

別表：本現象に関与すると思われる因子のリスト 2

<ADSC-CFAHP>

ノード名	カウント数(SevNode,含む)
FLI1	58
JAK2	58
p53BAK-isoform1	52
ONECUT1	51
Cdk1-isoform1	48
Grb-2-isoform1	44
FOXO1	43
AKT-1	38
14-3-3zeta	31
FOXP3	30
IRS-1	30
SOX2	30
TCF7	30
cat-1-catenin	28
CDX1	28
ErbB2	24
Src-isoform1	24
DNA-PKcs-isoform1	23
DKK-beta	23
Lys6	23
Lys0	21
Tyk2	21
NIK	20
ERK1	19
Jak1	19
AKT1	18
SHP2-isoform2	17
ERK2	18
Smad4	18
p53beta	14
Jak3	13
SHP-1L	12
lec-0	11
NLK	11

別表：本現象に関与すると思われる因子のリスト a

<ADSC-LEAHP>

ノード名	カウント数(SevNode,含む)
p53beta	35
SP1	34
FLI1	33
MAPKAPK3	28
NANOG	28
STAT3-isoform1	27
AKT-1	25
CDP	24
NIK	24
JNK1beta1	23
p38alpha	23
IKK-beta	22
JNK1alpha1	21
cdco2-isoform1	21
NLK	21
TAK1a	21
DKK-alpha	20
JNK3alpha1	19
IKK1beta	18
p53BAK-isoform1	17
MAPKAPK2	18
SSABalpha	18
CKII-alpha; CKII-alpha2; CKII-beta2	14
NFAT2A-alpha	14
p38delta	14
ERK1	12
MSK1	12
p300	12
HIPK1	11
RUNX2	10

カウント数以下は省略。

別表：本現象に関与すると思われる因子のリスト4
 <233A-AFABP>

ノード名	カウント数(KeyNode,含む)
FOXA2	30
FOSL1	29
CEBPB	28
JUNB	28
CEBPA	25
SPF1	25
VDR	22
FOXF1	20
POU5F1	18
SPI1	18
SRF	18
FOS	17
FOSB	17
JUND	17
cdco2-isoform1	17
p/CAF	17
Smad3	17
TAL1	16
TFEC	16
MAPKAPK3	15
POU1F1	15
AKT-1	14
HIF-1alpha-isoform1	14
p53-isoform1	14
SGK-1-isoform1	14
14-3-3zeta	13
JNK1alpha1	13
RSK1	13
SGK1	13
HOXB3	12
JUN	12
p300	12
p38alpha	12
JNK1beta1	11

別表：本現象に関与すると思われる因子のリスト4
 <233A-AFABP>

ノード名	カウント数(KeyNode,含む)
FOXA2	30
FOSL1	29
CEBPB	28
JUNB	28
CEBPA	25
SPF1	25
VDR	22
FOXF1	20
POU5F1	18
SPI1	18
SRF	18
FOS	17
FOSB	17
JUND	17
cdco2-isoform1	17
p/CAF	17
Smad3	17
TAL1	16
TFEC	16
MAPKAPK3	15
POU1F1	15
AKT-1	14
HIF-1alpha-isoform1	14
p53-isoform1	14
SGK-1-isoform1	14
14-3-3zeta	13
JNK1alpha1	13
RSK1	13
SGK1	13
HOXB3	12
JUN	12
p300	12
p38alpha	12
JNK1beta1	11

NeuroD	11
NKX2-2	11

カウント数10以下は省略。

別表：本現象に関与すると思われる因子のリスト 6

<289A-CFABP>

ノード名	カウント数(KeyNode含む)
FOXA2	36
SGK1-isoform1	29
POU5F1	28
α300	27
NR3C1	26
p/CAF	25
FOXF1	23
AKT-1	22
GATA2	20
NF-IL6-1	20
α202 -isoform1	19
Smad3	19
Cdk1-isoform1	18
SGK1	18
YY1	17
DNA-PKcs-isoform1	16
α53 -isoform1	16
NR1B1-isoform1	14
Evi-1	13
LysA	13
CBP	12
NF-IL6-3	12
PDK1-isoform1	11

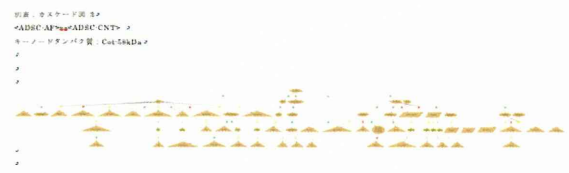
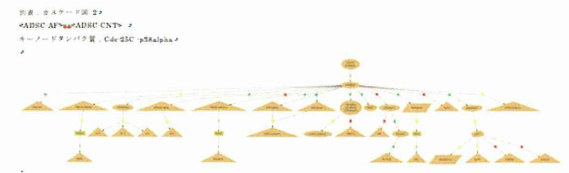
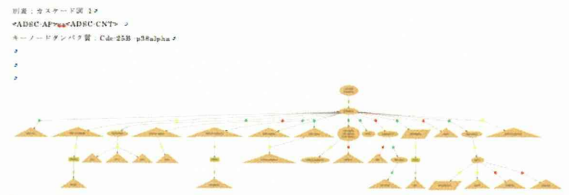
カウント数 9 以下は省略。

別表：本現象に関与すると思われる因子のリスト 6

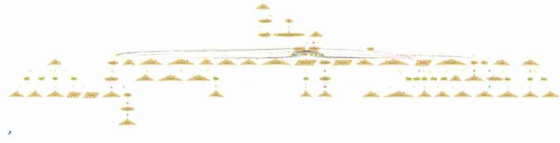
<289A-LFABP>

ノード名	カウント数(KeyNode含む)
α53beta	34
CBP	29
MSK1	26
α38alpha	25
Caspase-3	24
FOS	24
p/CAF	24
buntiositin	20
MKK4beta	20
ATF3	19
JNK1beta1	19
MAPKAPK2	19
AKT-1	18
JNK1alpha1	18
CEBPD	16
JNK2alpha-1	16
HMGAI	15
IPF1	15
PKZeta	15
CKII-alpha: CKII-alpha2: (CKII-beta)2	14
ERK2	14
FLI1	13
α65PAK -isoform1	13
14-3-3zeta	12
CEBPA	12
α38delta	12
STAT3-isoform1	12
sumo1	12
AR-isoform1	11
ELK4	11
RSK2	11

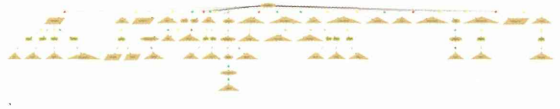
カウント数 9 以下は省略。



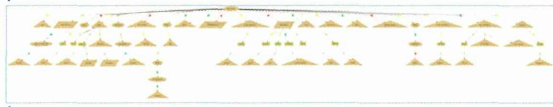
別添：オスタード図 4
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：Evi1



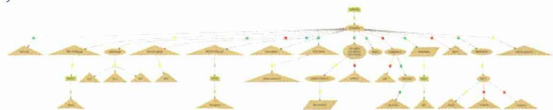
別添：オスタード図 12
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：JNK1ipk1



