

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791908

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞を用いた高濃度酸素環境下での人工皮弁作成

研究課題名(英文) Effect of high O₂ concentration to generated tissue in tissue engineering chamber

研究代表者

浜本 有祐 (Hamamoto, Yusuke)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10380180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：tissue engineering chamber (TEC) 内に既存のvascular carrierと人工真皮を導入し新生組織弁を作成してきた。また脂肪由来幹細胞(ASCs)は様々な組織への分化能を持ち、創治癒の促進効果や血管新生効果が報告されている。われわれが開発したTECとASCs用い、新生組織弁を増大させる方法を検討した。TEC内の酸素に代表される栄養供給は拡散に依存しており、容量が大きくなるに伴いTEC内は低酸素状態になっていると考えられる。TEC内で人工真皮とともにASCsを播種し、高濃度酸素内で飼育を行うと組織増大効果が得られることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We previously described induction of spontaneous tissue generation by implanting a collagen matrix and a ligated pedicle (arteriovenous bundle) into a hollow porous chamber (Tissue Engineering Chamber: TEC) in vivo in rabbits. They hypothesized that increased tissue volume could be obtained by the application of ASCs and/or by increasing the oxygen tension. In rabbits, a saphenous arteriovenous pedicle and a collagen sponge were inserted into a porous chamber in the groin. Rabbits were housed in either 20% (control) or 60% (normobaric oxygenation: NBO) atmospheric oxygen for the first 7 days, and then returned to normoxia. Samples harvested at 4 weeks were histological analyzed for tissue regeneration in chamber. And each was compared with and without ASCs. All patent chambers grew tissue. Tissue volume in ASCs with NBO groups was significant greater than that in the respective groups of the others.

研究分野：再生医療

キーワード：ティッシュエンジニアリングチャンバー 再生医療 人工組織弁 脂肪由来幹細胞 高濃度酸素

1. 研究開始当初の背景

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、tissue engineering chamber 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を行ってきた。これまでの実験的研究から tissue engineering chamber 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。

また脂肪由来幹細胞(ASCs)は脂肪・骨・神経・軟骨など様々な組織への分化能を持ち、創治癒の促進効果や血管新生効果が報告されている。われわれが開発した tissue engineering chamber (TEC) と ASCs 用い、新生組織弁を増大させる方法を試みた。高圧酸素の虚血肢での創傷治癒促進効果、特発性難聴の改善効果などは良く知られている。特に低酸素状態の改善に効果を示す。正常圧高濃度酸素も脂肪移植の際の細胞生着率を改善させる効果や、脳梗塞後の梗塞範囲を縮小する効果が報告されている。

ASCs と TEC を用いた報告は mouse や rat などの小動物では見られるが、Rabbit などの中動物を用いた報告はない。TEC 内の酸素に代表される栄養供給は拡散に依存しており、容量が大きくなるに伴い TEC 内は低酸素状態になっていると考えられる。このことから、TEC の容量が異なる小動物と Rabbit では TEC 内では違った反応が起こると考えられる。また将来的に TEC を人間に適應するにあたり、大容量の TEC での ASCs の効果を知る必要がある。今回我々は Rabbit を用いた中動物における TEC 内の ASCs の新生組織に対する効果、および正常圧高濃度酸素下で Rabbit を飼育しその効果を検討した。

正常圧高濃度酸素の効果として、遊離脂肪移植の生着率向上、脳梗塞後の神経症状改善効果等の報告があり、創傷治癒、組織新生を促進させる効果が期待されている。

2. 研究の目的

1. 高濃度酸素下での chamber 内組織形成に及ぼす効果

2. 高濃度酸素下での chamber 内 ASCs の生存に及ぼす効果

3. 研究の方法

タイプ コラーゲンスポンジ(PelInac®, 100% collagen density, 3 mm in thickness and 70-110 μm in pore size) Gunze Co. Ltd. (Kyoto, Japan) これまでにわれわれは tissue engineering chamber 内にウサギの伏在動静脈とコラーゲンスポンジを導入し、新生組織弁を作製する方法を報告してきた。今回は ASCs を用いてより大きな新生組織を作製する方法を検討した。実験動物には Japan White 系の雄ウサギを用い、実験数は $n=5$ で行った。ウサギ頂部脂肪を 2g 採取し、コラーゲナーゼ処理と遠心分離により脂肪由来間

