

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462799

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞を用いた再生組織付加prefabricated flapの基礎的研究

研究課題名(英文) Basic experiments of prefabricated flap using Adipose-Derived Regenerative Cells

研究代表者

朝戸 裕貴 (ASATO, Hirotaka)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：20222581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪幹細胞から作製した再生組織を移植したprefabricated flapを作製し、基礎実験を行った。ラット腹部から脂肪を採取し、脂肪幹細胞を抽出した。脂肪幹細胞を人工骨とともに骨分化誘導培地で3週間培養し、骨芽細胞・破骨細胞に分化させた。脂肪幹細胞と共培養した人工骨をラット背部皮下に移植した。有茎皮弁として挙上できることを確認した。人工骨は表層だけではあるが、アルカリフォスファターゼ染色で染色され、骨基質を形成していることが確認された。染色されたのは人工骨表層のみにとどまっていたが、prefabricated flapとして人工骨を使用した再生骨の作製が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We transplanted regenerated tissue which made from Adipose-Derived Regenerative Cells (ADRCs), as a prefabricated flap. We performed basic experiments on the prefabricated flap. We collected fat from rats and extracted ADRCs. ADRCs were cultured in osteogenic differentiation medium with artificial bone for three weeks. The artificial bones adding regenerated tissue were transplanted at the back of the rats. We transferred the prefabricated flaps and made a pathological examination. Only at the surface of artificial bones, we have confirmed bone matrix formation using alkaline phosphatase stain. It was suggested that we are able to make prefabricated flaps with osteoblast cells differentiated from ARDCs.

研究分野：医学

キーワード：脂肪細胞由来幹細胞 皮弁 人工骨

### 1. 研究開始当初の背景

外傷や腫瘍切除後、先天異常などにおいて、皮弁移植法は一期的に組織欠損を再建できる利点があり、これらの治療に不可欠である。しかし皮弁採取部の犠牲が大きく、血流障害による皮弁壊死の危険性もある。

一方で、近年組織採取部の犠牲が最小限である組織再生による治療が注目を集めている。その中でも脂肪幹細胞移植 (Adipose derived regenerative cells : ADRCs) は分化能、増殖能が高く、大量に採取可能であることから臨床応用しやすい。再生組織の移植においては移植床の血流が不足していると生着が乏しいという問題がある。

移植床の状態が悪い部位に再生組織を移植することを目標とした prefabricated flap を作製することができれば、皮弁採取部の犠牲を最小限とした皮弁移植法が可能となる。血流の良好な移植床に再生組織を移植し、prefabricated flap を作製する技術の確立と、その基礎的研究が望まれていた。

### 2. 研究の目的

再生組織に関しては、軟骨は軟骨基質内に毛細血管網を要しない特殊性から、すでに臨床応用も含めて行われてきている。脂肪組織は従来の脂肪移植法が、瘢痕などの面で prefabricated flap よりも優れている点が多い。今回われわれは骨組織の含む prefabricated flap の作製し、基礎的研究を行うこととした。

採取部の犠牲を最小限とした上で、採取可能な骨組織は限られており、移植床の状態がよい部位では人工骨等も使用されてきた。近年、ハイドロキシアパタイトを原料とした人工骨は、骨伝導能から比較的良好に用いられてきた。しかし人工骨であること欠点が多く、その欠点を改善するため、人工骨と再生組織を用いた prefabricated flap の作製を目標とした。

### 3. 研究の方法

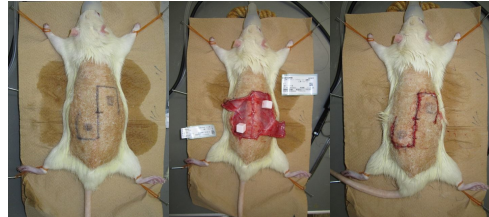
8-12 週齢の SD ラット単径部から脂肪を採取した。脂肪を細分化し、リン酸緩衝整理食塩液 (PBS) に 0.1% コラゲナーゼタイプ 1 を 0.1% と ディスパーゼ を 0.2% 添加した溶液に混和し、37 で 60 分振盪混和する。100 ミクロンフィルターで固形物を除去し、遠心分離することで、ADRCs を含む細胞懸濁液を抽出する。これを基礎培地 (DMEM にウシ胎児血清 (FBS) を 10% と ペニシリンストレプトマイシンを 2% 添加したもの) で培養した。コンフルエントとなってから、間葉系細胞骨芽細胞分化培地で 3 週間培養した。培地交換は 72 時間ごとに行った。

培養したものを酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性、アルカリフォスファターゼ活性の二重染色を行い、分化の確認を行った。

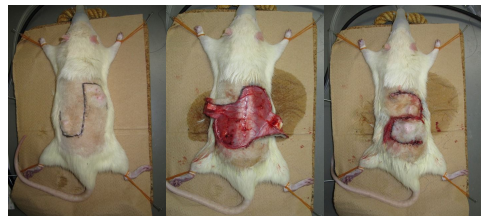
基礎培地で培養した ADRCs をトリプシン処理し、細胞懸濁液として抽出したものを、人

工骨に播種し、間葉系細胞骨芽細胞分化培地で 3 週間共培養した。人工骨はハイドロキシアパタイトであるアパセラム®-AX と、型リン酸三カルシウムであるスーパーポア®と、コラーゲン含有ハイドロキシアパタイトであるリフィット®を使用した。ともに 1cm の立方体の形態を使用した。