別添：オスタード図 6
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：JNK1ipk1



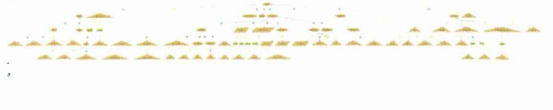
別添：オスタード図 7
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：MAPK14



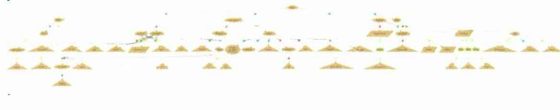
別添：オスタード図 8
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：MAPK72



別添：オスタード図 9
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：MEK1



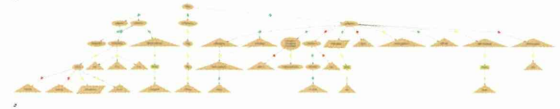
別添：オスタード図 10
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：MEK2



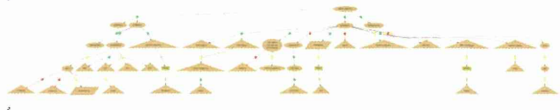
別添：オスタード図 11
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：MEK3



別添：オスタード図 12
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：MKK3



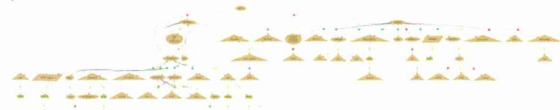
別添：オスタード図 13
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：MKK3ositem1



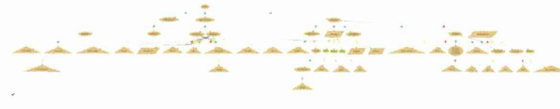
別添：オスタード図 14
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：MKP-2



別添：オスタード図 15
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：MKP-7



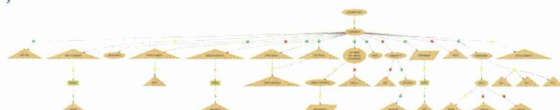
別添：オスタード図 16
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：MLK2

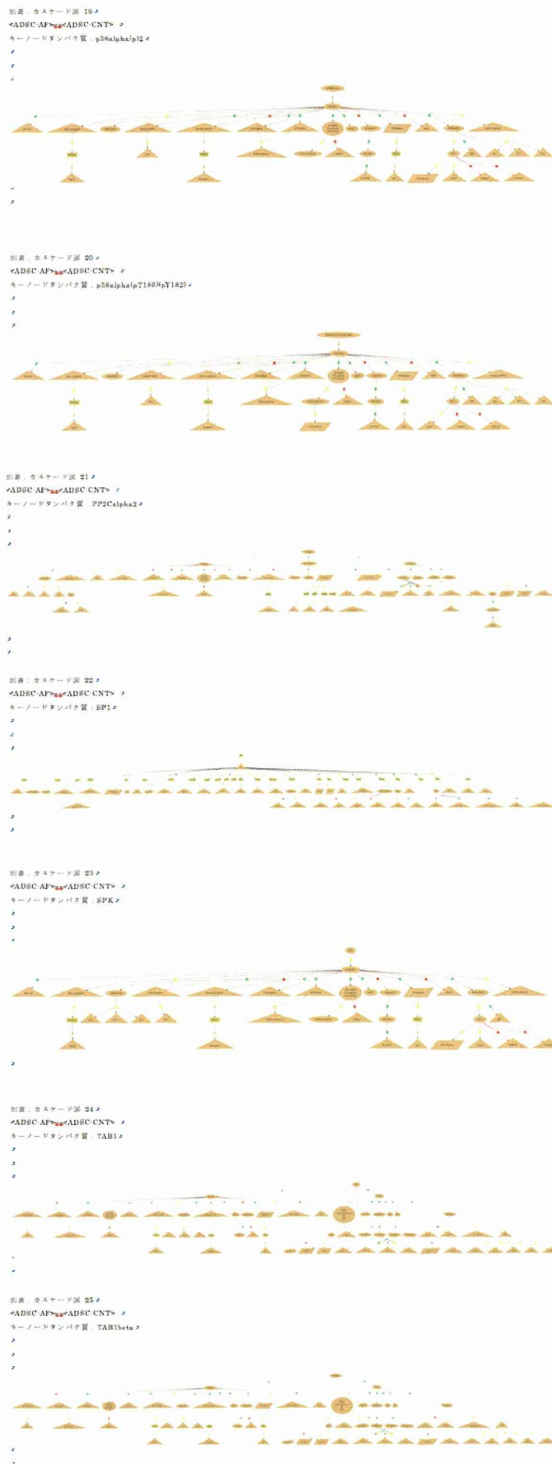


別添：オスタード図 17
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：p38alpha^{Max}



別添：オスタード図 18
 <ADBC-AP₉₉>ADBC CNT> /
 キーワード検索パス：p38alpha





C. 考察と結論

- 1) ヒト脂肪由来幹細胞に関連する脂肪酸結合タンパク (FABP) の精製・機能解析
- 2) ヒト脂肪由来幹細胞に関連する脂

肪酸結合タンパク (FABP) に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの取得

3) ヒト脂肪由来幹細胞に関連するヒト完全長脂肪酸結合タンパク (FABP) を用いた発現解析

4) ヒト脂肪由来幹細胞の分化誘導と特異性解析

4) 単離ヒト脂肪由来幹/前駆細胞の品質評価法の標準化検討

ヒト脂肪由来幹細胞として自己皮下脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) を分離採取し、経尿道的内視鏡下に傍尿道に注入・移植して、尿道括約筋再生により尿失禁の改善を図ることを目標とし、その治療、安全性のバイオマーカの脂肪細胞関連 FABP について各種検討を行った。

L-FABP, A-FABP 及び C-FABP は培養細胞から培養上清に放出されていることが確認された。また、ADSC においては脂肪細胞分化刺激によって特異的に A-FABP の培養上清中濃度が上昇することから、細胞培養上清を ELISA 測定することでヒト皮下脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) の脂肪細胞への分化を簡便にモニタリングできることが示唆された。一方 ADSCs の腫瘍化等への不測の分化をモニタリングする目的で培養上清中 C-FABP 濃度も測定したが、濃度が薄く、明らかな不測の組織への分化を確認することができなかった。そのため、今後は ADSC を長期培養若しくは、何かしらの刺激によって細胞をがん化させ、その培養上清中 C-FABP を測定す

る必要があると考えた。また、市販の ELISA kit の性能からバックが非常に高く、検量線のバラツキも大きく再現性のある正確なデータを取ることが難しいと考えられた。そこで、今回取得した C-FABP モノクロー抗体を用い、弊社独自の体外診断用医薬品であるレナプロ L-FABP ELISA kit のノウハウを活用して C-FABP の ELISA kit を開発することで、上記分化モニタリングの標準化に寄与できると考えられる。

D. 研究発表

なし

E. 論文発表

1. 山本 徳則, 後藤 百万画像診断 Imaging Approach 腎血管性高血圧と腎内微小循環イメージング Nephrology Frontier(1346-9630)11 巻 4 号 Page362-366(2012.12)

