

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670755

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた血流不全組織の救済法の検討

研究課題名(英文) The Effect of Allogenic Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on Ischemic Tissue.

研究代表者

櫻村 勉 (KASHIMURA, Tsutomu)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：20570740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ブタの皮下脂肪組織を体外で脱分化させることにより、高い増殖能と間葉系幹細胞と同等の多分化能を示す細胞群(脱分化脂肪細胞dedifferentiated fat cells, DFAT)を調製する培養法を確立した。

本研究では、ラットの背部皮弁に自家DFATおよび同種DFATを投与することで皮弁の生着域を拡大しうるか検討した。自家DFATと同種DFATのいずれの投与でも、皮弁内に著明な新生血管を認め、皮弁生着域拡大効果が得られた。DFATの投与により慢性の虚血性皮膚潰瘍治療、新規皮弁の開発、外傷治療など幅広い範囲への臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In recent years, pluripotent stromal cells such as mesenchymal stem cells (MSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) have been developed, for use in the search for treatments of pathological conditions attributed to ischemia. By causing the dedifferentiation of porcine subcutaneous adipose tissue in vitro, we have established a cell culture method aimed at preparing dedifferentiated fat (DFAT) cells with a high proliferative capacity and pluripotency comparable to that of MSCs.

We have injected autologous and allogenic DFAT cells into random-pattern skin flaps in the back of rats, and examined the enlarging effect on the flap survival area. By injecting the cells into the base of the flap, we achieved a strong angiogenic effect and an enlarging effect on the flap survival area.

Because DFAT cells can easily be collected and cultured, a broad application in the treatment is expected in future, such as external injury and ischemic ulcer, in addition to the random pattern flap.

研究分野：形成外科

キーワード：脱分化脂肪細胞 血管新生作用 皮弁

1. 研究開始当初の背景

形成外科領域では、阻血性潰瘍や褥瘡など血流障害に起因する疾患の治療の他、非生理的な血流を利用する皮弁や植皮移植床のpreparationなど外科的治療においても組織血流を考慮した治療戦略が必要となる。近年、骨髄や脂肪を細胞ソースとした多分化能を有する間葉系幹細胞が開発され血流不全に起因する病態への治療が模索されている。その中で、幹細胞の血管新生作用による皮弁の生着域拡大に関する研究が行われており、一定の効果が得られることが報告されている。しかしながら従来の間葉系幹細胞には、採取・単離・培養において課題が残り臨床応用に至っていない。

われわれは、多分化能を有する脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells, 以下 DFAT) を開発し、ウサギ虚血肢およびラット心筋梗塞モデルにおいて血流改善効果と血管新生作用を有することを明らかにした。DFAT を用いることにより種々の新規な血流改善法への応用が期待できる。

2. 研究の目的

今回、DFAT によるラット背部皮弁生着域拡大効果の検討を通じて、新規な治療法から手術手技の開発まで広く形成外科領域に応用可能な DFAT を用いた血流不全組織救済法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) ラット皮下脂肪採取と DFAT の単離・培養

全身麻酔下にそれぞれの実験系で使用するラット腹部の皮下脂肪細胞を採取した。採取した脂肪組織をコラゲナーゼ処理後、遠心操作により浮遊する成熟脂肪細胞を、培地にみたしたフラスコの天井側で培養することによって脱分化脂肪細胞を単離した。培養後7日後にフラスコを反転して通常の付着培養を行う。約2週間培養して得られた脱分化脂肪細胞を凍結保存し使用した。

(2) ラット背部皮弁における自家ならびに同種 DFAT 投与に関する実験

2%イソフルランによる全身麻酔下腹臥位で手術を行った。ラットの背部に頭側を茎とした 2×9cm 大の乱走型皮弁を挙上した。皮弁挙上時に、肉眼的観察およびドップラー聴診器を用いて皮弁基部に有軸血管を含まないことを確認した。挙上した皮弁は、母床からの血管新生の影響を除外するためシリコンシートを挿入し皮弁挙上部に再縫合した。

対照群(未治療)(n=10)と DFAT 投与群(DFAT を 1×10^6 cells/0.1ml 投与)を作製した。DFAT 投与群は、皮弁基部より 2cm 末梢に投与する皮弁基部投与群 (n=10) と皮弁中央投与群 (n=10) の 2 群を作製した。同種 DFAT 投与群においては、Wistar 系ラットより得られた DFAT を同様に投与した。GFP(Green

Fluorescence Protein) トランスジェニックラットより得られた自家 DFAT (1×10^6 cells/0.1ml) を投与する群をそれぞれ作成した (n=10)。

皮弁挙上前、挙上後、術後 14 日目にドップラー血流計により皮弁の血流を測定した。

術後 14 日目にデジタルカメラで皮弁を撮影し画像解析ソフトウェア (Image J(R)) をもちいて皮弁生着域の評価をおこなった。同日、採取した組織検体を H-E 染色、墨汁染色、GFP 免疫染色、isolectin B4 免疫染色、VEGF 免疫染色により評価を行った。GFP 陽性 DFAT を投与した群は、術後 5 日目に組織採取を行った。

(3) ラット腹部皮弁における実験

2%イソフルランによる全身麻酔下仰臥位で手術を行った。右腹直筋の第 2 穿通枝を single pedicle とする穿通枝皮弁を挙上した。皮弁の大きさは、側上前腸骨棘を外側縁、剣状突起を上縁、恥骨を下縁とした四角形とした。DFAT 投与群は、皮弁中央に DFAT (1×10^6 cells/0.1ml) を投与した。0.1mm シリコンシートを母床に埋入し皮弁を挙上部に再縫合し、術後 14 日目に評価を行った。

4. 研究成果

(1) ラット背部皮弁における DFAT の投与実験

皮弁生着域

術後 14 日目に皮弁の生着域と壊死部分の境界は明瞭であった。

自家 DFAT 投与では、皮弁の平均生着率は対照群: $53.8 \pm 6.4\%$ 、皮弁中央投与群: $50.6 \pm 6.4\%$ 、皮弁基部投与群: $65.8 \pm 2.4\%$ であり、皮弁基部投与群で皮弁生着域は有意に拡大した ($p < 0.05$)。 (図 1)

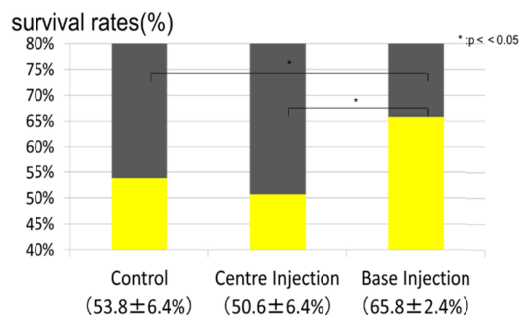


図 1 自家 DFAT 投与による皮弁生着域

同種 DFAT 投与では、皮弁中央投与群: $50.6 \pm 6.4\%$ 、皮弁基部投与群: $65.8 \pm 2.4\%$ であり、自家 DFAT 投与群と同様に皮弁基部投与群で皮弁生着域が有意に拡大した ($p < 0.05$)。 (図 2)

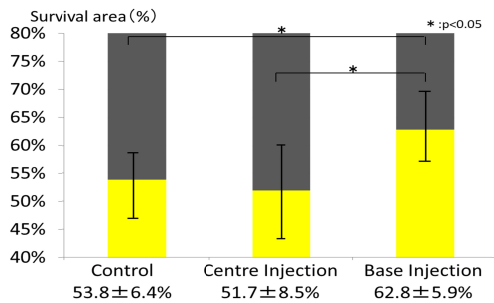


図2 同種 DFAT 投与による皮弁生着域

組織学的検討

自家・同種 DFAT ともに同様の所見であった。H-E 染色において、皮弁基部投与群で DFAT cells を注入した皮膚筋層下結合織が著明に肥厚しており、墨汁染色で血管の増加を認めた。皮弁生着域拡大には、皮弁内血管の増加が寄与していることが示唆された。(図3)

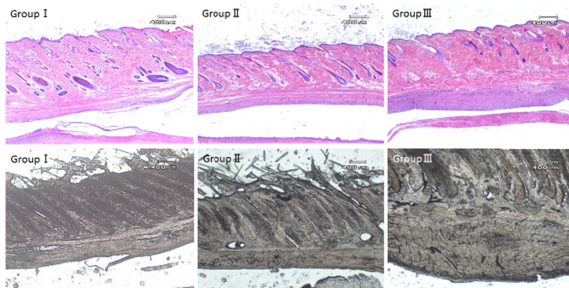


図3 H-E 染色ならびに墨汁染色の組織像
Group I : 対照群、Group II : 自家 DFAT 中央投与群、Group III : 自家 DFAT 基部投与群

GFP-labelled 自家 DFAT の皮弁基部投与群における免疫染色の結果、全例で DFAT 注入部位に GFP 陽性細胞(緑)を認め周囲には isolectinB4 陽性細胞(赤)を多数認めた。二重陽性を示す細胞はなかった。一方で、皮弁中央投与群では、isolectinB4 陽性細胞を認めたが、GFP 陽性細胞は認めなかった。このことから、自家 DFAT の投与では、既存血管にたいする血管新生作用(Angiogenesis)により皮弁内血管が増加したと考えられる。(図4)

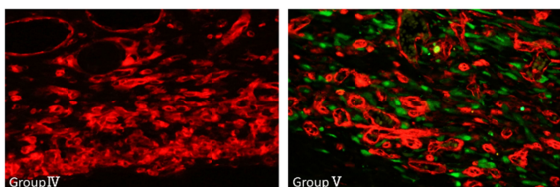


図4 GFP・isolectinB4 蛍光免疫染色
Group IV : 中央投与群、Group V : 基部投与群

ドップラー血流計による血流量、VEGF なら

びに CD31 免疫染色では、一定の傾向を認めなかった。

各群で肥厚した部位の厚さを測定した。対照群: $379 \pm 96 \mu\text{m}$ 、皮弁中央投与群: $414 \pm 120 \mu\text{m}$ 、皮弁基部投与群: $864 \pm 372 \mu\text{m}$ であり、有意差を認めないものの皮弁基部投与群で皮弁の肥厚を認めた。

術後2週間の墨汁染色で皮弁内の単位面積($200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$)当たりの血管数は、対象群で 3.3 ± 0.9 、皮弁中央投与群で 2.8 ± 1.1 、皮弁基部投与群で 7.6 ± 3.1 であった。皮弁基部投与群で有意に血管数の増加を認めた。

(2) ラット腹部皮弁における DFAT の投与実験

実験プロトコールに沿ってラットの腹部皮弁を挙上し術後2週間で皮弁生着域を測定した。しかしながら、対照群、DFAT 投与群いずれにおいても一定の壊死を生じる皮弁モデルの作成が困難であった。腹部皮弁での DFAT 投与による皮弁生着域拡大効果の評価は困難であった。

これまでのラットの間葉系幹細胞を用いた Random pattern skin flap における検討では、13-23%程度の生着域拡大効果が得られている。本研究では、自家 DFAT 投与により 12%の生着域拡大効果を得た。DFAT は、成熟脂肪細胞以外の分画から得られる ADSc とは異なる細胞群である。DFAT は、成熟細胞分画から調整される細胞であり、煩雑な選別操作なしに純度の高い細胞が得られる。皮下脂肪より採取可能であり、組織採取量が 1g 以下と微量ですむことから、細胞採取の侵襲が少ない。遺伝子操作やウイルスベクターなどを用いない簡便な方法で短期間に大量の調整が可能であるといった特徴を持つ。これらの特徴により臨床応用への優位性を持つと考える。

また、臨床応用においては、特に外傷など緊急手術の際の使用についても検討が必要である。これらの場合には、事前の細胞の調整ならびに移植は困難であり、事前に培養し凍結保存しておいた同種細胞による治療が必要になる。本研究では、同種 DFAT 投与により 9%の生着域拡大効果を得た。凍結保存した同種 DFAT による治療の有効性も示唆された。

本研究では、DFAT 投与群のうち皮弁基部投与群において、有意に皮弁内の血管数が増加し皮弁の生着領域が拡大した。しかしながら、皮弁中央投与群では、生着領域の拡大効果を認めなかった。術後5日目の免疫染色では、皮弁基部投与群で DFAT の生着が確認できたが皮弁中央投与群では DFAT は消失していた。皮弁挙上により阻血環境におかれた組織内に注入された DFAT は、皮弁基部投与群で、血管増殖作用により皮弁内の皮膚筋層下

の血管が増加し皮弁生着域を増大させたと考える。一方で、皮弁中央投与群では、移植された DFAT は皮弁壊死部との境界部に移植されており、DFAT が生着することなく血管増殖作用が得られなかったと考える。

Random pattern skin flap の生着域拡大効果は、angiogenesis と vasculogenesis の 2 つのいずれかのメカニズムにより皮弁内の血管新生 (neovascularization) によって得られる。Angiogenesis は、既存血管からの血管新生であり、vasculogenesis は、新たな血管形成 (vessel formation) によるものである。従来、vasculogenesis は胎生期にのみ生じると考えられていたが、近年では成人においてもみられる現象であることが明らかになっている。本研究では、GFP labelled DFAT を投与した群で DFAT の注入部位に一致して組織学的に血管増殖を認めた。しかし、GFP と isolectin B4 による免疫染色で二重陽性を示す細胞は同定されず、DFAT の paracrine による angiogenesis により血管新生が皮弁生着域拡大に作用したと考える。

ラット背部の Random pattern flap へ成熟脂肪細胞に由来する Dedifferentiated Fat Cells (DFAT) を投与し皮弁生着域拡大効果について検討した。皮弁中央部への投与は、壊死部分に近く投与された DFAT から十分な血管増殖作用が得られなかったと考える。皮弁基部への DFAT の投与は、DFAT の paracrine による angiogenesis により生着域拡大効果を拡大したと考える。DFAT は、採取・培養が容易であるため、今後、Random pattern flap の生着域拡大のみならず慢性の虚血性皮膚潰瘍、新規の皮弁開発、外傷治療など広い分野の治療へ臨床応用の可能性があると考えられる。

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 1 件)

Kashimura T, Soejima K, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H, The Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on a Dorsal Skin Flap Model, Journal of investigative surgery, 査読有、29 巻 1 号、2015、6-12
DOI: 10.3109/08941939

[学会発表](計 8 件)

Tsutomu Kashimura, The Effect of Allogenic Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on Ischemic Tissue., The 13th Japan Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, 2016 年 5 月 15 日~2016 年 5 月 17 日、ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県金沢市)

櫻村 勉, 脱分化脂肪(DFAT)細胞による血流不全に陥った皮膚軟部組織の救済法ーラット背部皮弁モデルでの検討 -、第 9 回日本大学先端バイオフォーラム、2016 年 01 月 27 日、日本大学会館(東京都千代田区)

櫻村 勉, 脱分化脂肪細胞(DFAT)のラット背部皮弁に対する血管新生作用の機序に関する検討、第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会、2015 年 10 月 08 日~2015 年 10 月 09 日、岩手県民会館(岩手県盛岡市)

櫻村 勉, 脱分化脂肪細胞(DFAT)によるラット背部皮弁の血管新生に関する検討、第 7 回創傷外科学会総会・学術集会、2015 年 07 月 24 日~2015 年 07 月 25 日、東京ドームホテル(東京都文京区)

櫻村 勉, 脱分化脂肪細胞(DFAT)皮下注入によるラット背部皮弁の生着域拡大についての検討、第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム、2015 年 01 月 31 日、日本大学会館(東京都千代田区)

Tsutomu Kashimura, The Effect of Mature Adipocyte-derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on Dorsal Skin Flap Model, 17th ASEAN Congress of Plastic Surgery, 2014 年 08 月 01 日~2014 年 08 月 04 日、シンガポール(シンガポール)

櫻村 勉, 脱分化脂肪細胞(DFAT)投与によるラット背部皮弁の生着領域の拡大効果についての検討 2 - 投与部位による生着領域の増減、第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会、2013 年 11 月 07 日~2013 年 11 月 08 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

櫻村 勉, 脱分化脂肪細胞(DFAT)皮下注入によるラット背部皮弁生着域拡大についての検討、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 09 月 26 日~2013 年 09 月 28 日、盛岡市民文化ホール(岩手県盛岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻村 勉 (KASHIMURA, Tsutomu)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 20570740

(2) 研究分担者

仲沢 弘明 (NAKAZAWA, Hiroaki)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 60180270

松本 太郎 (MATSUMOTO, Taro)
日本大学・医学部・教授

研究者番号：50366580

副島 一孝 (SOEJIMA, Kazutaka)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号：00246589

下田 勝巳 (SHIMODA, Katsumi)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：00266793