

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670774

研究課題名(和文)自家脂肪由来幹細胞による放射線潰瘍の治療と予防および再照射への試み

研究課題名(英文)Autologous adipose-derived stem cell therapy for radiation injuries

## 研究代表者

吉本 浩(YOSHIMOTO, Hiroshi)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：90513309

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文): 放射線皮膚障害の動物モデルであるラット下肢虚血肢およびマウス下肢リンパ浮腫モデルに、脂肪由来幹細胞を移植すると、それぞれ虚血および浮腫の改善を認めるが、脂肪由来幹細胞単独投与でなく、血行が豊富な皮弁あるいはリンパ節移植を併用すると、さらなる改善効果を認めた。  
放射線皮膚障害部位への脂肪由来幹細胞の単独投与でも効果があるが、同時に血行が豊富な組織移植を行うと、より高い治療効果が期待され、重度の局所放射線障害への治療に応用できると考える。

研究成果の概要(英文): We recognized the improvement of ischemia and edema each with adipose-derived stem cells transplantation in a lower extremity ischemia rat or a lower extremity lymphedema mouse which are an animal model of the radiation injury. We also recognized a further improvement effect in combination of vascularized tissue transplantation and adipose-derived stem cells transplantation than adipose-derived stem cells alone transplantation.  
Radiation wounds are usually treated with adequate debridement and vascularized tissues transplantation. We think a further improvement effect in combination of vascularized tissue transplantation and adipose-derived stem cells transplantation for treatment of radiation injury.

研究分野：創傷治癒学

キーワード：脂肪由来幹細胞 創傷治癒 放射線皮膚障害

## 1. 研究開始当初の背景

がんの治療法としての放射線療法は年々増加しており、日本放射線腫瘍学会の調査では 2009 年に放射線治療を受けた患者さんは 217,829 人と報告されている。別の報告では、放射線照射の 10,000 ~ 100,000 回に 1 回の頻度で放射線障害が起こるとされている。また、局所の放射線照射線量には限度があり、がんが照射部位に再発した場合には再照射は出来ない。

放射線照射による皮膚障害に対して脂肪由来幹細胞の投与が皮膚障害を改善することが知られていたが、幹細胞がどのようなメカニズムで治療効果の役割を果たしているか明らかではなかった。

EGFP(Enhance Green Fluorescent Protein) 遺伝子組み換え SD ラットの脂肪組織より抽出した幹細胞を放射線皮膚障害動物モデルに投与して、治療過程での脂肪由来幹細胞の役割を解析する。治療した動物モデルに放射線の再照射および脂肪由来幹細胞の再投与を行い解析する挑戦的萌芽研究を提案させていただいた。

## 2. 研究の目的

脂肪由来幹細胞投与による放射線皮膚障害の治療過程での脂肪由来幹細胞の役割を解明する。

脂肪由来幹細胞投与により治療した放射線皮膚障害部位に放射線を再照射および脂肪由来幹細胞を再投与して放射線の抵抗性を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1)放射線皮膚障害モデルに脂肪由来幹細胞移植の検証

EGFP 遺伝子組み換え SD ラットの脂肪組織(腹腔内および単径部)より間葉系幹細胞を分離し培養する。分離した細胞の増殖能を確認および脂肪分化誘導培養培地に交換し、特殊染色で分化能を確認した。

SD ラットの背側に X 線放射線 30Gy を局所照射して、照射部位の肉眼的及び組織学的検証を継続的に行う。同時に照射部位に照射直後に皮膚欠損創を作成し同様な検証を行う。皮膚潰瘍部あるいは皮膚欠損創の治療期間が短い場合は、照射線量を 40Gy あるいは 50Gy に増加して検証し最適な放射線皮膚障害モデルを作成する。

放射線皮膚障害モデルに EGFP でラベルした脂肪由来幹細胞移植による創傷治療過程を検証する。検証項目は創の縮小率、治療までの期間、組織学的に真皮や肉芽組織の厚さ、新生血管の数などである。また、脂肪由来幹細胞の投与する時期を照射前、照射直後、照射後 1 日、2 日などより違いがないかを検討し、その結果次第で複数回投与が有効かどうかとも検討する。

で治療した部位に放射線を再照射し肉眼的及び組織学的に検証する。脂肪由来幹細胞を再照射前、再照射直後あるいは複数回投与して、その治療効果を検証する。

### (2)ラット下肢虚血肢モデルに脂肪由来幹細胞移植および有茎皮弁移植による虚血改善の検証

ラットの下肢に 30Gy の X 線を照射し、単径部に皮膚切開を加え、顕微鏡下に下肢を栄養している主要動脈を切離して下肢虚血肢モデルを作成する。また、患肢の足底部に皮膚欠損創を作成し創傷治療過程を検証する。

で作成した虚血肢モデルに患肢に培養増殖した脂肪由来幹細胞のみを局注する群、脂肪幹細胞局注および有茎(血行がある状態)の腹壁皮弁を患肢に移植する群で虚血肢の肉眼的と病理学的評価、足底の創傷治療の評価を行った。また、EGFP でラベルした脂肪由来幹細胞を移植して、どのような細胞に分化あるいは分布しているかを検証した。

### (3)マウス下肢リンパ浮腫モデルに脂肪由来幹細胞移植あるいはリンパ節移植によるリンパ管再生の検証

マウスの単径部に 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、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し、下肢リンパ浮腫モデルを作成する。

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由来幹細胞を局注し、リンパ管蛍光造影、肉眼的および病理学的評価を行い、創傷治療過程を検証する。

下肢リンパ浮腫モデルに腹部のリンパ節を有茎(血行がある状態)で単径部に移植し、さらに脂肪由来幹細胞も同時に移植して、創傷治療過程を検証する。

## 4. 研究成果

(1) EGFP-SD ラットの脂肪組織より脂肪由来幹細胞の抽出および培養を行い、増殖能を確認した。脂肪分化誘導培養培地で抽出した細胞を培養しオイルレッド O 染色で、脂肪細胞に分化したことを確認した。

当初はラット背部に放射線を照射して放射線皮膚障害の動物モデルを試みたが、照射後の皮膚障害の度合いが個体により差が大きかった。照射線量、範囲、線源からの距離などを調節したが、安定した結果が出ずに、放射線皮膚障害のモデルとして使用することを断念した。

ラットの下肢虚血肢モデルとマウスの下肢リンパ浮腫モデルを当科では、すでに作成しており、それぞれに脂肪由来幹細胞を移植して解析中であった。これらのモデルは放射線を照射して作成するために、放射線皮膚障

害モデルとして、ラット下肢虚血肢モデルに、EGFP でラベルした脂肪由来幹細胞を移植して検証した。

(2) 下肢虚血肢モデルに脂肪由来幹細胞を移植しない群では、半数が下肢は壊死になる。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癒を認めるが、脂肪由来幹細胞と皮弁の同時移植群のほうが、レーザードップラーでより多い血流量、足底創部の面積縮小および血管の増加数においてそれぞれ有意差を認めた。

さらに、EGFP でラベルした脂肪由来幹細胞を移植し解析すると血管に発現する EGFP 陽性の数が皮弁移植群に比べ、皮弁移植しない群のほうが明らかに多かった。このことは、同じ放射線皮膚障害でも局所の環境が違えば、同じ脂肪由来幹細胞を移植してもその後のふるまいが違ふことが示唆された。そこで、マウスの下肢リンパ浮腫モデルに脂肪由来幹細胞移植だけでなく血行があるリンパ節移植を行い、検証した。

また、この下肢虚血肢モデルを脂肪由来幹細胞移植で治癒した群に再照射を行う予定であったが、実施個体数が少なく、解析までできなかった。

(3) 下肢リンパ浮腫モデルに脂肪由来幹細胞を移植しない群では浮腫は改善しない。脂肪由来幹細胞を移植した群では、肉眼的に浮腫が改善し、リンパ管蛍光造影法および病理学的解析でリンパ管の再生を確認するが、同時に血行があるリンパ節を移植すると、さらに浮腫の改善を認める。

これらより、放射線皮膚障害に対して脂肪由来幹細胞を単独で移植で治療効果を認めるが、血行が豊富な組織移植を併用することが、さらなる効果が期待できる。

現在、放射線皮膚障害の治療は障害部位の十分な切除と血行豊富な皮弁などの組織移植が行われているが、大きな組織欠損となり、ドナーの犠牲が大きく、手術後の安静期間も長く、患者の負担が大きい。また、放射線部位で皮膚障害だけでなく骨髄炎を併発すると治療に難渋することもある。

脂肪由来幹細胞移植は、現在の治療と同様な治療効果があり、尚且つ低侵襲で術後の安静期間短縮も期待でき、患者負担軽減となりうる方法だと考えられる。また、血行が豊富な組織移植を併用すると、さらなる治療効果を認め、重度な局所の放射線障害に対しても治療効果が期待できると考えられる。

しかしながら、移植した幹細胞の役割はまだ不明な点が多くさらなる解析が必要である。

## 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 3 件)

Yoshida S, Yoshimoto H, Hirano A, Akita S, Wound healing and angiogenesis through combined use of a vascularized tissue flap and adipose-derived stem cells in a rat hindlimb irradiated ischemia model. *Plast Reconstr Surg*, 査読有、137(5), 2016, 1486-97  
Yoshida S, Hamuy R, Hamada Y, Yoshimoto H, Hirano A, Akita S, Adipose-derived stem cell transplantation for therapeutic lymphangiogenesis in a mouse secondary lymphedema model. *Regen Med*, 査読有、10(5), 2015, 549-62  
Tanaka K, Akita S, Yoshimoto H, Houbara S, Hirano A, Lipid-colloid dressing shows improved reepithelialization, pain relief and corneal barrier function in split-thickness skin-graft donor wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*, 査読有、13(3), 2014, 220-5

## 〔学会発表〕(計 4 件)

大石正雄、秋田定伯、吉本浩等、当科関連施設における培養表皮移植における実践的な問題検討について、第 41 回日本熱傷学会総会・学術集会、2015 年 6 月 18 日、名古屋観光ホテル、愛知県名古屋市

秋田定伯、吉本浩等、【熱傷基礎研究の最前線】急性放射線障害のメカニズムと治療方法の開発、第 40 回日本熱傷学会総会・学術集会、2014 年 6 月 5 日、ラフレさいたま、埼玉県、さいたま市  
吉田周平、秋田定伯、吉本浩等、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 23 回日本形成外科学会基礎学術集会、2014 年 10 月 9 日、キッセイ文化ホール、長野県、松本市

Akita S, Yoshimoto H et al, Analysis of efficacy of mesenchymal stem cell in pathologic environment, The Symposium on Advanced Wound Care/Wound Healing Society, April 23, 2014, Orland, USA

## 〔図書〕(計 2 件)

Murakami C, Akita S et al, Springer-Verlag, How to manage radiation injuries. In "Skin necrosis" (Eds) Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S and Ennis WI, 2015, 71-74

Yoshimoto H, Springer-Verlag, Pyoderma gangrenosum. In "Skin necrosis" (Eds) Teot L, Meaume S, Del Mamol V, Akita S and Ennis WI, 2015, 165-167

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉本 浩 (YOSHIMOTO, Hiroshi)  
長崎大学・病院 (医学系)・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 (医学系)・講師  
研究者番号 : 90315250