葉系細胞を抽出した。DMEM + 10% FBS にて 3 継代の培養を行い、 1.0×10^6 個の ASCs を得た。ウサギの浅大腿動静脈の AV bundle をコラーゲンスポンジとともに chamber 内に導入し (Fig.1)、各条件下で 4 週間飼育した。

Control 群: ASCs は行わず、正常酸素下で 4 週間飼育を行う。

O_2 群: ASCs は行わず、酸素濃度 60% 下で 1 週間飼育した後、正常酸素下で 3 週間、計 4 週間飼育を行う。ASCs 群: 1.0×10^6 個の ASCs をコラーゲンスポンジに播種し正常酸素下で 4 週間飼育を行う。

ASCs + O_2 群: 1.0×10^6 個の ASCs をコラーゲンスポンジに播種し、酸素濃度 60% 下で 1 週間飼育した後、正常酸素下で 3 週間、計 4 週間飼育後を行う。

計 4 週後に TEC を取り出し、増殖した組織の組織標本を作成する。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。組織染色は HE 染色と Masson's trichrome 染色を行う。新生組織量、病理組織的に検討を行う。新生組織量は、各切片の面積を画像解析装置 Bio-Revo BZ 9000 microscope のハイブリッド・セルカウント機能を用いて測定し、Planimetry 法で各組織成分の新生組織量の体積を求める (Fig.2-a MT 染色、-b 新生組織: 青、コラーゲンスポンジ残存部分: 白)。統計学的処理は、各群の新生組織量を一元配置 ANOVA で行った。また Dil にて標識した ASCs により、ASCs 群、ASCs + O_2 群での生着の違いを比較した。



Fig.1

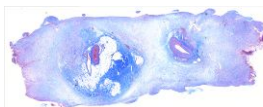
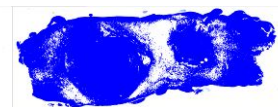


Fig.2-a: MT 染色標本



-b: 新生組織面積

4. 研究成果

【結果】

TEC 内の新生組織量の比較において、Control 群、ASCs 群、 O_2 群間に優位差は認められなかったが、ASCs + O_2 群において Control 群に対して 39% の新生組織増大効果が認められた。組織的な比較では ASCs + O_2 群では血管柄側と chamber 側の両側より組織形成が見られたのに対し、その他の群では主に血管柄側から組織が形成されていた。 O_2 群、ASCs 群では新生組織増大効果が認められなかった

が、両者を併用することにより、tissue engineering chamber 内の新生組織の増大効果が確認された (Fig.3)。

ASCs + O₂ 群、ASCs 群はコントロール群と比較して新生組織内に残存する未吸収コラーゲンスポンジが少なく、実質的な新生組織が多く、膠原線維の増加がみとめられた (Fig.4)。

ASCs 細胞生着の比較では、ASCs 群に比べ ASCs + O₂ 群において DiI 標識細胞が多く認められ、高濃度酸素投与により ASCs 生着が向上したと考えられた (Fig5-a: ASCs + O₂ 群、-b: ASCs 群)。

