

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592649

研究課題名(和文) ファイブロサイト及び関連幹細胞による皮弁生着・延長、創傷治癒の新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of new treatments for the flap survival and wound healing using fibrocyte or relevant stem cells.

研究代表者

吉本 浩 (Yoshimoto, Hiroshi)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：90513309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：創傷動物モデルとしてマウスの下肢リンパ浮腫モデルとラットの下肢虚血肢モデルを作成した。それぞれの動物モデルに脂肪幹細胞を投与し下肢リンパ浮腫モデルではリンパ管の再生を確認した。下肢虚血肢モデルでは、虚血肢の血行改善を確認した。さらに脂肪幹細胞と投与に加え、皮弁を虚血肢に移植すると、さらなる血行改善を認めた。

今研究で作成した2つの創傷動物モデルは様々な幹細胞や細胞移植による組織再生、血流改善効果および創傷治癒促進に応用でき、臨床への新規治療法の開発に役立つと考える。

研究成果の概要(英文)： We have developed two new animal models of a lower extremity lymphedema mouse model and a lower extremity limb ischemia rat model. In the lymphedema model we confirmed regeneration of lymphatic vessels in the lymphedema model using adipose-derived stem cell transplantation. In the limb ischemia model we confirmed the improvement of blood circulation. We found to further improve blood circulation using combined adipose-derived stem cells and flap transplantation.

We think our two new animal models are available for the development of novel therapies using various stem cells and drug agents.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：幹細胞 創傷治癒 リンパ浮腫動物モデル 虚血肢動物モデル

1. 研究開始当初の背景

様々な体性幹細胞や前駆細胞が創傷治癒促進あるいは遅延に關与している多くの報告があった。またやケロイド・肥厚性癬痕などの過剰線維疾患に対しても同様の体性幹細胞や前駆細胞が關与している報告があった。創傷治癒遅延と過剰線維疾患を一連の疾患群として捉えられないかと推定し、その病態や成因に關与する体性幹細胞や前駆細胞があると示唆されていた。それらの細胞の中であまり研究がすすんでいない Fibrocyte (ファイブロサイト、線維細胞)は循環血中の単核球細胞分画に存在し、組織修復に關与するさいぼうとして同定されており、細胞外マトリックスの産生、筋線維芽細胞前駆細胞などの報告があり、創傷治癒や過剰線維疾患にかかわりが深いと類推し、Fibrocyte の細胞の分離・同定および皮弁生着・延長・創傷治癒効果に対する基盤研究を提案させて頂いた。

2. 研究の目的

(1) Fibrocyte の分離、同定、回収および培養を行う。

(2) 創傷動物モデルに Fibrocyte あるいはほかの体性幹細胞を移植し、皮弁生着や創傷治癒効果を検討し、評価する。

3. 研究の方法

(1) Fibrocyte の抽出と培養および脂肪幹細胞の抽出と培養

近交系マウス(BALB/C、雌)から採取した全血よりフィコールを使用して単核球細胞分画を採取しフローサイトメトリーで Fibrocyte の膜表面マーカーである CD45, CD34, ビメンチン陽性細胞数を計測する。

マウスの全血より単核球細胞分画を採取し細胞培養を行い、増殖後、フローサイトメトリーでの抗体の陽性細胞数を計測する。培養条件を調整して陽性細胞が安定して採取できるようであれば、フローサイトメトリーで陽性細胞だけ回収し解析および創傷動物モデルへの移植へ使用する。

マウスあるいはラットの単徑部あるいは腹腔内(生殖器周囲、後腹膜)から脂肪組織を採取し、セレースで処理により、細胞抽出し、培養を行う。培養増殖後に培養液をデキサメサゾンやインシュリンなどが入った分化培養液へ交換し細胞が脂肪細胞へ分化することを確認する。必要であれば、フローサイトメトリーで細胞膜表面マーカー(CD39, CD90 など)を確認する。培養増殖した細胞は創傷動物モデルへの移植に使用する。

(2) マウス下肢リンパ浮腫モデルの作成と脂

肪幹細胞移植によるリンパ管再生

マウスの単徑部に 30Gy の X 線を照射し、1 週間後、同部の皮膚を全周性に切開し、事前に蛍光色素を使ったリンパ管蛍光造影で同定していたリンパ節と集合リンパ管を顕微鏡下に除去する。切開した皮膚は隙間を作るように筋肉に縫着する。

で作成した下肢リンパ浮腫モデルの患肢に培養増殖した脂肪幹細胞を局注し、リンパ管蛍光造影、肉眼的および病理学的評価を行った。

(3) ラット下肢虚血肢モデルの作成と脂肪幹細胞移植および皮弁負荷による虚血改善

ラットの下肢に 30Gy の X 線を照射し、単徑部に皮膚切開を加え、顕微鏡下に下肢を栄養している血管(動静脈)を切離する。足底部に皮膚欠損創を作成する。

で作成した虚血肢モデルに患肢に培養増殖した脂肪幹細胞のみを局注する群、脂肪幹細胞を局注および腹壁皮弁を患肢に移植する群およびコントロール群(以外の処置を行わない群と皮弁の代わりに植皮を行う群の 2 群)で肉眼的評価、足底の創傷治癒の評価および血流ドップラーでの血行改善の評価を行った。

4. 研究成果

(1) マウス全血より単核球細胞分画を採取しフローサイトメトリーで Fibrocyte の膜表面マーカーである CD45, CD34, ビメンチンがすべて陽性の細胞を確認したが陽性細胞数は少量であったため、単核球細胞分画を採取し、細胞培養を行った。しかし、Fibrocyte の形態を維持したままの細胞増殖は困難で、様々な培養条件を試みたが成功しなかった。したがって Fibrocyte の解析も実験できなかった。また、創傷動物モデルにも、移植する十分な数の Fibrocyte が培養増殖できなかったため、脂肪由来幹細胞を移植して評価した。

(2) 下肢リンパ浮腫モデルに脂肪幹細胞を移植しない群ではリンパ管の再生は認めなかったが、脂肪幹細胞を注入した群では、肉眼的に浮腫が改善し、リンパ管蛍光造影および病理学的解析でリンパ管の再生を確認した。現在、リンパ浮腫の治療はリンパ管静脈吻合が一定の効果が得られているが、罹病期間が長いリンパ浮腫の患者では、バイパス効果の高いリンパ管がないことがあり、リンパ管静脈吻合が行えないことが多い。そのような患者にも幹細胞投与によるリンパ管再生が期待され、新規治療法になりうる方法だと考えられる。

(3) 下肢虚血肢モデルに脂肪幹細胞を移植

しない群では血行および足底の皮膚欠損創の改善はなく、半数は下肢が壊死になるが、脂肪幹細胞移植群では下肢が壊死になることはなく、血行改善および皮膚欠損創の治療を認めたが、脂肪幹細胞と皮弁の同時移植群のほうが、さらに高い血行改善を認めた。現在、虚血肢に対して幹細胞移植が試みられているが、高い治療効果は認めていないのが現状である。今研究で高い効果を認めた幹細胞と皮弁の同時移植を行うことで、幹細胞移植のみで改善しなかった虚血肢への治療効果が期待できると考えられる。また、この下肢虚血肢モデルは他の幹細胞や薬物の効果判定にも応用できると思われる。

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 4件)

Akita S, Yoshimoto H, Akno K, Yamashita S, Hirano A, Early experiences with stem cells in treating chronic wounds, Clin Plast Surg, 査読有、39(3)巻, 2014, 281-292

Yoshimoto H, Hamuy R, Breast reconstruction after radiotherapy, Adv Wound Care (New Rochelle), 査読有、1;3(1)2014, 12-15

Hamuy R, Kinoshita N, Yoshimoto H, Hayashida K, Houbara S, Nakashima M, Suzuki K, Mitsutake N, Mussazhanova Z, Kashiya K, Hirano A, Akita S, One-stage simultaneous skin grafting with artificial dermis and basic fibroblast growth factor successfully improves elasticity with maturation of scar formation, Wound Repair and Regene 査読有、21(1), 2013, 141-154

Akita S, Yoshimoto H, Ohtsuru A, Hirano A, Yamashita S, Autologous adipose-derived regenerative cells are effective for chronic intractable radiation injuries, Radiat Prot Dosimetry, 査読有、151(4), 2012, 656-660

[学会発表](計 10件)

Yoshida S et al, Wound healing and angiogenesis through combined use of a vascularized tissue flap and adipose derived stem cells in a rat hindlimb ischemia model, The Symposium on Advanced Wound Care/Wound Healing Society 2014, 2014年4月, Orland, USA

秋田 定伯, 培養脂肪幹細胞の細胞分化

制御と小胞体ストレス増強とアポトーシス誘導、第22回日本形成外科学会基礎学術集会、2013年11月、新潟市、新潟県

Yoshimoto H, Treating inflammatory bowel disease with adipose derived regenerative cells, 3rd annual meeting of Cell Society, 2013年9月, San Diego, USA

Akita S, Adipose-derived regenerative cells increase fat tissue volume in lipotrophy and successfully heal intractable wounds, 3rd annual meeting of Cell Society, 2013年9月, San Diego, USA

秋田 定伯, 脂肪幹細胞と放射線障害、脂肪変性疾患に対する小胞体ストレス及び bystander response、第5回日本創傷外科学会、2013年7月、京都市、京都府

Yoshida S, Adipose-derived stem cell transplantation for therapeutic lymphangiogenesis in a mouse model of lymphedema, SAWC/WHS annual meeting, 2013年5月、Denver, USA

吉田周平等、下肢リンパ浮腫モデルにおける脂肪由来幹細胞を用いたリンパ管再生療法、第21回日本形成外科学会基礎学術集会、2012年10月、猪苗代町、福島県

吉本 浩、サイトカインと人工真皮及び自家皮膚の同時植皮の検討、第4回日本創傷外科学会、2012年7月、福岡市、福岡県

Yoshimoto H, Adipose-derived cells improves inflammatory bowel disease by diminishing pains and wound healing, The 11th Japan-Korean Congress of Plastic and reconstructive Surgery, 2012年5月、淡路島、兵庫県

Yoshimoto H, Autologous adipose derived regenerative cells therapy for chronic radiation injuries, The 8th Asian-Pacific burn congress, 2011年9月、Bankok, Thailand

[図書](計 1件)

吉本 浩 他、克誠堂出版株式会社、創傷のすべて「第 章 癒痕・肥厚性癒痕・ケロイド・癒痕拘縮 3. 肥厚性癒痕・ケロイドの非手術的治療 圧迫療法、ステロイド局所注射など」、2012, 347-349

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉本 浩 (Yoshimoto, Hiroshi)
長崎大学病院・形成外科・助教
研究者番号：90513309

(2)研究分担者

秋田 定伯 (Akita, Sadanori)
長崎大学病院・形成外科・講師
研究者番号：90315250

(3)連携研究者

林田 健志 (Hayashida, Kenji)
長崎医療センター・形成外科・医師
研究者番号：50599933