

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18905

研究課題名(和文)細胞の伸展と組織浮腫に注目した体外式組織拡張器による組織増大の機序解明

研究課題名(英文)Elucidation of the Mechanism of Tissue Augmentation by External Tissue Expanders Focusing on Cell Stretch and Tissue Edema

研究代表者

井上 牧子(inoue, makiko)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・特任助教

研究者番号：10837925

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文): 体外式組織拡張器は体表面から一定期間陰圧をかけることで皮下組織の増大を図る機器で良好な臨床成績が報告されていたが、基礎的な検討はあまり行われていなかった。本研究の目的は形成外科領域における体外式組織拡張器の機序を解明することであった。皮下組織を構成する細胞に対し長周期伸展培養を行い、脂肪組織由来幹細胞において脂肪細胞への分化促進およびbFGFの分泌促進があることを示した。次にマウス背部に自作の体外式組織拡張器を取り付け、1日10時間の吸引を行い組織学的検討を行った。今回の新たな知見として長周期長期間の体外式組織拡張器の装着によりbFGFの発現の増強が引き起こされることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年本邦での乳がんの罹患率は上昇しており、乳癌の手術を受ける患者は増加傾向である。また体内式組織拡張器による乳房再建を受ける患者も増えている。体外式組織拡張器は従来の体内式と比較し、低侵襲、低コストな治療法である。また、近年の細胞工学の発達により、ヒト幹細胞の臨床応用が盛んになっているが、乳房再建の分野においても脂肪幹細胞の臨床利用が行われ始めている。体外式組織拡張器は脂肪幹細胞の移植などの併用が容易であり、今後の活用が期待される。体外式組織拡張器の機序を解明することにより、これらの臨床応用において、より高い効果を得ることが可能になることが期待される。

研究成果の概要(英文): Although good clinical results have been reported with external tissue expanders that increase subcutaneous tissue by applying negative pressure from the body surface for a certain period of time, there have been few basic studies on the use of these devices. The purpose of this study was to elucidate the mechanism of external tissue expanders in the field of plastic surgery. We performed long-cycle extension culture of cells constituting subcutaneous tissue and demonstrated that adipose tissue-derived stem cells promote differentiation into adipocytes and secretion of bFGF. Next, a homemade external tissue expander was attached to the back of mice and aspirated for 10 hours a day for histological examination. Our new findings show that long-cycle, long-term application of an external tissue expander induces enhanced expression of bFGF.

研究分野：形成外科

キーワード：体外式組織拡張器 線維芽細胞成長因子 線維芽細胞 脂肪前駆細胞 血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体外式組織拡張器はアメリカで 1999 年に Khouri らによって Brava®として開発された [1] (図 1 [2]より引用)。これは乳房の体表面から一定期間、陰圧をかけることで皮膚及び皮下組織の増大を図る医療機器であり、1 日 10 時間、10 週間の使用で良好な臨床成績 [3]が報告された。Brava®の基礎的な検討はほとんどなされていないが、Kato らは体外式の組織拡張器により脂肪増大が起こるが可逆的反応であること、それが塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)によって起こることを示した [4]。



体外式組織拡張器を使うと細胞レベルでは細胞を伸展させることとなる。伸展培養については種々の細胞で行われており、脂肪細胞を機械的に伸展する基礎実験では、脂肪生成や分化が抑制されるとの報告が複数 [5] [6] [7] [8]ある。これらの実験では、1 分あたり 1-60 回と頻回の伸展刺激であり、Brava®と同じ長時間の伸展刺激の検討はされていない。また Wilkins ら [9]は血管内皮細胞の 1Hz、および 1/12Hz の伸展培養で血管新生に差があると述べている。線維芽細胞の 0.1 回/分の伸展培養においては 20% 伸展よりも 10% 伸展が細胞増殖に優れていたとする報告 [10]がある。これらはいずれも頻回の伸展刺激を加えており、長周期の伸展刺激の報告ではない。最近 Lujan-Hernandez ら [11]により体外式組織拡張器による 1 日に 2 時間の長周期伸展刺激の報告があり、脂肪細胞数の増加、浮腫液の増加、炎症を示す CD45 陽性細胞の増加についての言及はあった。体外式組織拡張器による脂肪細胞の増加という結果が報告される一方で、脂肪細胞増加のメカニズムは未だ明らかでない。

2. 研究の目的

長周期伸展培養と組織浮腫が脂肪組織増大に対し、効果的であることが明らかになれば、脂肪注入移植による豊胸術及び乳房形成術の際に、体外式組織拡張器を用いて組織拡張を行う科学的な根拠となる。また、体外式組織拡張器を用いた組織拡張が更に普及すれば、形成外科領域全般においても、脂肪組織などを新たに得る手段として発展する可能性がある。

これらの背景を踏まえて体外式組織拡張器で皮膚・皮下組織を伸展した場合にどのような効果がでるかを各構成細胞ごとに検証することを目的として以下の研究をおこなった。

【実験 1】脂肪細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞に対していままで行われていない長周期の伸展培養を行い細胞増殖や増殖因子の変化を検討し、どの細胞の役割が大きいのかを調査した。

【実験 2】動物実験において体外式組織拡張器を用いてマウスの背部皮膚吸引モデルを作成し、背部皮膚を採取し、組織学的変化とサイトカインの分泌を調査した。

3. 研究の方法

【実験 1】

・使用細胞

血管内皮細胞 (mouse 由来 P3)、線維芽細胞 (mouse 由来 P4)、脂肪組織由来幹細胞 (Rat 由来 P1) を使用した。非伸展群および伸展群を設け、各 n=1 とした。

・培養方法

Collagen Type I (NIP) にてコーティングした培養細胞伸展システム (STB-140 ストレックス) 及び有効面積 4 cm² のシリコンチャンバー (ストレックス) (図 2) において伸展培養を行った。4 日間 1 日 10 時間の伸展を行った。伸展の頻度は 1 分 10 往復 (休止時間 0 分)、15% 伸展とした。



・測定

1 日 1 回伸展終了時にセルカウンターによる細胞数の測定

1 日 1 回伸展終了時に顕微鏡にて観察

最終日に培地を回収しサイトカイン (bFGF) を ELISA にて測定した。

【実験 2】

・使用動物 ノードマウス (Balb/cSlc- nu/nu)

・体外式組織拡張器 半球ドーム、延長チューブ、ハイドロコロイド材、ポリウレタンフィルムを用いて陰圧装置 (図 3) を自作し、陰圧ポンプと接続した。

・方法

陰圧装置をノードマウスの背部に固定し、0.004MPa の陰圧をかけて 1 日 10 時間、4 日間吸引

した(図4)。吸引群はn=4、非吸引群はn=2とした。4日目にマウスに背部皮膚を採取してヘマトキシリンエオジン染色(HE染色)とbFGF免疫染色を行った。



図3



図4

4. 研究成果

【実験1】

結果1

血管内皮細胞では、伸展群において非伸展群に比較してより多くの細胞の増殖を認めたが、伸展開始後4日目に細胞の剥脱が見られた(図5a、図6)。脂肪組織由来幹細胞においては非伸展群においては増殖が認められたが、伸展群においては細胞数の減少が認められた。検鏡上は浮遊細胞の増加がみられ、脂肪細胞への分化が示唆された(図5b、図7)。線維芽細胞においては伸展群・非伸展群ともストレッチチャンバーからの剥脱が認められ、細胞数を正確に数えることが困難であった。線維芽細胞の伸展群では、伸展前にはわずかに接着していた細胞も多くが剥脱した(図5c、図8)。

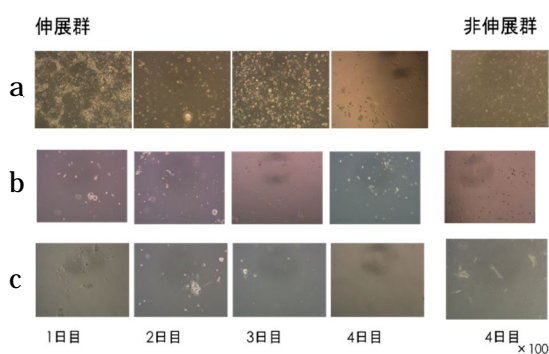


図5

細胞数(赤=伸展群、青非伸展群)

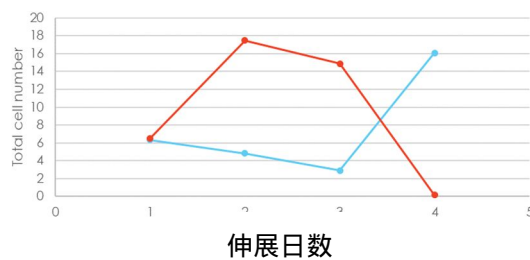


図6 血管内皮細胞

細胞数(赤=伸展群、青非伸展群)

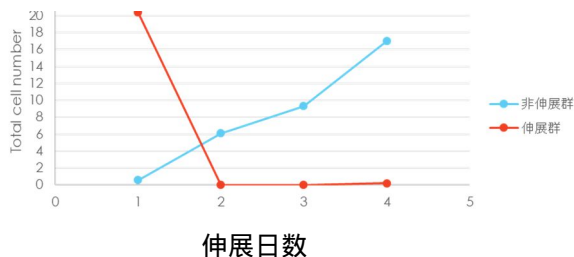


図7 脂肪前駆細胞

細胞数(赤=伸展群、青非伸展群)

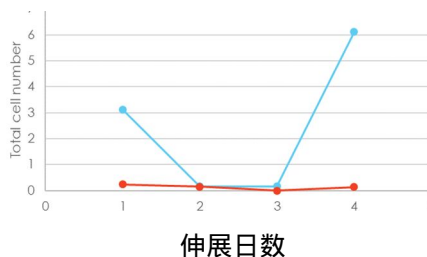


図8 線維芽細胞

結果 2

各日の培地内の bFGF 濃度を測定した。脂肪由来幹細胞の伸展群においてのみ分泌量の増加を認めたが伸展 3 日目からは濃度が低下した。血管内皮細胞および線維芽細胞においては検出範囲外であった (図 9)。

濃度 (pg/ml) (赤 = 伸展群、青 = 非伸展群)

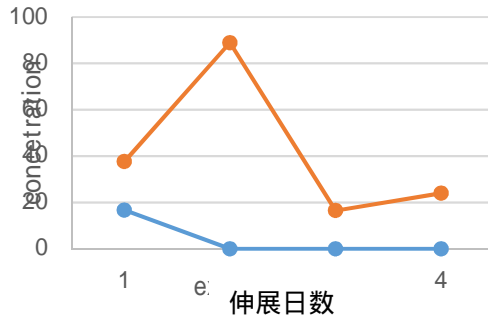


図 9

【実験 2】

結果 1 外表上の変化

外表からの所見では、伸展群において皮膚のしわの増加が認められた。皮下組織の明らかな液体貯留は認めなかった。(図 10)



コントロール

伸展群

図 10

結果 2 HE 染色標本の血管数

伸展群では皮内・皮下出血および拡張した血管が多く見られ(図 11)、またコントロール群と比較して血管数の増加傾向が見られた(図 12) (p=0.09 Wilcoxon rank sum test)。浮腫・炎症細胞の浸潤は認められなかった。

結果 3 bFGF 免疫染色

bFGF 免疫染色標本を蛍光顕微鏡で観察し、複数視野で bFGF 発現部分の面積と組織の面積を計測し、bFGF の検出率を求めた。伸展群において、血球(赤▼)・皮下組織の細胞の細胞質(黄▼)で bFGF の発現が強く認められた(図 13 および図 g) (bFGF: 緑色、核: 青色)

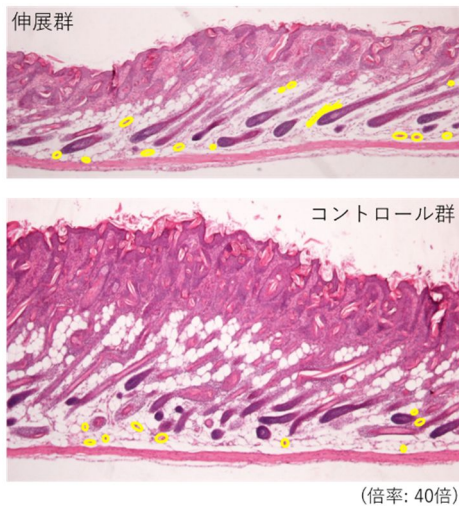


図 11

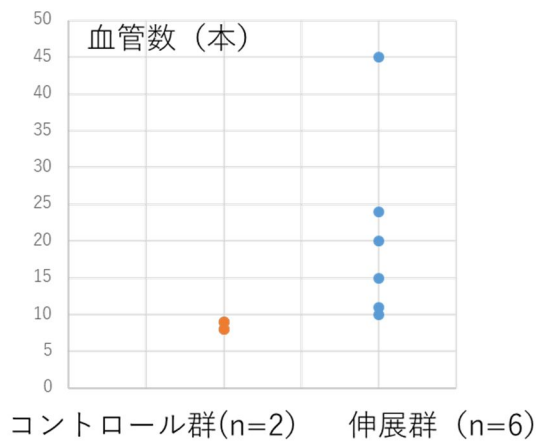


図 12

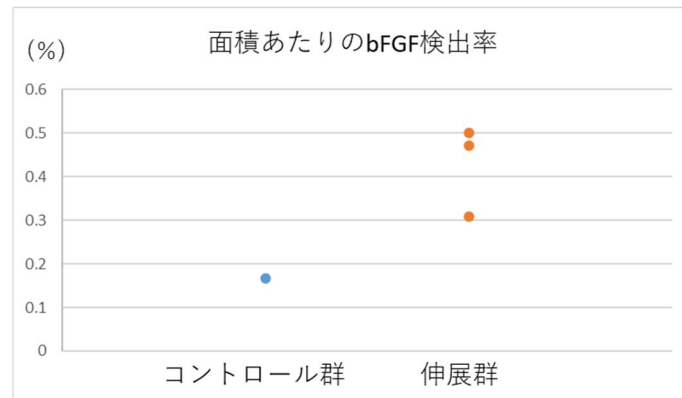
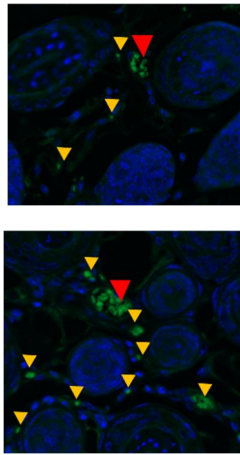


図 13(a)コントロール群 (b) 伸展群 (c)面積あたり bFGF 検出率

<引用文献>

1. Aesthetic Applications of Brava-Assisted Megavolume Fat Grafting to the Breasts. **Khouri R.K, et al.** 2014 年, *Plast Reconstr Surg*, 133, ページ: 550.
2. Breast Enlargement Without Surgery: Fact or Fiction. (オンライン) <https://www.ambrosiaclinic.com/breast-enlargement-without-surgery-fact-or-fiction/>.
3. The Brava external tissue expander: is breast enlargement without surgery a reality? **Schlenz I, et al.** 2007 年, *Plast Reconstr Surg.*,122, ページ: 1680-9.
4. Reversible adipose tissue enlargement induced by external tissue suspension: possible contribution of basic fibroblast growth factor in the preservation of enlarged tissue. **Kato, et al.** 2010 年, *TISSUE ENGINEERING:Part A*,16, ページ: 2029-40.
5. 機械的伸展刺激による脂肪細胞分化の抑制機構. **田辺由幸, 中山貢一.** 2004 年, *日本薬理学雑誌* 124 巻 5号, ページ: 337344.
6. Mechanical stretch inhibits myoblast-to-adipocyte differentiation through Wnt . **Akimoto T, et al.** . 2005 年, *Biochem Biophys Res Commun.*329, ページ: 381-385.
7. Mechanical stretch inhibits adipogenesis and stimulates osteogenesis of adipose stem cells. **Yang X, et al.** . 2012 年, *Cell Prolif.* 45, ページ: 158-166.
8. Low-Frequency Mechanical Stimulation Modulates Osteogenic Differentiation of C2C12 Cells. **Khayat G, et al.** 2012 年, *Differentiation* 83, ページ: 179-184.
9. Differential effects of cyclic stretch on bFGF- and VEGF-induced sprouting angiogenesis. **Wilkins JR, et al.** 2014 年, *Biotechnol Prog.* 30, ページ: 879-88.
10. Exposure to varying strain magnitudes influences the conversion of normal skin fibroblasts into hypertrophic scar cells. **Kuang R, et al.** 2016 年, *Ann Plast Surg* 76, ページ: 121-131.
11. Induction of Adipogenesis by External Volume Expansion. **J Lujan-Hernandez, et al.** 2016 年, *Plast Reconstr Surg* 137, ページ: 123-131.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上牧子, 森弘樹
2. 発表標題 皮下組織を構成する各種細胞の長周期伸展培養の影響について
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上牧子, 細江れい, 森弘樹
2. 発表標題 体外式組織拡張器装着によるマウス背部皮下組織の血管新生の機序の解明
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------