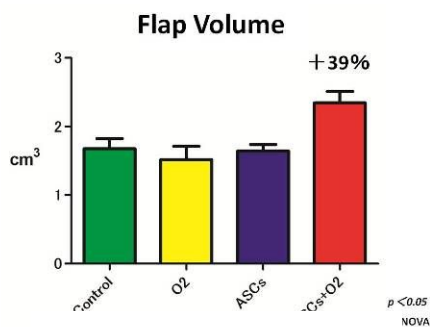


Fig.3 新生組織体積

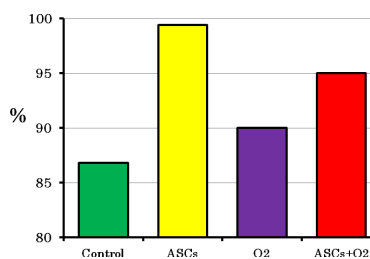


Fig.4 体積中の新生組織の割合

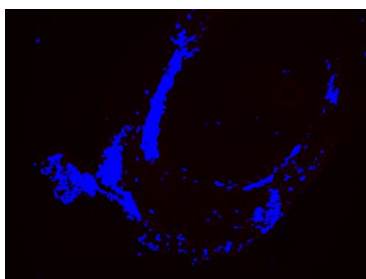


Fig.5-a: ASCs+O₂ 群

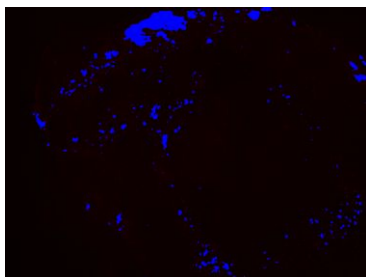


Fig.5-b: ASCs 群

【考察】

ASCs から放出されるケミカルメディエーターが組織新生、血管新生、創傷治癒に効果を発揮するパラクリン効果が知られている。ASCs を付加することで、TEC 内で新生組織増大効果を認めたとの報告が見られるが、これらはラットやマウス等の小動物で得られた結果であり、それより大きな動物、より容量の大きな TEC ではその限りではないことが分かった。また腎皮膜内、筋肉内等の血流の豊富な組織に移植された分化 ASCs は組織を構築することが知られているが、皮下等に移植されたものは、組織構築に至らないことが報告されている。

これは酸素分圧に依存していると考えられる。Kato らはマウスの正常圧高濃度酸素環境での各種組織の酸素分圧を測定しており、酸素濃度の上昇に従って、組織分圧も高くなることが報告されている。

われわれの実験でも、ASCs 群では新生組織の質 (膠原線維量、血管新生) は向上しているが、いわゆる新生組織の体積の増大は認められなかった。しかし ASCs+O₂ 群では新生組織の質・量とも著明に増大することが分かった。これは TEC 内の酸素分圧が影響していると考えている。酸素分圧は距離の 2 乗に反比例して低下するため、動物の体積が大きくなり、TEC が大きくなるにつれて、TEC 内部の酸素分圧は低下する。正常圧高濃度酸素が TEC 内の hypoxia を緩和することにより、ASCs の生存率を向上させると考えられる。このことがパラクリン効果を増強、新生組織の増大につながったことが示唆された。再生医療の現場では 3 次元で組織を構築した場合の hypoxia が最も問題となっている。正常圧高濃度酸素は臨床でも用いられている、最も簡便な対策であり、正常圧高濃度酸素と細胞治療の併用は再生医療に与える影響は大きいと考えられる。

【結論】

正常圧高濃度酸素と ASCs を併用することで、TEC 内の新生組織増大効果が得られた。正常圧高濃度酸素療法と細胞移植の併用による相乗効果の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)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会
 キッセイ文化ホール(長野県松本文化会館)
 長野県松本市水汲 69-2

2014 年 10 月 10 日

シンポジウム 3 「幹細胞の研究」

「脂肪由来幹細胞と高濃度酸素の併用による新生組織増大効果」

瀨本 有祐

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kms.ac.jp/~keisei/research/bloodflow_flap.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀨本 有祐 (HAMAMAOTO, Yusuke)
香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10380180

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

田中 嘉雄 (TANAKA, Yoshio)
香川大学・医学部形成外科学・教授
研究者番号：50171806

上野 正樹 (UENO, Masaki)
香川大学医学部・炎症病理学・教授
研究者番号：30322267

玉井 求宜 (TAMAI, Motoki)
香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90617276

木暮 鉄邦 (KOGURE, Tetsukuni)
香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40437695