

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12809

研究課題名(和文)人工perifascial areolar tissue開発に向けた基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research for the development of artificial perifascial areolar tissue

研究代表者

宮永 亨(MIYANAGA, Toru)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：60566868

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)：Perifascial areolar tissue (PAT) graftは虚血組織である軟骨が露出した創にも良好に生着し、軟骨上を肉芽組織で覆い、肉芽組織の形成を促進した。PAT移植片の毛細血管がブリッジング現象によって虚血組織を横断し、露出した虚血組織上に血管を誘導した。また、CD34陽性組織前駆・幹細胞が遊走し、血管新生をさらに誘導することに加え、デコリンなどの血管新生を促進するECM分子や、HDGF、FGF2、PDGFDなどの創傷治癒を促進するサイトカインや成長因子が肉芽形成を促進したと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Perifascial areolar tissueは、創傷治癒を促進する組織幹細胞や細胞外マトリックス、サイトカイン・成長因子が豊富に含まれ、その移植により、虚血組織である軟骨上に肉芽組織を形成する能力が高いことがわかった。この学術的意義は、新たな再生医療への応用(PAT内幹細胞治療、サイトカイン治療、人工PAT組織作成)が期待される。社会的意義は低侵襲で効果的なPAT移植が普及すれば、それにより治療を受けた患者の身体的・精神的が軽減される。また、今後の再生医療への応用が可能なら、虚血組織への血管誘導を促進する材料として、画期的なオプションとなる。

研究成果の概要(英文)：PAT grafts could survive on cartilage exposure; they also had the greatest ability to cover the exposed cartilage with granulation tissue, to promote granulation tissue formation. Three factors were likely associated with improved healing of wounds with ischemic tissue on using the PAT graft. The first factor is the local administration of CD34+ regenerative progenitor/stem cells. The second factor was the addition of ECM proteins promoting vascularization and growth factors/cytokines promoting wound healing. The third factor can be explained by the survival process of the PAT graft. In PAT graft survival, capillaries cross the ischemic tissue through the bridging phenomenon, leading to the excellent healing of wounds with exposed ischemic tissue. PAT contains stem cells including tissue progenitor/stem cells and MSCs along with ECM molecules that promote angiogenesis and cytokines and growth factors that promote wound healing. Thus, PAT may be an excellent transplant material.

研究分野：創傷治癒

キーワード：血管網移植 CD34

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

『人工 perifascial areolar tissue (PAT) 開発に向けた基礎的研究』

perifascial areolar tissue (PAT)は血管網を有する粗結合組織であり、筋膜上に存在する。PATを移植することで、通常では治癒しにくい乏血組織上に血管網を再生させ、組織を修復することができる。しかし、PATの生着メカニズムや高い治療効果を示す要因は未知な部分が多い。本研究ではまず、PAT移植の治療効果メカニズムを解析する。代表者らはPAT内の多層性・水平方向の血管網が高い治療効果の要因と考えているが、その他の因子(幹細胞の存在、液性因子、基質)も含めて、広く詳細に解析する。次に、その分析結果を基に人工PATを開発し、臨床応用へ向けて機能評価を行う。人工PATが作製できれば、ドナーの侵襲がなく、豊富な移植材料が得られるため、血流不全が原因の疾患すべてに応用可能となる。人工PATの開発は医療に多大な功績を与えると確信している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、『PATの高い治療効果を示す理由を基礎的に検証し、その特徴を有した人工PATの開発を行うこと』である。PAT移植は最近5年間で急速に臨床での英語論文が報告されており、今後世界が注目する移植材料になることは間違いない。しかしPAT移植の治療効果メカニズムを解析した報告や人工PATの開発についての報告は国内外の発表・論文とにもない。また、代表者らは临床上多くのPAT移植を経験しており、その有用性を理解していると同時に、既に予備実験でPAT移植モデルを確立し、その有用性を基礎的にも認識している。従って、本研究の学術的独自性は臨床的・基礎的にPAT移植に精通している代表者らが『世界に先駆けてPATの基礎的研究および人工PATの作製を行うこと』である。

3. 研究の方法

まずは、PATの治療効果をウサギを用いて *in vivo* で検証した。

合計13匹のウサギを用い、腹部皮下に存在する血管網を有する結合組織(PAT)を採取した。採取したPATの一部は創傷移植片として使用し、残りのPATは組織学的および免疫組織化学的染色、質量分析などの詳細な組織分析に使用した。1耳ごとに皮膚全層欠損(直径2cm、正方形)を2カ所作成した。欠損の中央部では、軟骨周囲を除去して軟骨を露出させた(直径1cm、正方形)。この手術は両耳で行われた。皮膚欠損層をPAT群、皮膚代用物(DS)群、対照群に無作為に分けた。PAT群では、PAT移植を、DS群では人工真皮を欠損部位に移植した。対照群では、このようなグラフトは使用しなかった。全群ともポリウレタンフィルムドレッシング(TegaDerm, 3M, Minneapolis, MN)で被覆し、6-0ナイロンで固定した。各実験期間(7日または14日)に安楽死後、創傷部位を切除し組織・免疫組織化学染色を行った。組織はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、抗CD31、ラット抗CD34、マウス抗S100タンパク質、マウス抗平滑筋抗体(aSMA)などの一次モノクローナル抗体を用いた。

・創の評価

各創傷は7日目および14日目に写真撮影を行った。創傷の特徴(肉芽、血管、軟骨の露出)を評価した。

・創の長さ

角層と肉芽組織の境界を上皮化点と定義した。創の全長は、上皮化点と反対側の上皮化点との間で測定した。

・軟骨露出率

露出した軟骨を測定し、軟骨の露出率を以下のように算出した。

軟骨露出率=(軟骨露出長)/(創部全長)

・肉芽組織の厚さ

露出した虚血組織の肉芽組織形成を評価するために、軟骨周囲欠損部の最も厚い肉芽組織を測定した。各創傷は7日目および14日目に写真撮影を行った。創傷の特徴(肉芽、血管、軟骨の露出)を評価した。

・フローサイトメトリー

ウサギの末梢血、採取したPAT、大腿骨骨髓を採取し、CD34陽性細胞数をフローサイトメトリーで計測した。

4. 研究成果

PAT移植は露出軟骨上でも生着した。コントロール群や皮膚代用群に比べ、PAT移植群は露出した軟骨を肉芽組織で覆い、肉芽組織形成を促進し、創傷治癒を促進する能力が最も高いことがわかった。血管前駆細胞・幹細胞のマーカーであるCD34陽性細胞が、血液や骨髓よりもPATの方が数多く存在することが分かった。また、PATは血管網周囲だけでなく、血管の存在しない組成結合組織にもCD34陽性細胞が局在していた。質量解析の結果、再生前駆細胞/幹細胞(CD34+細胞、CD90+細胞)血管新生を促進する15個の細胞外マトリックス(ECM)分子、および細胞増殖、移動、骨格構成、生存、血管新生、安定化に関わるいくつかの成長因子とサイトカインを有して

いた。

生着過程は、移植 1 週間後、PAT の毛細血管はブリッジング現象によって生き残り、生き残った再生前駆細胞 / 幹細胞は新生血管を形成することができた。非生存の再生前駆細胞 / 幹細胞は、血管新生を促進し、レシピエント由来の幹細胞の移動を誘導する間接的パラクラインの役割を果たすことができると考えられた。

したがって、PAT には、組織前駆・幹細胞や MSC などの幹細胞、血管新生を促進する ECM 分子、創傷治癒を促進するサイトカインや成長因子が含まれており、PAT は優れた移植材料となる可能性がある。今後、この PAT 移植による創傷治癒改善効果が、前駆細胞および幹細胞の存在によるものなのか、血管新生を促進する細胞外マトリックスによるものなのか、PAT に含まれるサイトカインや成長因子によるものなのかを検証する必要がある。このような因子が解明されれば、人工 PAT の作成に段階を移していく予定である。

現在、論文投稿中であり、図や詳細な数値については割愛する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮永 亨
2. 発表標題 軟骨露出創に対するPAT移植の創傷治癒改善効果
3. 学会等名 第31回日本形成外科基礎学術集会
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	亀井 譲 (KAMEI Yuzuru) (10257678)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	蛭沢 克己 (EBISAWA Kathumi) (20397459)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	上田 善道 (UEDA Yoshimichi) (50271375)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	
研究分担者	米倉 秀人 (YONEKURA Hideto) (80240373)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	高成 啓介 (TAKANARI Keisuke) (80378190)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	吉富 泰央 (YOSHITOMI Yasuo) (80399039)	金沢医科大学・医学部・講師 (33303)	
研究分担者	宮永 葵子 (MIYANAGA Aiko) (80782367)	金沢医科大学・看護学部・講師 (33303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関