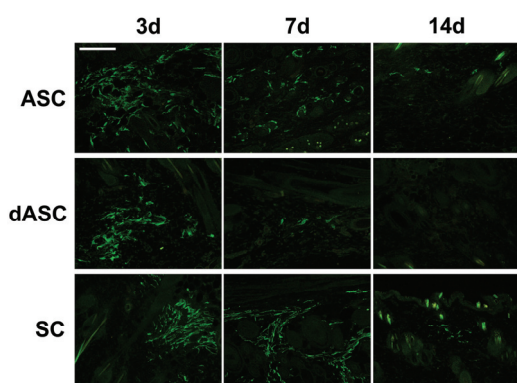
- ①脂肪組織由来間葉系幹細胞より分化誘導したシュワン細胞
- ②未分化脂肪組織由来間葉系幹細胞
- ③坐骨神経由来シュワン細胞
- ④細胞移植なし

術後 20 週目において、皮弁遠位・近位部から組織採取した。凍結切片を作成した後、

ニューロフィラメントマーカー抗 PGP9.5 抗体を用いて免疫組織学的染色を行った。また、細胞の生存期間が予想より短かったため、それらを検討する目的でより短い期間のフォローアップモデルも追加で作成、GFP 陽性細胞を評価した。

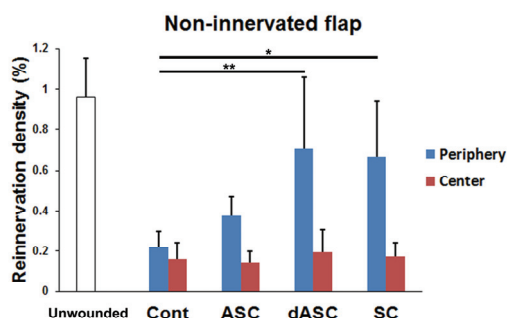
4. 研究成果

移植前の ELISA では、dASC は ASC より有意に多くの神経栄養因子 NGF・BDNF を産生し、その程度は SC と同等であった。細胞移植後、皮弁内において ASC、dASC、SC はそれぞれ 14、7、14 日目まで生存を認めた(図 2)。

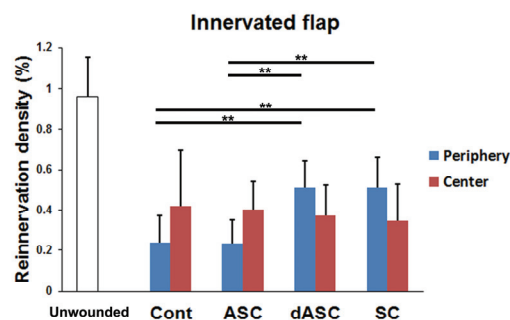


(図 2)

細胞移植後 20 週目において、dASC、SC 移植により皮弁遠位部において有意な神経再支配向上を認め、その程度は非知覚皮弁においてより顕著であった(図 3、4)。一方、ASC 移植は神経再支配の程度に有意な変化を及ぼさなかった。皮弁中心部においては、何れの細胞移植も神経再支配に有意に影響しなかった(図 3、4)。



(図 3)



(図 4)

まとめ

今回の動物モデルにおいては移植 GFP 細胞の長期生存、有髄知覚神経と merge する GFP 陽性細胞を認めなかったことより、当初期待していた SC のビュングナー帯形成・軸索誘導による皮弁知覚向上という現象は起こり難いこと示唆された。しかしながら、dASC、SC 移植による皮弁内神経再支配向上効果はある程度確認できた。その機序としては、1) 移植細胞により産生される神経栄養因子による皮弁周囲からの知覚神経再生の促進、2) 移植細胞由来 NGF による周辺組織内非損傷神経からの側芽形成促進が考えられる。これらの効果は移植後早期、皮弁遠位部に限定されるものの、知覚皮弁に加えて dASC 移植が皮弁知覚向上に対する新しいアプローチとなる可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Tomita K, Nishibayashi A, Yano K, Hosokawa K. Differentiated adipose-derived stem cells promote reinnervation of rat skin flaps. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open* 1(3):e22, 2013
2. Tomita K, Madura T, Sakai Y, Yano K, Terenghi G, Hosokawa K. Glial differentiation of human adipose-derived stem cells: Implications for cell-based transplantation therapy. *Neuroscience* 236(16):55-65, 2013

[学会発表] (計 3 件)

1. **Tomita K**, Hosokawa K. Differentiated adipose-derived stem cells promote cutaneous nerve regeneration in rat skin flaps. 5th European Plastic Surgery Research Council, August 22-25, 2013 Hamburg, Germany
2. **富田興一**、西林章光、矢野健二、細川互
脂肪組織由来間葉系幹細胞移植による
皮弁知覚向上の試み - 移植皮弁におけ
る正常知覚獲得を目指して - 日本マイ
クロサージャリー学会 40 周年記念学術
集会 2013 年 9 月 26-27 日 岩手県盛
岡市
3. **富田興一**、西林章光、矢野健二、細川互
移植皮弁における正常知覚獲得を目指
して - 脂肪組織由来間葉系幹細胞移植
による皮弁知覚向上の試み - 第 22 回日
本形成外科学会学術集会 2013 年 11 月
7-8 日 新潟県新潟市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 興一 (TOMITA KOICHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90423178

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：