2. 山本 徳則、後藤 百万 画像診断 Imaging Approach 腎血管性高血圧と腎内微小循環イメージング Nephrology Frontier(1346-9630)11 巻 4 号 Page362-366(2012.12)

3. 山本 徳則、後藤 百万 画像診断 Imaging Approach 腎交差血管イメージングと間歇的側腹部痛 Nephrology Frontier(1346-9630)11 巻 3 号 Page272-274(2012.09)

4. 山本 徳則【知っておきたい内科症候群】腎臓《泌尿器科系およびその他の症候群》

閉塞性利尿症候群内科(0022-1961)109巻 6号 Page1411-1412(2012.06)

5. 山本 徳、大藪 真理子, 後藤 百万画像診断 Imaging Approach IgG4関連腎炎 症性腫瘍血管イメージングと鑑別診断 Nephrology Frontier(1346-9630)11巻2号 Page175-177(2012.06)

6. 山本 徳則, 小松 智徳, 後藤 百万画像診断 Imaging Approach 腎血管筋脂肪腫の血管イメージングとその治療 Nephrology Frontier(1346-9630)11巻1号 Page78-81(2012.03)

7. Yamamoto T, Gotoh M Editioial comment to regenerative therapy, tissue engineering, urology, lower urinary tract , stem cells 2013 in press

8. Yamamoto T Editorial Comment to Contrast-enhanced transrectal ultrasonography for the measurement of prostate cancer tumor size in the peripheral zone and correlation with radical prostatectomy specimens 2013in press

9. Yamamoto T, Funahashi Y, Mastukawa Y, Kato M, Yoshino Y, Gotoh M: Pretreatment of renal subcapsular administration of adipose tissue-derived stem cells ameliorate ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. Hirosaki Med. J. 64 (Suppl.) : S1—S3, 2013

10. Yamamoto J, Sato W, Kosugi T, Yamamoto T, Kimura T, Taniguchi S, Maruyama S, Matsuo S, Yuzawa Y, Niki I Distribution of Hydrogen Sulfide (H₂S) Producing Enzymes and the Roles of H₂S in Diabetic Nephropathy. Clin Exp Nephrol. 2012 Aug 8. [Epub ahead of print]
11. Yasuda K, Ozaki T, Saka Y, Yamamoto T, Gotoh M, Ito Y, Yuzawa Y, Matsuo S, Maruyama S, Autologous cell therapy for cisplatin induced acute kidney injury by using non-expanded adipose tissue derived cells Cytotherapy. 2012 Oct;14(9):1089-100. doi: 10.3109/14653249.2012.693157. Epub 2012 Jun 25.
12. Yamamoto T Editorial Comments to Hair follicle stem cells can be driven into urothelial-like phenotype, an experimental study Int J Urol. 2012 Dec 2. doi: 10.1111/iju.12013. [Epub ahead of print]
13. Mine S, Yamamoto T, Mizuno H, Endo S, Matsukawa Y, Funahashi Y, Hattori R, Gotoh M Effect of Tamsulosin on Bladder Microcirculation in a Rat Bladder Outlet Obstruction Model, evaluated by a Pencil Lens Charge-coupled Device Microscopy System Urology. Urology. 2013 Jan;81(1):155-9. doi: 10.1016/j.urology.2012.09.008. Epub 2012 Nov 30.
14. Katsuno T, Ozaki T, Furuhashi K, Kim H, Yasuda K, Yamamoto T, Sato W, Tsuboi N, Mizuno M, Ito Y, Imai E, Matsuo S, Matuyama S Low serum cultured adipose tissue-derived stromal cells ameliorate acute kidney injury in rats Cell Transplantation 2013;22(2):287-97. doi: 10.3727/096368912X655019. Epub 2012 Sep 7.
15. Funahashi Y, Hattori R, Yamamoto T, Sassa N, Fujita T, Gotoh M. Effect of warm ischemia on renal function during partial nephrectomy: assessment with new 99mTc-mercaptoacetyl triglycine scintigraphy parameter. Urology. 2012 Jan;79(1):160-4.
16. Funahashi Y, Hattori R, Yamamoto T, Sassa N, Fujita T, Gotoh M. Effect of Warm Ischemia on Renal Function During Partial Nephrectomy: Assessment with New (99m)Tc-Mercaptoacetyl triglycine Scintigraphy Parameter. Urology. 2012 Jan;79(1):160-4.
- F. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

組織欠損に対する脂肪由来幹細胞付加脂肪移植についての基礎的研究

研究分担者 亀井 讓 名古屋大学大学院医学系研究科 形成外科学 教授

研究要旨

本研究事業では、腹圧性尿失禁に対し、傍尿道への脂肪由来幹細胞および脂肪由来付加脂肪移植による新規再生治療の開発を目標としている。頭頸部悪性腫瘍切除後の再建後や顔面半側萎縮症の患者では、皮下組織の欠損による顔面の非対称が問題となり脂肪組織移植が行われるが、通常の脂肪移植は生着率が低く、期待される効果が得られないことが多い。他方、すでに乳房部分切除後の患者に対して臨床試験が始まっている脂肪由来幹細胞付加脂肪移植は移植後のボリューム減少が少ないとされ、組織欠損に対しても有効な治療として応用できる可能性がある。今回われわれは脂肪由来幹細胞付加脂肪移植の安全性試験をマイクロミニブタを用いて行った。注入した脂肪の体積は 2 ml から 1.2 ml へと約 4 割の減少を認めた。組織学的には脂肪の残存、脂肪再生、血管数の増加などの所見を認め、血管数の増加は超音波検査においても支持された。また、懸念された腫瘍化や目的以外の組織への分化は認められず、他の報告にもあるように安全な手技であると考えられた。

A. 研究目的

顔面や四肢の癬痕拘縮、変形に対する治療は患者の QOL に直結するものであり、今後ますます需要が見込まれる分野である。現在、癬痕拘縮に対する治療は Z 形成術、局所皮弁、植皮などがあり¹⁾、皮下組織欠損を伴う変形に対する治療は現在自己脂肪移植、真皮脂肪移植、遊離組織移植などが上げられる。自己脂肪移植(脂肪注入)は移植後のボリューム減少が 5 割から 6 割程度起こるとされ、また大量移植を行うと中心壊死や感染の危険性がある。真皮脂肪移植は生着率は脂肪移植より高いが採取量が限られること、脂肪のみの移植に比べて柔らかさが劣ることが挙げられる。遊離組織移植は大き

な組織の移植が可能であるが血管吻合が必要であり手術に熟練を要するという欠点がある。

脂肪由来幹細胞 (Adipose derived stem cells; ADSCs) 付加脂肪移植は現在乳房の部分欠損に対してや、泌尿器科領域で腹圧性尿失禁²⁾に対する臨床試験が始まっており、実用化される可能性が高い。この方法では移植片に含まれる ADSCs が血管新生や組織保護、脂肪再生など様々な役割を果たすことで脂肪組織の生着率が向上するという特色を持ち、他の分野への応用も期待されている。

われわれは過去の泌尿器科と合同で行っている排尿障害に対する ADSCs を用いた研究²⁾や、大網^{3,4)}や人工物^{5,6)}を用

いた再生医療研究経験を生かし、ADSCs 付加脂肪移植についての前臨床研究を行った。本研究事業では、腹圧性尿失禁に対し、傍尿道への脂肪由来幹細胞および脂肪由来付加脂肪移植による新規再生治療の開発を目標としている。そこで、組織欠損に対して、ADSCs 付加脂肪移植による形態や対称性の回復が得られるかどうかを検証することを目的として本分担研究を行った。前臨床研究として、具体的にはマイクロミニブタを用い、顔面皮下組織欠損モデルを作成して ADSCs 付加脂肪移植を行い、その安全性と効果について検討した。

B. 研究方法

大動物としてマイクロミニブタ(週令、32kg)を対象に実験を行った。自己吸引脂肪から細胞分離装置(Cellution, Cytori therapeutics, USA)を用いて ADSCs を抽出し、脂肪と混和して欠損部に注入した。細胞注入 28 日後に組織を採取し Hematoxylin & Eosin、Masson Trichrome、Alcian Blue、Von Kossa 染色により評価を行った。また、全臓器摘出病理組織での安全性の検討を行った。

C. 研究結果

顔面皮下脂肪欠損モデルに対する ADSCs 付加脂肪注入術

手術時間 : 80 分 出血量 : 20 ml 以下

細胞分離時間 : 140 分

手術記録

術者 : 鳥山和宏 (形成外科専門医、指導医)

介助 : 高成啓介 (形成外科専門医)、藤本保志 (耳鼻咽喉科専門医)、西尾直樹 (耳

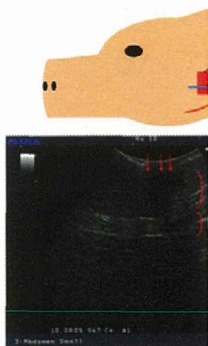
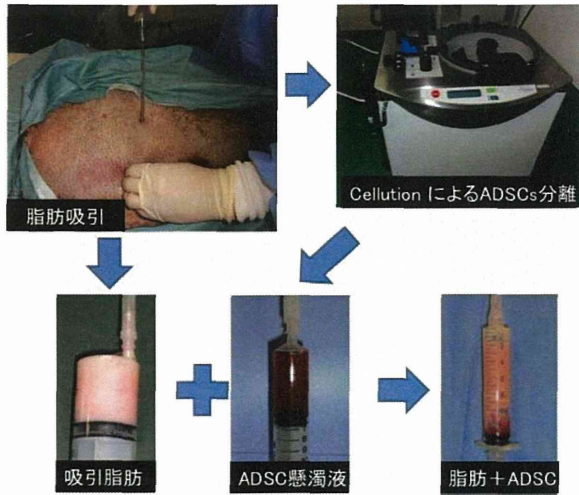
鼻咽喉科専門医)、須賀研治 (耳鼻咽喉科専門医)、山本徳則 (泌尿器科専門医)

全身麻酔下に右側臥位をとり、手術を開始した。臨床で行うと同様の手技で左腹部一臀部皮下にボスミン含有生理食塩水(0.125%、200ml)注入し18Gの皮下脂肪吸引管にて70g自己脂肪組織を吸引した。この組織を細胞分離装置で脂肪組織由来/間質細胞を抽出した(5ml溶液となる)。

コントロール側 : 右側臥位にて左下顎骨の外側縁にそった皮膚切開を行い、皮下脂肪層で剥離を行った。露出された顔面皮下脂肪に対し、大きさ1X2cmの欠損を咬筋上で作成した(厚さ1cm)。出血がないことを確認し、皮下(吸収糸; バイクリル3-0)、皮膚(非吸収糸; ナイロン4-0)を用いて縫合閉鎖した。創縁より18G針を欠損部まで挿入し、生理食塩液2mlを注入した。

実験側 : 次に左側臥位で同様に右下顎骨外側縁を切開し、皮下脂肪欠損を作成(1X2cm、厚さ1cm)。同様に閉創し、創縁から18G注射針を欠損部に挿入してADSCs付加脂肪(脂肪:幹細胞=1:1、2ml)を注入して手術を終了した。

それぞれ注入後、超音波にて注入部位を確認した。生食注入部位はLow echoであり、脂肪+ADSCs注入部位はHigh echoであった。



・術後経過

手術後同日から食事摂取可能であり、体重は術後大きな減少なく経過した。

・術後 28 日血液データおよび全身所見

1) 血液データ

貧血、低栄養状態、炎症の末梢血、生化

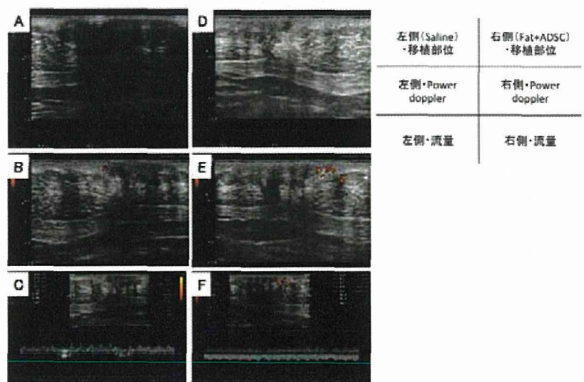
学データ異常を認めなかった。

2) 摘出臓器所見

- a) 皮膚、筋肉: 腫瘍、炎症、循環障害 なし
- b) 脳: 髄液の色調異常なく、脳表面、割面に腫瘍、炎症、循環障害なし
- c) 肺; 胸水、癒着、腫瘍、炎症、無し 出血、うっ血無し
- d) 心臓; 心のう液正常、心膜癒着無し、心外膜出血無し
- e) 腹腔: 腹水、癒着無し、腫瘍、炎症、循環障害なし
- f) 消化管、肝胆膵、脾臓: 腫瘍、炎症、循環障害なし
- g) 後腹膜臓器; 腎、尿管、膀胱、前立腺、精囊、陰茎: 腫瘍、炎症、循環障害なし

・ 術後 28 日目注入部位超音波所見

コントロール側は Low echo, 実験側は High echo であった。Power Doppler にて周囲の血流を確認したところ、コントロール側に比べ、実験側では癒痕周囲の血管数およびその血流の増加を認めた。



・ 注入部位のマクロ所見

コントロール側では線状の癒痕を認め、実験側では注入した脂肪の残存を確認できた。断面積 (サンプル内で 4 カ所、image J にて測定) と長さから実験側の残存脂肪の体積を近似したところ 1.2 ml であった。



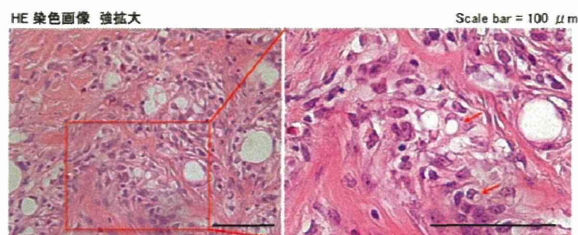
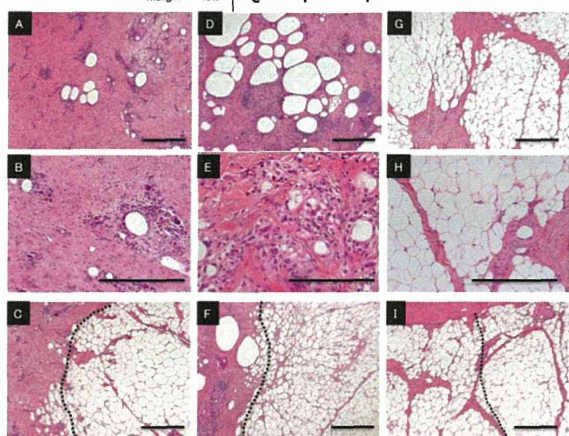
• HE 染色所見

コントロール側では強い癒痕組織が見られたのに対して実験側では脂肪の残存が見られた。また、強拡大では脂肪滴を含む幼弱な細胞が見られた。これは脂肪前駆細胞と考えられ、脂肪組織再生が示唆された。

また、癒痕周囲での単位面積あたりの血管数を測定したところ、コントロール側では 15 個/mm²であったのに対し実験側では 28 個/mm²と血管数が多かった。

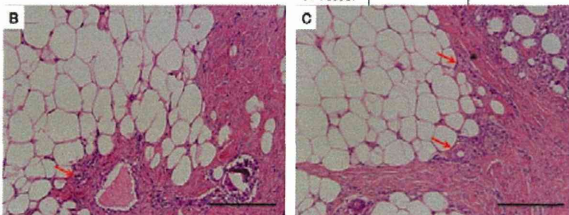
		Cont	Exp (surface)	Exp (deep)
HE 染色画像	inside	A	D	G
	high	B	E	H
	margin low	C	F	I

Scale bar = 200 μm



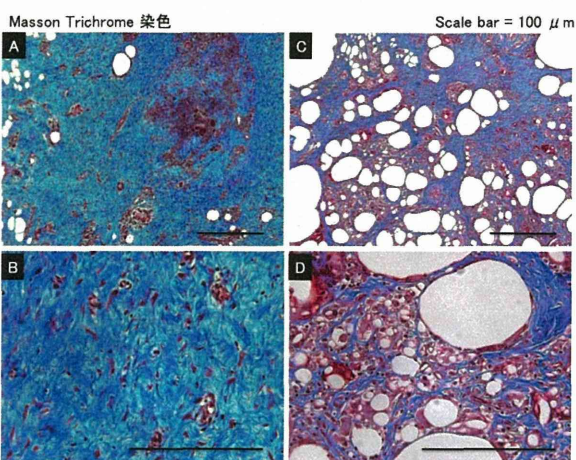
癒痕周囲の血管数の比較

* 注入部位の周辺 (~600 μm) の血管数を測定した。 Scale bar = 100 μm



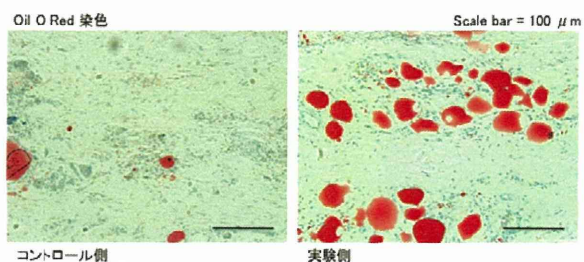
• Masson Trichrome 染色所見

HE 所見と同様に、コントロール側では膠原繊維を多く含み癒痕化が見られ、実験側では脂肪組織の残存が見られた。

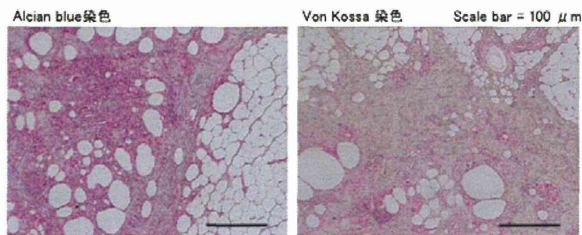


• その他特殊染色所見

Oil-O-Red 染色にて脂肪染色を行ったところ、HE、Masson 染色と同様にコントロール側が癒痕が多かったのに対し、実験側の脂肪組織が保たれていることが確認された。

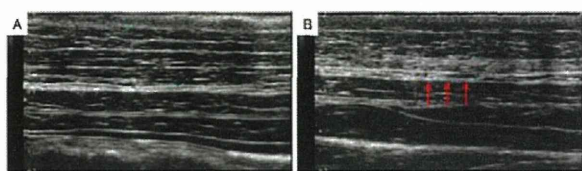


ADSCs は In Vitro で多分化能が確認されているため、実験側の検体にて Alcian Blue, Von Kossa 両染色にてそれぞれ軟骨、骨への分化をみたが、これらの組織への分化は認めなかった。



・ 脂肪採取部位超音波所見

正常部位 (A) に比べて脂肪採取部位 (B) では浅筋膜の炎症と思われる high echo 部位が見られたが、それより深部では大きな変化を認めなかった。



D. 考察

注入した脂肪の体積は 2 ml から 1.2 ml へと約 4 割の減少を認めた。組織学的には実験側において脂肪の残存、脂肪再生、血管数の増加などの所見を認め、血管数の増加は超音波検査においても支持された。また、懸念された腫瘍化や目的以外の組織への分化は認められず、他の報告にもあるように安全な手技であると考えられた。

E. 結論

今回われわれは大動物において顔面皮下組織欠損モデルを作成し、ADSCs 付加脂肪移植を行い、安全性および有効性について検討を行った。

F. 参考文献・研究発表

- 1) 四肢癱痕拘縮の治療 亀井 譲 形成外科 55 Dec 2012 1275-1398
- 2) Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress urinary incontinence: Report of three initial

cases. Yamamoto T, Gotoh M, Kato M, Majima T, Toriyama K, Kamei Y, Iwaguro H, Matsukawa Y, Funahashi Y. *Int J Urol*. 2012 Jul;19(7):652-9.

3) Free calvarial periosteum graft vascularized by an omental flap in a rat model.

Nakazato K, Toriyama K, Hishida M, Takanari K, Yagi S, Yamashita Y, Akatsuka S, Hayakawa A, Kamei Y. *Ann Plast Surg*. 2011 Dec;67(6):649-54.

4) Tissue-engineering bone from omentum. Kamei Y, Toriyama K, Takada T, Yagi S. *Nagoya J Med Sci*. 2010 Aug;72(3-4):111-7. Review.

5) Placement of an elastic biodegradable cardiac patch on a subacute infarcted heart leads to cellularization with early developmental cardiomyocyte characteristics. Fujimoto KL, Tobita K, Guan J, Hashizume R, Takanari K, Alfieri CM, Yutzey KE, Wagner WR. *J Card Fail*. 2012 Jul;18(7):585-95.

6) An elastomeric patch electrospun from a blended solution of dermal extracellular matrix and biodegradable polyurethane for rat abdominal wall repair. Hong Y, Takanari K, Amoroso NJ, Hashizume R, Brennan-Pierce EP, Freund JM, Badylak SF, Wagner WR. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012 Feb;18(2):122-32.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

一側声帯麻痺モデルを用いた、非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞
注入による神経損傷にもとづく組織変性の回復効果の研究

分担研究者 山本徳則 名古屋大学大学院医学系研究科 泌尿器科学 准教授
研究協力者 藤本保志 名古屋大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科 講師
西尾直樹 名古屋大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科 助教
須賀研治 名古屋大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科 助教

研究要旨

腹圧性尿失禁に対する外尿道括約筋への脂肪由来幹細胞注入における脂肪組織由来幹細胞注入の安全性、および組織障害の再生を検討するため、大型動物であるブタに対して右反回神経を切断することで一側声帯麻痺モデルを作成し、脂肪組織由来幹細胞の注入による変化を検討した。組織学的に、神経切断による筋萎縮と幹細胞移植による再生の双方が観察され、さらに血管増成による血流増加が示唆された。腹圧性尿失禁を引き起こす尿道括約筋障害においては、血流障害や神経損傷に引き続いて起こる組織障害が重要な病態であり、今回の検討により、脂肪由来幹細胞の局所注入がこれらの病態を改善させることが示唆された。

A. 研究目的

一側声帯麻痺は一側の声帯が種々の原因により麻痺する病態であり、発声時の声のかすれや、発声持続時間の低下、息切れ、嚥下時のむせなどの症状を呈し、**QOL**を著しく低下させる病態であり、本研究事業における腹圧性尿失禁の括約筋障害に関する病態と類似している。原因としては甲状腺癌や食道癌、肺癌といった腫瘍の神経への直接浸潤や胸部大動脈瘤による圧迫、手術時の反回神経への操作などが挙げられる。一側声帯麻痺は音声障害を引き起こすのみならず、嚥下障害をも引き起こす病態ではあるが、外科的治療により症状の改善を期待できることから、当科では積極的に外科治療を

施行してきた。

一側声帯麻痺に対しての外科的治療としては甲状軟骨形成術、披裂軟骨内転術、声帯内異物注入術など多彩な術式が報告され、病態に応じて選択されているが、そのなかで声帯内注入術は最も低侵襲な方法である。注入する物質はシリコンやゴアテックス、コラーゲンといった人工物や自家脂肪、自家筋膜などの自家組織などが用いられるが、シリコンやゴアテックスなどは声帯の波動などの音声的な面からも推奨されず、コラーゲン注入法は汎用性が高く以前より用いられていたが、注入後の吸収率が高いという欠点と、コラーゲンが牛組織由来であるため、ウイルスなど感染の危険性を完全に

は否定で「きない欠点か」ある。声帯内自家脂肪注入術は 1991 年に Mikaelian により報告後、拒絶反応がないなどの安全性から普及している 1)が、徐々に吸収され頻回の注入を必要とすることが課題であり、田村らは注入 1 か月後の CT 画像上での脂肪組織の残存率は平均 31.5%であったと報告している 2)。

近年、その課題を克服するために、声帯内への幹細胞の注入の研究が進められている。

Kanemaru らは自家骨髄由来幹細胞をイヌの声帯内に注入し、その効果を報告している 3)。また声帯内への脂肪組織由来幹細胞の投与はラットやイヌに対して行われており、その有用性が報告されている 4)。本研究事業の目標は、外尿道括約筋機能不全に対するヒト脂肪組織由来幹細胞の外尿道括約筋への注入により括約筋機能回復を図る、新規再生治療の開発である。我々は、尿失禁治療としての尿道周囲への自家脂肪由来幹細胞移植において、移植脂肪の容積効果や周囲血流の増加などの効果を得ている。

声帯内への脂肪由来幹細胞移植によれば、移植脂肪の容積維持や血流増加により、萎縮のすくない自家脂肪細胞として有用であると考えられる。

一方、幹細胞移植においては、分化の過程で幹細胞から癌細胞への出現が懸念されるためその安全性についても検証する必要がある。

今回の分担研究では、腹圧性尿失禁に対する外尿道括約筋への脂肪由来幹細胞注入における、脂肪組織由来幹細胞注入の安全性検証を一次的な目的として、神経麻痺による組織障害の再生を確認するため、大型動物であるブタに対して右反回神経を切断することで一側声帯麻痺モ

デルを作成し、脂肪組織由来幹細胞の注入による変化を検討した。ブタは内視鏡での喉頭観察が困難なこともあり、ブタへの投与の報告はほとんどないが、喉頭の大きさや構造、そして創傷への回復過程がヒトと非常に類似している 5)ため、よりヒトに近い条件での安全性検証が可能であり、治療効果も検証可能と思われる。皮下脂肪組織を脂肪吸引法で「採取後、採取した脂肪組織から分離装置を用いて ADRCs を抽出し、内視鏡下にブタの声帯筋内に ADRCs を注入して、その効果を検討した。

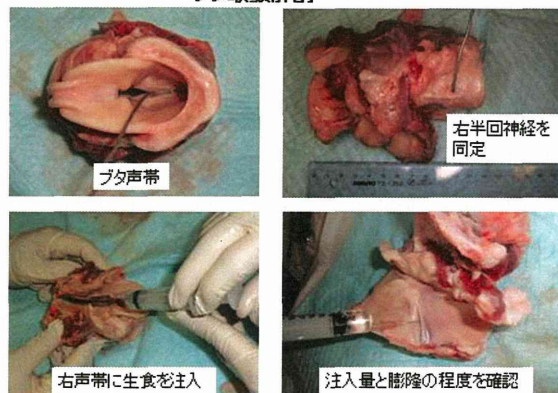
B. 研究方法

大動物としてブタを対象に臨床と同様自己吸引脂肪を細胞分離装置で ADRCs を抽出し、一側反回神経を切断することによって、一側反回神経麻痺モデルを作成し、一側声帯筋内に注入した。細胞注入 28 日後に喉頭摘出し、HE 染色し比較検討した。また、全臓器摘出病理組織での安全性の検討を行った。

C. 研究結果

トレーニングのために、手術前に他のブタから摘出された喉頭を使用して、解剖や手術手技を確認した。

ブタ喉頭解剖



術前の音声評価

術前にを使用して、ブタの正常の音声を音響解析した。録音は Roland 社製 Ediol を用いて非圧縮 PCM (24bit/96 k Hz) により行い、解析は Pentax 社製 Visipitch を用いた。

自己脂肪組織由来間葉系前駆細胞の声帯内注入手術

手術時間 : 頸部操作 35 分、声帯内注入 10 分

出血量 : 10 ml 以下

細胞分離時間 : 140 分

手術記録

手術方法 :

術者 : 藤本保志 (耳鼻咽喉科専門医)、西尾直樹 (耳鼻咽喉科専門医)、須賀研治 (耳鼻咽喉科医)

介助 : 鳥山和宏 (形成外科専門医、指導医)、高也啓介 (形成外科専門医)