培養した人工骨を全身麻酔下にラット背部皮下に埋入した。ラット背部に 1 辺 3cm の皮弁を作製し、その中央に人工骨を移植した。1 例につき、二つの皮弁を挙上し、人工骨をそれぞれ移植した。



移植後 2 週間後に、に再度全身麻酔下で作製した prefabricated flap を挙上し、移植した。人工骨を含めた状態で前回と同様に皮弁を挙上し、横転皮弁として皮弁を入れ替えて移植した。

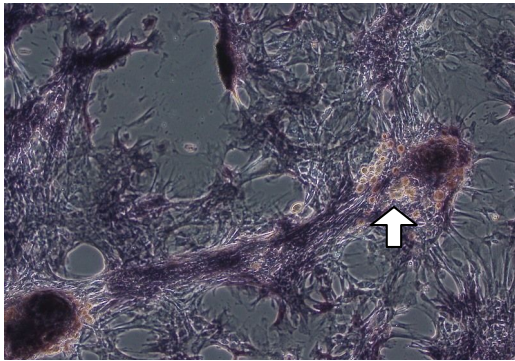


さらに 2 週間後、皮弁を含めて人工骨を採取し、病理組織学的検討を行った。

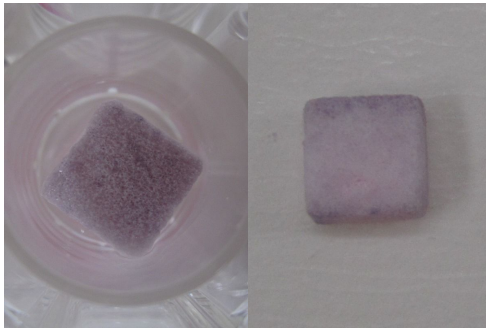
### 4. 研究成果

ラットの片側単径部から平均  $0.89 \pm 0.28\text{g}$  の脂肪を採取できた。

採取した脂肪から抽出した ADRCs を含む細胞懸濁液を間葉系細胞骨芽細胞分化培地で 3 週間培養したものを酸性フォスファターゼ、アルカリフォスファターゼで二重染色した。細胞は全体的に青紫に染色され、アルカリフォスファターゼ活性を認め、骨芽細胞に分化が確認され。一部の細胞集塊では、球状で細胞質が赤く染色された細胞を認めた (↑)。酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性を認め、破骨細胞への分化が確認された。



また、人工骨と共培養したのも上記の二十染色を行うと、表層が青紫に染色され、アルカリフォスファターゼ活性を認めた。しかし、表層から1mmほどの領域までしか、アルカリフォスファターゼ活性を認めなかった。アパセラム®-AX、スーパーポア®は染色されたが、リフィット®は染色されず、細胞接着ができなかったと考えられた。



ラット背部に共培養した人工骨を移植し、prefabricated flapとして作製したものを病理学的に検討すると、アパセラム®-AXとスーパーポア®に関しては、表層から1mm程度まではアルカリフォスファターゼ活性を認め、表層のみではあるが骨芽細胞の存在が確認された。同様に、リフィット®はアルカリフォスファターゼ活性を認めなかった。

ADRCsを人工骨に播種し、間葉系細胞骨芽細胞分化培地で培養し、骨芽細胞に分化させたものを移植することで、表層だけではあるが再生組織を不可したprefabricated flapの作製が可能であると考えられた。ハイドロキシアパタイトなどの人工骨は、自家骨と接した部分のみ骨組織が誘導される骨伝導が認められ、生体適合性は高いが、あくまでも人工骨であり、骨誘導能はない。しかし、ADRCsから誘導した骨芽細胞が播種されていることにより、表層だけとはいえ人工骨全体に骨組織が再生される可能性がある。現時点では、人工骨の深部への細胞導入が困難であり、また生体への移植後の血流が担保されないため、深部の生着は困難であると考えられる。今後の課題は非常に多いが、再生組織を付加したprefabricated flapが作製可能であることが示唆された。

##### 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)

管剛史、朝戸裕貴、メビウス症候群の顔面神経麻痺に対する、遊離広背筋皮弁移植による動的再建術において、動力源となる神経の選択に難渋した1例、日本マイクロサージャリー学会会誌、査読有、28巻、2015、134-139 DOI : 10.11270/jjsrm.28.134

今西理也、朝戸裕貴、頭頸部再建に用いられる皮弁 腹直筋皮弁 腹直筋皮弁を用いた頭頸部再建、耳鼻咽喉科・頭頸部外科、査読無、87巻、2015、482-488

〔学会発表〕(計 3件)

梅川浩平、朝戸裕貴、今西理也、政岡浩輔、高田悟朗、横山愛、Pirogoff 切断変法により足根骨髄炎を治療した一例、第7回日本創傷外科学会学術集会、2015年7月24日、東京

梅川浩平、朝戸裕貴、顔面神経麻痺における眼瞼部の治療、第27回日本頭蓋底外科学会、2015年7月9日、名古屋

梅川浩平、朝戸裕貴、福田憲翁、倉林孝之、政岡浩輔、山本勇矢、鈴木彩子、口腔皮膚瘻に対する遊離前腕皮弁による治療経験、第58回日本形成外科学会総会学術集会、2015年4月9日、京都

〔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

朝戸 裕貴 (ASATO, Hirotaka)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：20222581

(2) 研究分担者

野村 紘史 (NOMURA, Hiroshi)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：40513213

倉林 孝之 (KURABAYASHI, Takashi)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：60513231

梅川 浩平 (UMEKAWA, Kohei)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：70458371

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし