

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10940

研究課題名(和文) 生体内ダイレクト・リプログラミングを利用した血管付加脂肪組織の再生に関する研究

研究課題名(英文) Spontaneously Generated Large Adipose Flap in an in vivo 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪皮弁再生の再現性、要する期間、長期維持効果および脂肪再生のメカニズムを検討した。再生の場としてchamber、血管のソースとして血管茎、スcaffordにCoolagen sponge、細胞増殖因子にPRPとbFGFを用いた。すべての実験において再生組織が得られ、脂肪組織が占める比率は4週14.8%、8週47%、12週80%であった。12週の脂肪組織を血管付加脂肪組織として下腹部に移植したところ、5ヶ月後もその大きさと形は維持されていた。結論)ウサギを実験モデルとした場合、12週で脂肪弁は再生でき、長期的にも維持されていた。線維芽細胞様細胞が脂肪再生に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study clarified 1) the reproducibility of creating an adipose flap, 2) the time-course of adipogenesis, 3) the long-term stability of a generated adipose flap, and 4) the mechanism of adipogenesis in an in vivo chamber. The chamber was used as a protected space for tissue engineering, the vascular pedicle as a vascular source, the collagen sponge as a scaffold, and PRP and c-bFGF as growth factors. Results) The ratios of the vascular pedicle and adipose tissue in the generated tissue were 14.8%, 47% and 80% at 4, 8, and 12 weeks, respectively. The adipose flap in Group 12w maintained its volume and shape for five months following pedicle transfer. Conclusions: Adipose flaps were spontaneously generated at 12 weeks with reproducibility, and showed long-term stability. Fibroblast-like cells recruited from the vascular pedicle was thought to contribute to the adipogenesis in the tissue-engineering chamber.

研究分野：形成外科

キーワード：再生医療 脂肪組織 PRP bFGF chamber 線維芽細胞様細胞

1. 研究開始当初の背景

乳癌によって生じた組織欠損部に対して自家組織移植やインプラントによる再建が行われている。自家組織移植は、身体から採取されるため犠牲と採取できる組織に制限がある。一方、インプラントは人工物であるためその使用に際して制限があり、感染や露出など安全面での問題がある。これらの問題を解決する方法として再生医療が注目され、最近では脂肪幹細胞(ADSCs)を用いた研究が世界的に注目されている。しかし、再生できる脂肪組織量が少なく、このため普及には至っていない。われわれは *in vivo* **Tissue Engineering Chamber (in vivo TEC)** 内に既存の動静脈血管茎(vascular source)を導入し、これにType I collagen sponge(細胞外マトリックス)と FGF-2(growth factor)とを併用して栄養血管を有する再生組織を作成して報告してきた。さらに最近では多血小板血漿(PRP)も併用して安全性と再現性のある結果を得ている。この研究中に、2年間chamberを体内に留置したところ、すべての組織が脂肪組織に置き換えられていることを発見した。再生組織が脂肪組織であることは脂肪染色でも確認した。この発見は、脂肪細胞や脂肪幹細胞などを用いずに血管付き脂肪組織が体内で再生され(ダイレクト・リプログラミング)、長期間その形態(chamberの形状に一致)を維持していることを示す大変興味ある知見である。そこで予備実験(n=3)を行ったところchamber埋入後12週で、ほぼすべての組織が再現性をもって脂肪組織に置換されることが明らかとなった。

2. 研究の目的

血管付加脂肪組織再生(adipose flap)の再現性、脂肪皮弁作成までに要する期間、長期維持性、そしてin vivo chamberにおける脂肪再生のメカニズムを明らかにすること

を目的とした。

3. 研究の方法

実験動物：ウサギ ラット ミニプタ

In vivo TEC を単径部に留置。この中に再生組織の血管床として血管茎を導入。Extracellular matrix として collagen sponge、細胞増殖因子に PRP と bFGF を用いた。

- (1) in vivo TEC 内の再生肉芽組織の経時的組織組成(4W, 8W, 12W)を組織学的に観察し、再生組織量に対する脂肪組織量を求めた。Adipose flap が作製されるまでに要する期間と再現性とを検討した。
- (2) 12週の再生脂肪組織の脂肪染色を行い、脂肪再生の部位を組織学的に検討した。
- (3) 再生脂肪組織に血管茎を付けて下腹部の皮下に移行・移植した。5ヶ月後に取り出し、長期的に維持されるかについて検討した。
- (4) この実験モデルにおいて chamber 留置部の周囲脂肪組織を除去したモデルで、脂肪組織が再生されるかを検討し、脂肪組織再生を誘導する環境因子を検討した。
- (5) 脂肪再生メカニズムについての検討を目的に、ラットを用いて脂肪組織再生を行い、再生組織の免疫二重染色法(CD34+/Procollagen I+)で fibrocyte の同定を行った。
- (6) 大動物(ミニプタ)を用いて、ラビットと同様に脂肪組織が再生されるかについて検討した。

4. 研究成果

- (1) 全ての実験動物(n=15)で拍動性の再生組織が chamber 内に形成され、組織の再生に再現性があることが示された。肉眼的には、再生組織は4週で肉芽組織、8週と12

週では脂肪組織であった。

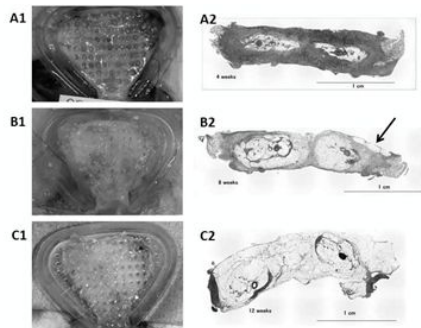


Figure 4. The representative macroscopic appearances and histological specimens of tissues generated in each group; (A1, B1) Group 4w, (A2, B2) Group 8w, (C1, C2) Group 12w. The generated tissues varied from granulation tissue to adipose tissues. Localized adipogenesis was identified close to chamber pores in Group 8w (arrow).

(2)再生組織に対する再生脂肪組織の比率は、4週 = 14.8%、8週 = 47%、12週 = 80%で経時的に脂肪組織が増加・置換され、12週で脂肪皮弁(adipose flap)が作製されることが示された。

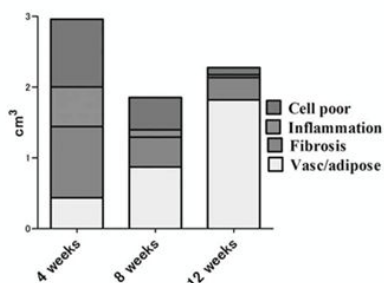


Figure 5. The mean total volumes of generated tissue and each tissue type. Vascular pedicle and adipose tissue gradually increased, while fibrous, inflammatory and cell-poor tissues decreased.

(3)脂肪染色標本を組織学的に検討したところ、導入した血管茎の動脈の外膜に多数の小脂肪滴が見られ、その間を線維芽細胞様細胞が錯綜している像が見られた。組織の末梢では、線維芽細胞様細胞が丸みを帯び、その細胞の中に脂肪滴を蓄積している像が見られた。

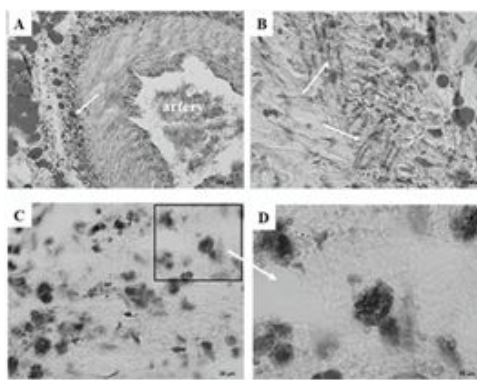


Figure 7. (A) Many small lipid droplets (arrow) were noted in and around the adventitia of the arterial wall of the vascular pedicle. (B) Fibroblast-like cells (arrows) were distributed between small lipid droplets. (C&D) Round shaped fibroblast-like cells with lipid accumulation were observed in the periphery.

