

令和元年6月6日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11385

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた高齢者難治性皮膚潰瘍の治療法の開発

研究課題名(英文) Effect of dedifferentiated fat (DFAT) cells for intractable skin ulcers in the senior citizen.

研究代表者

櫻村 勉 (KASHIMURA, Tsutomu)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：20570740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、脂肪組織から高い増殖能と間葉系幹細胞と同等の多分化能を示す細胞群(脱分化脂肪細胞dedifferentiated fat cells, DFAT)を調製する培養法を確立した。本研究では、高齢者の難治性皮膚潰瘍に対するDFATを用いた治療法の検討を行った。ラットに阻血により一定の壊死を生じる背部皮弁を作製しDFATの投与により壊死を救済しつつかを検討した。9ヶ月齢のラット及び糖尿病を有するラットを用いた。それぞれの実験群でDFATにより一定の皮弁生着域拡大効果が得られた。高齢や基礎疾患を有する血流不全に起因する難治性皮膚潰瘍治療へDFATの臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、急速な高齢化や生活習慣の変化などにより、動脈硬化症、糖尿病などに起因する高齢者の皮膚難治性潰瘍の患者が増加している。高齢者の皮膚難治性潰瘍は、患者のQOLを著しく低下させるのみでなく、長期の入院を要するなど社会的な問題にもなっている。治療法として保存的治療から手術療法まで種々の方法が開発されてきたが、短期間かつ低侵襲で施行できる治療法は確立されていないのが現状である。DFATによる新しい皮膚難治性潰瘍治療法の開発は、患者への福音となるにとどまらず医療費の削減など社会的に大きな意義を持つと考える。

研究成果の概要(英文)：In recent years, with the aging of the population, the number of patients with intractable skin ulcers has increased rapidly and has become a social problem. We have established a cell culture method aimed at preparing dedifferentiated fat (DFAT) cells with a high proliferative capacity and pluripotency comparable to mesenchymal stem cells. In this study, we examined the treatment method using DFAT for intractable skin ulcers in the senior citizen. We created a random pattern skin flap in back of rats that was partially necrosis due to ischemia and examined the enlarging effect of DFAT injection on skin flap survival area. Aging rats (9 months old) and rats with type2 diabetes were used. In each experimental group, DFAT provided a flap survival area expansion effect. The possibility of the clinical application of DFAT to the treatment of intractable ischemic skin ulcer caused by blood flow failure with old age and underlying disease was suggested.

研究分野：形成外科

キーワード：脱分化脂肪細胞 皮膚潰瘍 高齢者 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

近年、急速な高齢化や生活習慣の変化などにより、動脈硬化症や糖尿病の患者が増加している。これらの高齢化や疾病構造の変化に関連して、高齢者の難治性皮膚潰瘍の患者が急増し社会問題にもなっている。高齢者の難治性皮膚潰瘍は、長期に渡る治療を要し、患者のQOLを著しく低下させる。そのため、短期間で治癒を可能とする新しい治療法の確立が喫緊の課題となっている。難治性皮膚潰瘍治療は、軟膏塗布などの保存的治療、局所陰圧閉鎖療法、さらにデブリードマンや皮膚移植・皮弁移植などの外科的治療など患者背景や病状に応じて複数の治療のオプションがある。さらに、近年では各種の幹細胞を用いた再生医療による新規な治療法開発が広く進められている。

骨髄や脂肪を細胞ソースとした間葉系幹細胞(MSC)は、その多分化能並びに種々の液性因子の分泌能により、多様な分野での治療が検討されている。われわれは皮下脂肪組織を体外で脱分化させることにより、高い増殖能とMSCと同等の多分化能を示す細胞群(脱分化脂肪細胞 dedifferentiated fat cells, 以下: DFAT)を調製する培養法を確立した[1]。平成24-26年度(基盤研究(C) 研究代表者:副島 一孝、研究分担者:櫻村 勉)ラットの全層皮膚欠損創における人工真皮移植並びに皮膚移植術とDFAT投与の併用効果について検討を行った。DFATの投与により、人工真皮や植皮片への血管新生が促進されることを明らかにした[2]。平成25-27年度(挑戦的萌芽研究:25670755、研究代表者:櫻村 勉)一定の壊死を生じるラット背部皮弁へのDFATの投与による皮弁生着域拡大効果について検討を行った。DFATの投与により、皮弁内の血管新生が得られ平均生着域が有意に拡大することを明らかにした[3]。

動脈硬化や糖尿病を基礎疾患に持つ難治性皮膚潰瘍では、いずれも局所の血流障害が病因並びに治療に大きく関与している。これまでの検討により、DFATは皮膚軟部組織において良好な血管新生作用を有することが明らかになっており、DFATが難治性皮膚潰瘍治療の新しい治療のオプションとなり得ると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DFATを用いた高齢者の難治性皮膚潰瘍の新しい治療法の開発である。これまでの研究でDFATにより、人工真皮や皮弁内への血管新生が促進されることを明らかにしてきた[2,3]。今回、臨床の現場において喫緊の課題である難治性皮膚潰瘍治療への応用の検討を行う。糖尿病や従来との異なる週齢のラットを用いた種々の皮膚軟部組織の阻血に対するDFATの治療効果を検討するため、以下の実験を行った。(1)同種DFATによる検討、(2)糖尿病ラットを用いた検討、(3)9ヶ月齢のラットを用いた検討。これらの実験より難治性皮膚潰瘍に対する新たな治療法の確立を目的とし、基礎データの集積を行った。

3. 研究の方法

(1)ラット皮下脂肪採取とDFATの単離・培養

全身麻酔下にそれぞれの実験系で使用するラットの腹部から鼠径部の皮下脂肪細胞を採取した。採取した脂肪組織をコラゲナーゼ処理後、遠心操作により浮遊する成熟脂肪細胞を、培地にみたしたフラスコの天井側で培養することによって脱分化脂肪細胞を単離した。培養後7日後にフラスコを反転して通常の付着培養を行った。約2-3週間培養して得られた脱分化脂肪細胞を凍結保存し実験に使用した。

(2)同種異系DFATによる検討

高齢者の治療において、緊急時など同種細胞による治療も選択肢の一つとなり得る。そこで、Sprague Dawley(以下:SD)系ラットの背部に乱走型皮弁を挙上し、Green Fluorescent Protein(以下:GFP)陽性のWistar系ラットより調整したDFATを注入し組織学的検討を行った。2%イソフルランによる全身麻酔下腹臥位で手術を行った。SD系ラットの背部に尾側を茎とした2×9cm大の乱走型皮弁を挙上した。皮弁挙上時に、肉眼的観察およびドップラー聴診器を用いて皮弁基部に有軸血管を含まないことを確認した。挙上した皮弁は、母床からの血管新生の影響を除外するためシリコンシートを挿入し皮弁挙上部に再縫合した。GFP陽性のWistar系ラットより調整したDFATを 1×10^6 cells/0.1mlを皮弁基部より2cm末梢に投与した(n=5)。術後5日目に、皮弁部分の皮膚軟部組織を採取しGFPと新生血管のマーカーであるisolectin B4の蛍光免疫染色を行った。

(3)糖尿病ラットを用いた検討

高齢者の難治性皮膚潰瘍において、頻度が高く最も治療に難渋することの多い糖尿病性潰瘍に関する検討を行った。2型糖尿病を有するSD系ラットであるSDT-Fattyラットを用いて同様に検討した。SDT-Fattyラットの背部皮弁を使用して、Phosphate Buffer Saline 0.1ml (以下: PBS)を皮弁基部より2cmに投与する対照群: Group (未治療) (n=10)と健常なラットから調整したDFATを皮弁基部より2cmに投与する群: Group (DFATを 1×10^6 cells/0.1ml投与)を作製した。また、健常なSD系ラットの背部皮弁を使用して、SDT-Fattyラットから調整したDFATを同様に皮弁基部より2cmに投与する群: Group (1×10^6 cells/0.1ml投与)を作製した。

術後14日目にデジタルカメラで皮弁を撮影し画像解析ソフトウェア (pop imaging®)を用いて皮弁生着域の評価をおこなった。同日、採取した組織検体をH-E染色、内皮細胞の同定に用いられるCD31、血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)の免疫染色を行い画像解析ソフトウェア (pop imaging®)により、皮弁内の単位面積当たり (0.5mm^2)の陽性部分の面積比を比較し評価を行った。

(4) 9ヶ月齢のラットを用いた検討

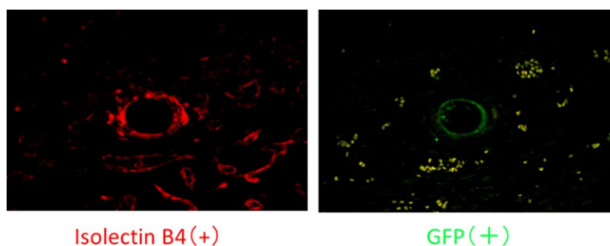
これまでの検討は、主に7週齢の若齢ラットを利用した。そこで、年齢の異なる9ヶ月齢のSD系ラットを用いて同様に検討した。9ヶ月齢のSD系ラットの背部皮弁を使用して、PBSを皮弁基部より2cmに投与する対照群: Group (未治療) (n=10)と健常な7週齢のSD系ラットから調整したDFAT (1×10^6 cells/0.1ml)を皮弁基部より2cmに投与する群: Group (n=10)と9ヶ月齢のSD系ラットから調整したDFAT (1×10^6 cells/0.1ml)を皮弁基部より2cmに投与する群: Group (n=10)および健常な7週齢のWistar系ラットから調整したDFAT (1×10^6 cells/0.1ml)を皮弁基部より2cmに投与する群: Group (n=10)を作製した。

術後14日目にデジタルカメラで皮弁を撮影し同様に生着域の計測と組織学的検討を行った。また、9ヶ月齢のラットを用いた実験群では、皮弁挙上直後・術後14日にレーザードップラー血流計 (ポケットLDF®)により皮膚軟部組織の血流を評価した。

4. 研究成果

(1) 同種異系DFATによる検討

SD系ラットの背部皮弁にGFP陽性のWistar系ラット由来のDFATを投与した。投与後5日目に採取した皮弁内には、蛍光免疫染色でGFP陽性細胞とその周囲に多数のIsolectin B4陽性の細胞を認めた。GFP陽性細胞を認めたことから、同種異系のWistar系ラットに由来するDFATがSD系ラットの皮弁内に生着したことが確認できた。また、新生血管に発現するIsolectin B4を多数認めたことより、生着したDFATにより皮弁内の新生血管が増加したことが示唆された。

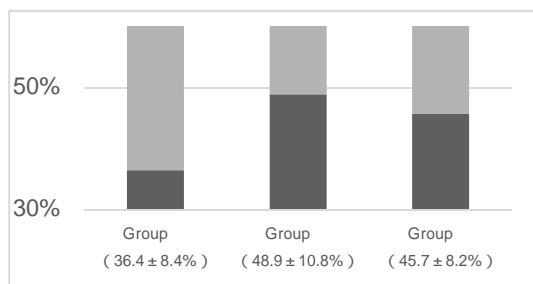


(2) 糖尿病ラットを用いた検討

皮弁生着域

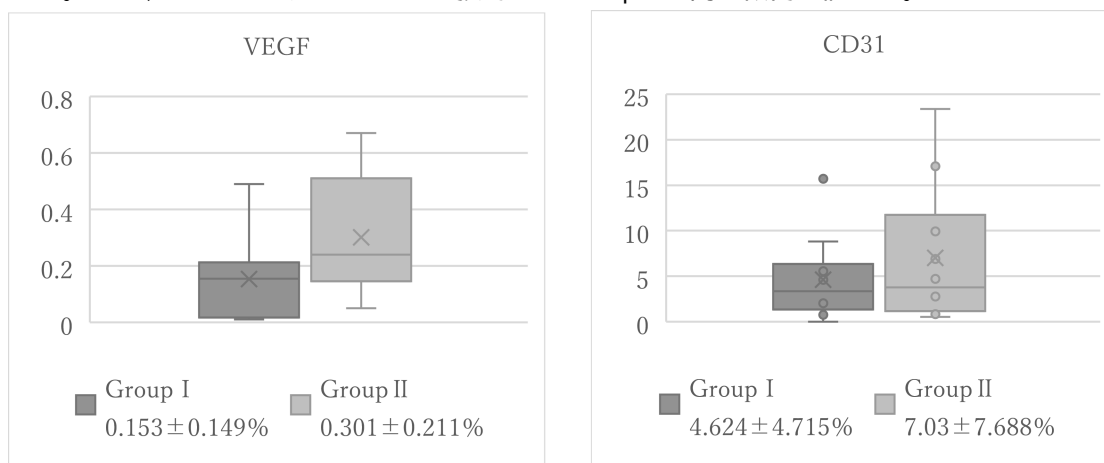
生着域は、糖尿病ラットの背部皮弁に対して対照群のGroupが $34.5 \pm 9.2\%$ 、健常ラット由来のDFAT投与したGroupが $48.9 \pm 10.8\%$ であった。健常なSD系ラットの皮弁に糖尿病ラット由来のDFAT投与したGroupの生着域が、 $45.7 \pm 8.2\%$ であった。

Groupにおいては、健常ラット ($53.6 \pm 6.1\%$)よりも生着域が有意に小さかった。健常ラットに由来するDFAT投与したGroupで生着域の拡大効果が得られた。一方で、糖尿病ラットに由来するDFATを投与したGroupでは明らかな生着域拡大効果が得られなかった。

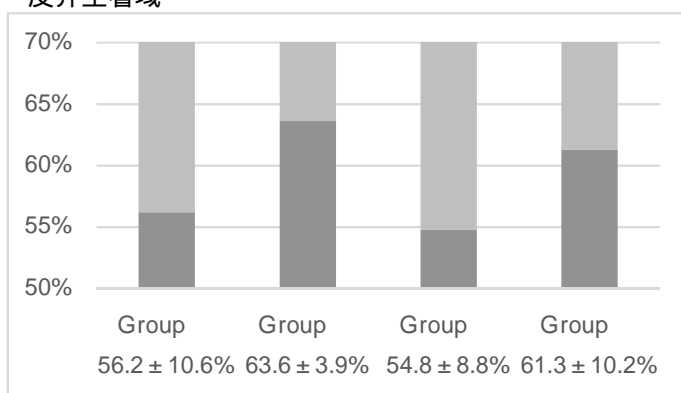


組織学的検討

VEGF の平均陽性面積は、Group が $0.153 \pm 0.149\%$ であり Group が $0.301 \pm 0.211\%$ であった。CD31 の平均陽性面積は、Group が $4.624 \pm 4.715\%$ であり Group が $7.03 \pm 7.688\%$ であった。VEGF、CD31 のいずれも DFAT を投与した Group で高い傾向を認めた。



(3) 9ヶ月齢のラットを用いた検討 皮弁生着域



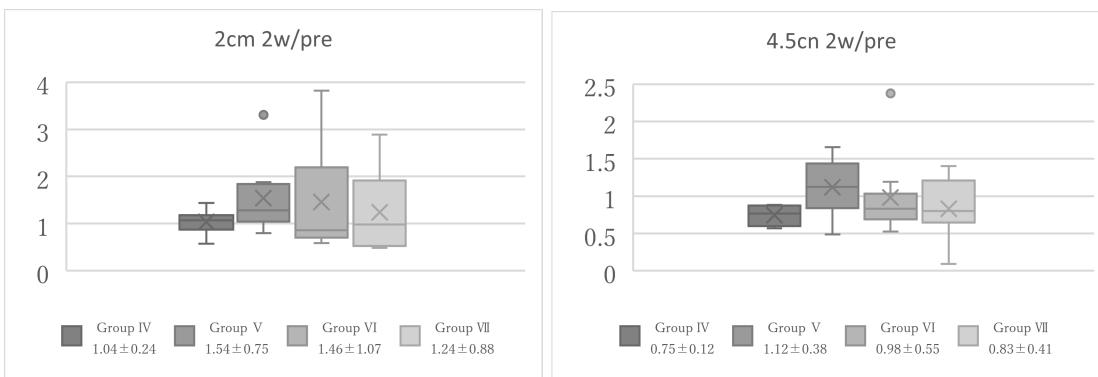
生着域は、9ヶ月齢の SD ラットの対照群である Group が $56.2 \pm 10.6\%$ 、7週齢の SD 系ラット由来の DFAT を投与した Group が $63.6 \pm 3.9\%$ 、9ヶ月齢ラット由来の DFAT を投与した Group が $54.8 \pm 8.8\%$ 、7週齢由来の Wistar 系ラット由来の DFAT を投与した Group が $61.3 \pm 10.2\%$ であった。

Group でも7週齢の Control の皮弁生着域 ($53.6 \pm 6.1\%$) と同等の生着域であった。また、7週齢に由来する同種同系 (Group) もしくは

同種異系 (Group) のラットに由来する DFAT で皮弁生着域の拡大効果が得られた。一方で9ヶ月齢のラット (Group) に由来する DFAT を投与した Group では、明らかな皮弁生着域拡大効果が得られなかった。

ドップラー血流計の測定

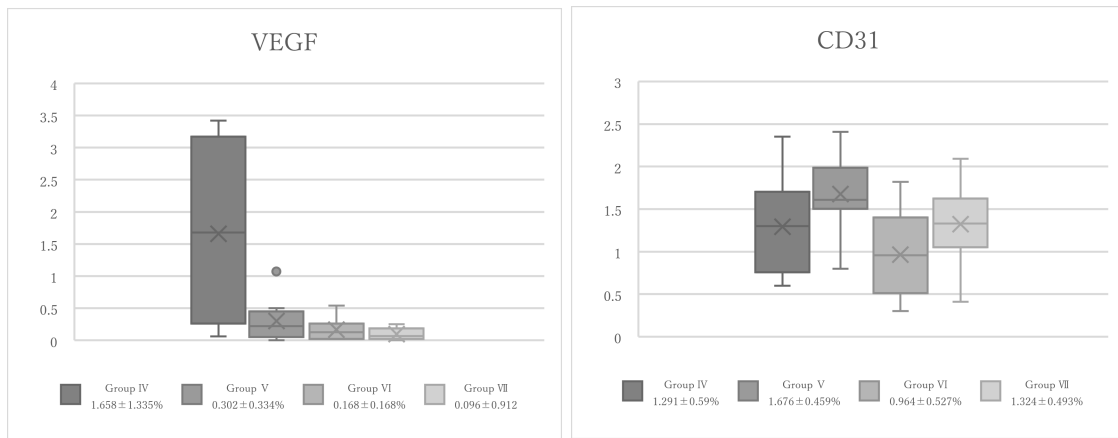
皮弁の基部より 2 cm と 4.5 cm の部位において、術後 2 週間と皮弁挙上前の血流の割合を比較した。DFAT を投与しなかった Group においては、DFAT を投与した Group ~ と比較し血流量が少ない傾向を認めた。特に7週齢ラットの DFAT を投与した Group では、皮弁挙上前よりも術後 2 週間の方が皮弁基部から 2 cm および 4.5 cm のいずれでも血流量が増加する傾向を認めた。



組織学的検討

VEGF の平均陽性面積は、Group が $1.658 \pm 1.335\%$ 、Group が $0.302 \pm 0.334\%$ 、Group が $0.168 \pm 0.168\%$ 、Group が $0.096 \pm 0.912\%$ であった。CD31 の平均陽性面積は、Group が $1.291 \pm 0.59\%$ 、Group が $1.676 \pm 0.459\%$ 、Group が $0.964 \pm 0.572\%$ 、Group が $1.324 \pm 0.493\%$ であった。

Group においては、他の Group と比較して CD31 陽性を呈する新生血管が少ない一方で、VEGF の発現が多かったと考える。ドップラー血流計の検討においても術前と比較して血流量は増加しておらず、皮弁内の血管新生が不良であり、酸素需要が高い状態が維持されていたと考える。7 週齢のラットに由来する DFAT を投与した Group においては、ドップラー血流計で血流量の増加を認めたものの CD31 の発現は少なく今後の検討課題と思われた。



これまでにわれわれは、7 週齢のラットの背部の皮弁を用いて DFAT による皮弁の生着域の拡大効果について検討を行ってきた。その結果、皮弁の平均生着面積は、対照群が $53.8 \pm 6.5\%$ であり、同種同系 DFAT 投与群が $65.8 \pm 2.4\%$ 、同種異系 DFAT 投与群が $62.8 \pm 5.9\%$ であった。DFAT の投与により皮弁の生着域が拡大することを明らかにした。今回、高齢患者の難治性皮膚潰瘍の治療法の開発のため実験を行った。従来の実験では、健常な若齢ラットを用いて検討しており、臨床の患者背景とは大きくかい離するものであった。

今回、高齢者の難治性潰瘍の基礎疾患で最も一般的な糖尿病を有するラットおよび 9 ヶ月齢のラットを用い、より臨床の患者背景に近い条件で検討を行った。糖尿病ラットでは、対照群の生着域が健常ラットと比較し著明に小さく、糖尿病による組織の阻血に対する脆弱性が示唆された。一方で 9 ヶ月齢ラットの対照群の生着域は、7 週齢の健常ラットと比較して明らかな差異を認めなかった。同種同系の 7 週齢ラット由来の DFAT を投与した群では、いずれの皮弁生着域の拡大効果を認めた。また、同種異系の 7 週齢ラット由来の DFAT 投与においても一定の皮弁生着域拡大効果を認めた。しかしながら、糖尿病ラットおよび 9 ヶ月齢のラットに由来する同種同系ラットの DFAT では、明らかな皮弁生着域の拡大効果を認めなかった。これまでと同様に DFAT が皮弁生着域の拡大効果を有することが明らかになり、高齢者の皮膚難治性皮膚潰瘍に対して DFAT による新規な治療法の開発への基礎データの蓄積ができた。その中で、患者背景に応じて細胞の供給源の検討をする可能性が示唆された。しかしながら、難治性皮膚潰瘍の病態の相違、実験モデルとしての皮弁、動物種など今後も継続して検討が必要である。

参考文献

1. Matsumoto T, et al.: Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *Journal of Cellular Physiology* 215(1):210-222, 2008
2. