

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11532

研究課題名(和文) 血管柄付き立体再生臓器モデルの作成と灌流培養法の確立

研究課題名(英文) Development of Vascularized Three-Dimensional Regenerated Organ and Perfusion Model.

研究代表者

飯田 拓也 (Iida, Takuya)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00398603

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)：まず脂肪由来幹細胞の培養と人工骨への播種を行った。脂肪を酵素処理して幹細胞を培養後、人工骨に播種しさらに培養した。作成後に電子顕微鏡で観察した結果、scaffoldの表面にも細胞接着が認められ、また内部にも細胞が生着していた。続いてこれをヌードラットに埋入し人工骨皮弁モデルを作成した。顕微鏡下にラット大腿動静脈近傍に幹細胞播種済人工骨を埋入した。人工骨への血管の進入が十分進んだと思われる8週後に、血管柄付き骨皮弁として挙上した。摘出した組織はマイクロCTを用いて骨化の程度を評価したところ、高いbone mineral densityを認め、骨化が進んでいると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍や外傷等による組織欠損に対して、マイクロサージャリーを用いた自家組織移植が行われているが、皮弁採取部の犠牲が大きい。これを解決するために、再生医療を用いて少量の細胞から大きな組織・器官を作成し、再生組織を生体内に埋入して再生組織内への血管網の構築を図ることで“Prefabricated flap”として遊離皮弁を作成する技術の開発を行った。今回の研究では脂肪幹細胞を人工骨に播種してラット皮下に埋入し血管柄付き骨皮弁のモデルを作成できた。現時点では比較的小さな人工骨にとどまっているが、今後、血管様の組織を付加することによって、臨床に用いる大きな人工骨弁の作成が可能と思われる。

研究成果の概要(英文)：First, adipose-derived stem cells (ADSC) were cultured and seeded on artificial bone. ADSC were collected from the fat obtained by liposuction, which were then seeded and cultured on artificial bone. Electron microscope showed cell adhesion on the surface of the scaffold and engraftment inside. Subsequently, ADSC-seeded artificial bone was embedded near the femoral arteries of a nude rat to develop a vascularized bone flap model. Eight weeks after implantation, it was elevated as a vascularized bone flap. The degree of ossification was evaluated by micro-CT, and a high bone mineral density was observed.

研究分野：再建外科

キーワード：Reconstructive Surgery

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍や外傷などで生じた欠損に対して、現在、マイクロサージャリーを用いた自家組織移植が行われているが、皮弁採取部の犠牲や移植後の機能上の問題が大きい。同種移植も徐々に広がりつつあるがドナー不足の問題が残る。これらを解決する方法として少量の細胞から大きな組織・器官を作成しうる再生医療が注目されており、我々の再建外科領域への応用が期待されてきた。

## 2. 研究の目的

形成外科での遊離組織移植の技術を再生医療に応用し、再生組織を生体内に埋入して再生組織内への血管網の構築を図り、その後“Prefabricated flap”として移植可能な血管柄付き立体組織モデルの作成を目指す。

## 3. 研究の方法

### ・脂肪幹細胞の採取と培養

脂肪吸引で得られた脂肪を酵素処理して細胞 (SVF) を回収し、これを播種して培養開始した。培地は DMEM supplemented with 15%FBS を用いた。一週間後に継代 (day7) し、更に一週間後に sub-confluent 状態の細胞 (ASC-p1) を回収した。続いて ASC-p1 の細胞を scaffold (人工骨) に播種を行った。

### ・人工骨への ASC の播種と培養

人工骨は -TCP 気孔率 75% 直径 5 mm x 長さ 10 mm 円柱のものを用い、これを 96 well プレートに入れ、細胞懸濁液 (200 万個/300  $\mu$ L) を入れ、37  $^{\circ}$ C でインキュベート (懸濁液は DMEM supplemented with 15% FBS) した。これを 38 時間培養し、固定した後、電子顕微鏡で撮影した。

### ・ASC 播種済人工骨のラットへの埋入

続いて、この人工骨を血管柄付き骨皮弁とするために、ラット筋膜下に挿入した。ASC 播種済人工骨をヌードラット (SPF F344/Njcl-nu/nu) 鼠径部に埋入し、周囲の筋膜で被覆することで人工骨の皮弁モデルを作成した。

### ・埋入後組織の骨化の評価

人工骨埋入後 8 週間待機し、ASC 播種済人工骨への血管の進入が十分進んだと思われるころ、浅下腹壁動静脈を茎とする血管柄付き骨皮弁として挙上した。血管クリップを用いて 30 分阻血状態とした。摘出した組織は PFA に固定し、マイクロ CT を用いて bone mineral density を測定し、骨化の程度を評価した。

## 4. 研究成果

### ・人工骨への ASC の播種と培養

人工骨の scaffold の表面にも脂肪幹細胞の接着が認められ、また内部にも細胞が進入、生着し

ている所見が得られた(図1)。

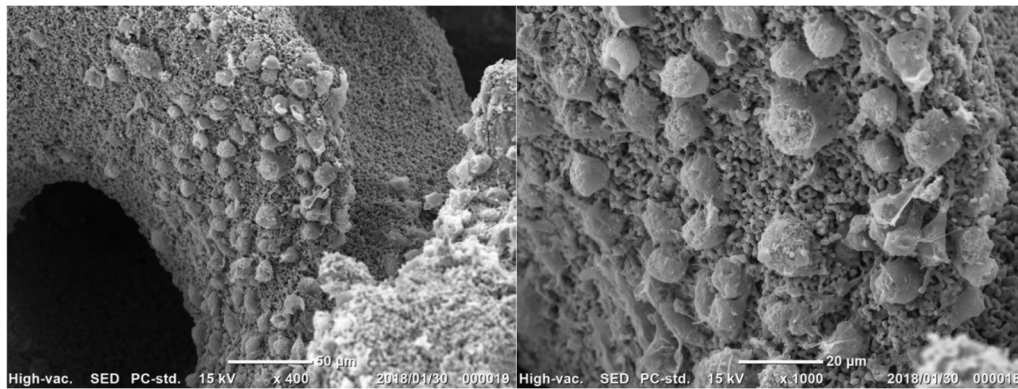


図1 ASC播種培養人工骨の電子顕微鏡像

scaffoldの表面へのASCの接着および、内部構造への進入を認めた

#### ・ASC播種済人工骨のラットへの埋入

ラットへの埋入は手術用顕微鏡下に大腿動静脈から浅下腹壁動静脈付近を剥離し、人工骨を挿入し、周囲の筋膜を9-0ナイロンで縫合した(図2)。人工骨埋入後8週間待機し、ASC播種済人工骨への毛細血管の進入が十分進んだと思われるころ、血管柄付き骨皮弁として挙上。30分のクランプ後、再度埋入した(図3)。

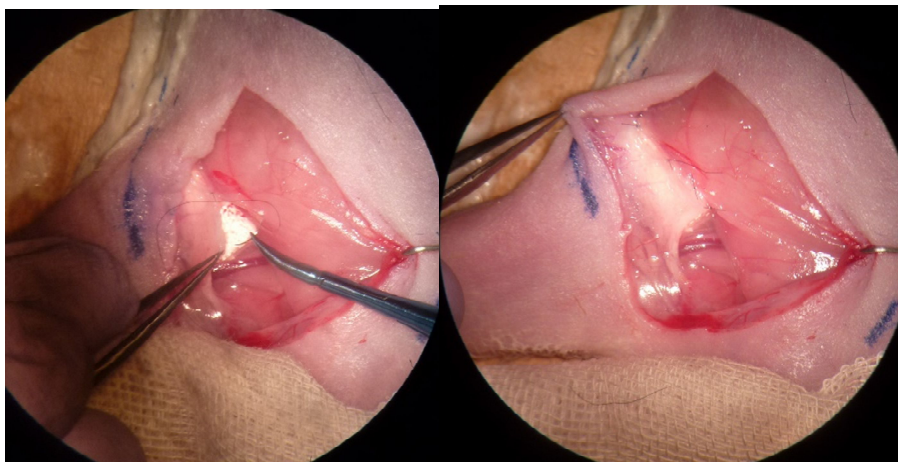


図2 ラットへのASC人工骨の埋入実験

ASC播種済人工骨をヌードラット(SPF F344/Njcl-nu/nu)鼠径部に埋入し、浅下腹壁動静脈近傍に配置し、周囲の筋膜で被覆することで血管柄付き人工骨の皮弁モデルを作成した。



図3 血管柄付き人工骨弁として挙上し、血管クリップを用いて阻血状態とした。

・埋入後組織の骨化の評価

ASC+人工骨をラット筋膜下に埋入した組織においては、コントロール(人工骨のみ)、人工骨+ASC (ラット埋入なし)に比べて bone mineral density が高く、骨化が進んでいた(図4 右)。従って、ラットに埋入した ASC+人工骨は骨としてある程度の強度を有すると考えられ、人工骨皮弁の有望な候補となりうると考えられた。

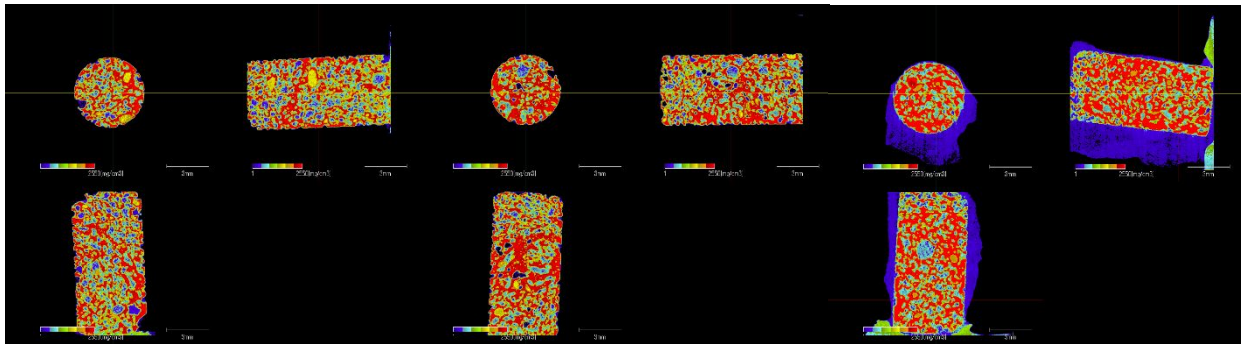


図4 マイクロCTを用いた Bone Mineral Density の評価

人工骨のみと人工骨+ASC では大きな違いはなかったが、人工骨+ASC を埋入したものではBMDの増加が認められた。左:人工骨のみ 中央:人工骨 + ASC 右:人工骨+ASC+埋入

現時点では比較的小さな人工骨(円柱状、直径5mm、長さ10mm)のものにとどまっているが、臨床に用いるためにはさらに大きな骨(腓骨では直径2-3cm程度)が必要となる。大きな人工骨では中心部へのASCの浸透性が悪くなることが予想され、人工骨中央まで幹細胞が到達・生着しない可能性がある。また皮弁化する際にも、周囲組織からの毛細血管の進入に時間を要したり、中央部の血流が不十分となって壊死が生じる可能性がある。これを克服するためには人工骨の気孔率(現在は75%)を大きくするだけでは不十分と考えられ、何らかの血管様の組織を付加することによって、骨中心部までの細胞の播種や灌流が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----