(4)5 か月間移植した脂肪弁は、形態と volume が維持されて、肉眼的には自然な脂肪組織になっていた。

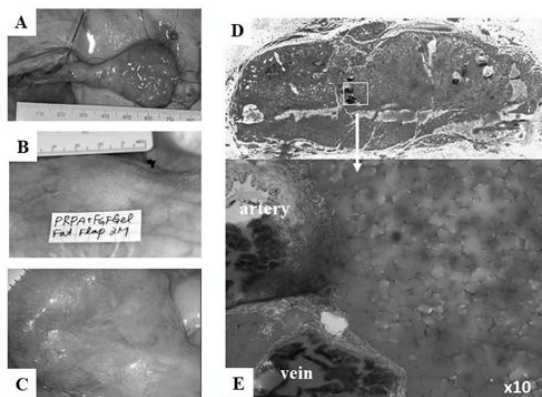


Figure 6. (A) An adipose flap in Group 12w. (B) Transposed adipose flap maintained its volume after three months implantation. (C) After five months, the adipose flap maintained its volume and showed a mature appearance. (D&E) Oil Red O staining showed the tissue was filled with mature large adipose cells.

(6)Chamber 留置部位の脂肪組織を除去したモデルを2羽施行した。脂肪再生量は減少し、周囲脂肪組織が脂肪再生に関与していることが示唆されることが示唆された。この実験は、現在も継続中である。

(7)線維芽細胞様細胞が fibrocyte の可能性があるかラットモデルで実験を行い二重染色法で調べた。ラットの4週、8週モデルで CD34+/Procollagen I+ double positive cells が認められたことから Fibrocyte が脂肪再生に関与している可能性が示された。

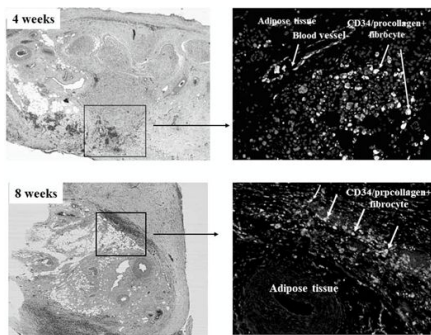


Figure 8. CD34⁺/procollagen I⁺ double-positive cells (white arrows) were observed in the inflammatory tissue surrounding the vascular pedicle.

(8)実験動物をさらに大きなミニブタにして実験を行った(臨床応用前実験)。

4ヶ月留置 chamber: 血管茎の周囲に脂肪再生が見られたが、ラビットに比べ再生脂肪組織の量は少なかった。

5ヶ月留置 chamber: 脂肪再生量は増加したが、中央の1/3程度であった。

6ヶ月留置 chamber: 再生組織の約50%が脂肪組織に置き換わっていた。

以上、研究は継続中であるが、ミニブタでは、ウサギよりも脂肪再生に要する期間が長くなることが示された。臨床応用では、脂肪細胞の再生にこれ以上の期間を要する可能性があることが示唆された。

ミニブタの鼠径部には脂肪組織が少なく、このような chamber 周囲の環境も脂肪再生に影響している可能性がある。

5. 主な発表論文等

Yoshio Tanaka, Yusuke Hamamoto et al.: Effects of platelet rich plasma on tissue-engineered vascularized flaps in an in vivo chamber. Journal of Plastic Reconstructive and aesthetic surgery 2018 DOI:10.1016/j.bps.2018.02.017 査読有

〔雑誌論文〕(計 1件)

〔学会発表〕(計 0件)

研究会 1件 第5回 DDS 再生医療研究会(於:大阪)

臨床応用を目指した in vivo Tissue Engineering Vascular Fat Flap の作製

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件): 出願していたが、今年度延長せず。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kms.ac.jp/>

[keisei/index.html](http://www.kms.ac.jp/keisei/index.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱本 有祐 (HAMAMOTO, Yusuke)

香川大学・医学部形成外科・助教

研究者番号: 10380180

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

上野 正樹 (UENO, Masaki)

香川大学・医学部炎症病理・教授

研究者番号 30322267

玉井 求宜 (TAMAI, Motogi)

香川大学・医学部形成外科・助教

研究者番号 9061727

木暮 鉄邦 (KOGURE, Tetsukuni)

香川大学・医学部形成外科・助教

研究者番号 404376795

(4)研究協力者

田中 嘉雄 (TANAKA, Yoshio)

香川大学・医学部形成外科・研究協力員

研究者番号 5017180