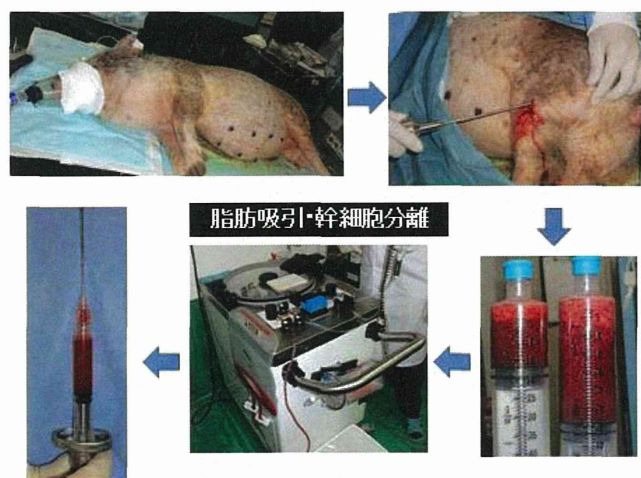
全身麻酔下に仰臥位をとり、臨床と同様の手技で皮下にボスミン含有生理食塩水 (100ml) 注入し 18 G の皮下脂肪吸引管にて 35g 自己脂肪組織を吸引した。この組織から臨床に用いると同様の細胞分離装置により脂肪組織由来間葉系前駆細胞を抽出した (5ml 溶液となる)。腹部を包帯にて圧迫し、止血を確認した。続いて、超音波エコーにて頸部の診察を行い、声帯、気管、甲状腺などの位置を確認し、輪状軟骨下縁にて皮膚を横切開し、周囲を剥離して甲状腺、輪状軟骨、甲状軟骨、気管を同定した。第 2, 3 気管の右側深部にて右反回神経を確認し、神経を切離し、両端を非吸収糸 (絹糸 2-0) にて結紮した。

出血がないことを確認し、皮下 (吸収糸 ; バイクリル 3-0) 皮膚 (非吸収糸 ; 絹糸 1-0) で縫合した。内視鏡にて左声帯が麻痺し

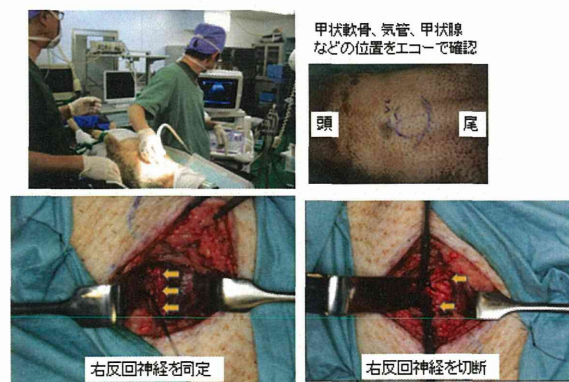
ているのを確認した後で、全身麻酔から覚醒させた。覚醒後に呼吸状態が問題ないこと、嗄声が出現していることを確認した。

再度全身麻酔にて仰臥位をとり、声帯を観察した。左声帯麻痺を確認し、内視鏡下にて脂肪組織由来間葉系前駆細胞を 1.5ml 左声帯筋層内に注入した。

呼吸状態に問題ないことを確認し終了とした。



半回神経麻痺モデル作成



声帯ADRCs注入

声帯への幹細胞注入



ADRC懸濁液を1.5ml注入
18G針にて注入。
注入部より漏れがないことも確認。

術後経過

手術後は嘔声が出現した以外には状態は問題なく、呼吸状態も落ち着いていることを確認した。嘔声は手術後、1-2週で徐々に改善を認めており、28日目には有声音を確認できた。

細胞注入後 28 日

喉頭所見

右反回神経切断後で右声帯は正中位固定を認めた。肉眼的には発声時に声門閉鎖が見られ有声音が聞かれた。

血液データ

貧血、低栄養状態、炎症の末梢血、生化学データ異常を認めなかった。

摘出臓器所見

肉眼的所見

皮膚、筋肉；腫瘍、炎症、循環障害 なし

脳：髄液の色調異常なく、脳表面、剖面に腫瘍、炎症、循環障害なし

胸腔：肺；胸水、癒着、腫瘍、炎症なし、出血・うっ血無し

心臓；心のう液正常、心膜癒着無し、心外膜出血無し

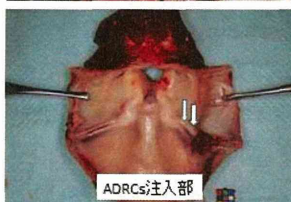
腹腔：腹水、癒着無し、腫瘍、炎症そして循環障害なし消化管、肝胆膵そして脾臓 腫瘍、炎症、循環障害なし

超音波検査

摘出した喉頭を超音波にて観察した。両声帯をパワードップラー法にて血流を測定したところ、右声帯周囲の血流の増加を認めた。甲状披裂筋の厚みを左右で測定したところ、右甲状披裂筋の厚みは3.8mm であり、左甲状披裂筋の厚みの6.2mm と比較して、明らかな萎縮が認められた。



右反回神経切断部



ADRCs注入部



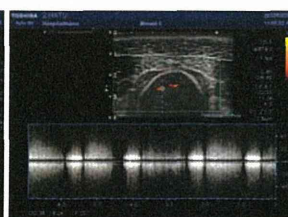
エコーで両声帯を評価



右声帯の血流増加



右甲状披裂筋:3.8mm



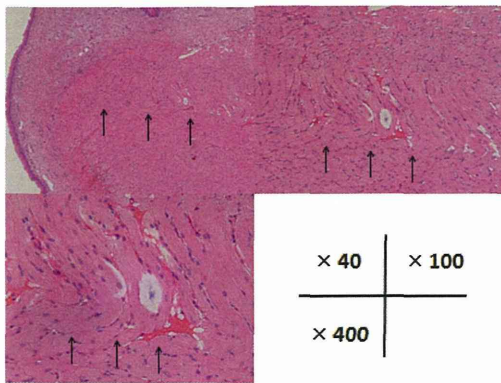
左甲状披裂筋:6.2mm

声帯内 ADRCs 注入部位病理組織

1:右甲状披裂筋は左甲状披裂筋に比較して、筋線維の密度が低下して、筋の萎縮が認められた。

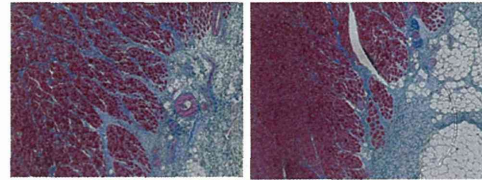
2:HE 染色では右甲状披裂筋内に注入した際生じた挫滅とその修復と考えられる筋線維が線状に認められ、ADRCs を注入した部位が推定できた。

HE染色

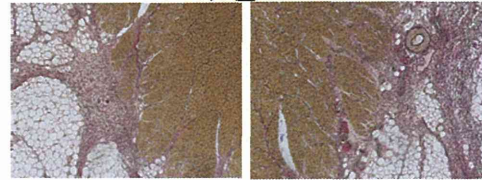


3: 注入部位には明らかな腫瘍形成は認めなかったが、萎縮した甲状披裂筋周辺から筋内にかけて膠原線維の増生と著明な血管の増殖像が認められた。注入部やその周囲にも癌などの悪性腫瘍病変の所見は認めなかった。

MC染色 × 40



EVG染色 × 40

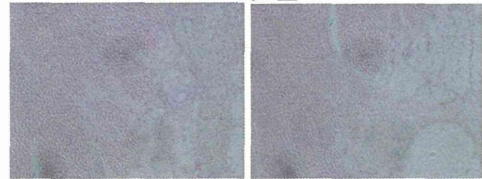


コッサ染色・アルシアン青染色では注入部位は染色されず、ヒアルロン酸や骨などへの分化を示す所見は認められなかった。

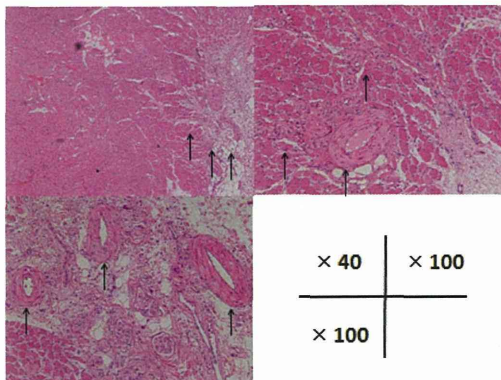
von Kossa染色 × 40



alcian blue染色 × 40



HE染色



4: さらに特殊染色としてマッソントリクローム (MC) 染色・エラスチカ・ワンギーソン (EVG) 染色、コッサ (von Kossa) 染色・アルシアン青 (alcian blue) 染色を追加した。MC 染色、EVG 染色では注入部位には著大な膠原線維の増生が確認できた。

D. 考察

一側反回神経を切断し、一側反回神経麻痺モデルを作成した。ブタは喉頭がヒトより大きく、声帯周囲の実験に適していると思われた。今回の実験では反回神経切断後、同日に脂肪幹細胞移植を行ったため、神経切断による筋萎縮と幹細胞移植による再生の双方が観察された。すなわち、声帯筋は反回神経切断による萎縮が認められたが、注入部位は声帯筋の修復過程から確認可能であり、膠原繊維の増生と著明な血管新生の像を認め、ADRCsにより萎縮声帯において血流が増加することが示唆された。

注入した声帯にも癌などの腫瘍性病変の

出現は認めず、全身の解剖でも悪性腫瘍は認められず、安全性が示された。手術後も呼吸状態は良好で、有害事象は出現していない。大動物での安全性の確認を確認した。

E. 結論

一側声帯麻痺に対する脂肪由来幹細胞注入の有用性について検討した。

大型動物であるブタにおいて、声帯への脂肪幹細胞移植により、有害事象をみとめず、また新生物の出現もなく安全であることが示された。また、幹細胞投与部位における血流増加の所見が得られた。

F. 研究発表

1) 頭頸部癌治療後の嚥下造影の簡易評価法 AsR スコアの提案. 藤本 保志, 吉川 峰加, 若井 健二, 小澤 喜久子, 加藤 健, 丸尾 貴志, 杉浦 淳子, 二村 美也子, 田嶋 あゆみ, 中島 務. 嚥下医学 (2186-3199)1 巻 1 号 Page153-158(2012.02)

2) 喉頭癌音声温存術式の音声・嚥下機能の比較. 藤本保志, 岩田義弘, 小澤喜久子, 安藤篤, 三宅真理子, 中島務. 喉頭 19(2), 70-74、2007

G. 論文発表

Changes in laryngeal sensation evaluated with a new method before and after radiotherapy. Ozawa K, Fujimoto Y, Nakashima T. Eur Arch Otorhinolaryngol, 267, 811-816, 2010
Swallowing Function Following Extensive Resection of Oral or Oropharyngeal Cancer With Laryngeal Suspension and Cricopharyngeal

Myotomy. Yasushi Fujimoto, Yasuhisa Hasegawa, Hiroko Yamada, Atsushi Ando, Tsutomu Nakashima, Laryngoscope, 117:1343-1348, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. References

1). Mikaelian DO, Lowry LD, Sataloff RT. Lipoinjection for unilateral vocal cord paralysis. Laryngoscope. 1991;101:465-8.

2). 田村悦代、福田宏之、楠山敏行、他：声帯内自家脂肪注入後の残存脂肪に対する画像診断（会議録）. 日耳鼻., 111:395, 2008.

3). Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Kojima H, Magruffov A, Hiratsuka Y, et al. Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2003;112:915-20.

4). Lee BJ, Wang SG, Lee JC, Jung JS, Bae YC, Jeong HJ, et al. The prevention of vocal fold scarring using autologous adipose tissue-derived stromal cells. Cells Tissues Organs. 2006;184:198-204.

5). Woodson G. Developing a porcine model for study of vocal fold scar. J Voice. 2012;26:706-10.

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

腹圧性尿失禁に対する傍尿道脂肪由来注入細胞の基礎的評価

研究分担者 山本徳則 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科学 准教授

研究要旨

現在、腹圧性尿失禁症例に対して自己皮下脂肪から ADRCs(脂肪組織由来間葉系前駆細胞)を分離し、非培養で傍尿道周囲へ注入する臨床研究を実施中である。本研究では、臨床研究に関連した基礎的検討として、注入する細胞の特性を基礎、臨床の *in vitro*, *in vivo* で明らかにした。注入に用いる豚 ADRCs、およびヒト ADRCs は、培養下 2 継代で著明なコロニーを形成し、細胞全体の 0.8 から 2.2% を占めていた。コロニーを形成した細胞中、 α SMA 染色陽性細胞は 6 割から 8 割を占め、注入する ADRCs はより平滑筋細胞分化する性質を有していることが明らかとなった。また、これらの細胞は再生に必要な HEGF, VEGF を分泌し、この非培養細胞をラット、豚の傍尿道に注入すると、傍尿道周囲が膨隆して容積効果を示し、膨隆部は平滑筋の構造を有することを確認した。

A. 研究目的

これまでに行ってきた基礎研究データを基に、腹圧性尿失禁症例に対して、幹細胞分離装置を用いた臨床自己脂肪組織由来幹細胞治療(非培養法)を開始した。本研究では、その臨床で用いられる ADRCs : 脂肪組織由来幹(間葉系前駆)細胞の細胞特性を *in vitro*, *in vivo* で明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(実験 1) 豚 ADRCs コロニーアッセイと α SMA 陽性細胞

大動物として豚を対象に臨床治療におけると同様に、自己吸引脂肪を細胞分離装置(Celution)を用いて ADRCs を抽出し、2 継代培養を行い、培養細胞のコロニーカウントとその細胞の α smooth

muscle(α SMA)染色で陽性細胞の割合を算出した。

(実験 2) 臨床で注入した ADRCs コロニーアッセイと α SMA 陽性細胞

臨床でヒト吸引脂肪から分離した、ADRCs を flow cytometry を行い表面抗原を明らかにした。また、豚同様 ADRCs の 2 継代培養を行い、培養細胞のコロニーカウントとその細胞の α SMA 染色で陽性細胞の割合を算出した。

(実験 3) 筋原性の組織構造が構築されているか ADRCs 注入傍尿層周囲組織を平滑筋抗体で特性の高い myosin heavy chain(MHC)で染色した。

(実験 4) ヒト ADRCs 培養上清サイトカイン測定

臨床でヒト吸引脂肪から分離した、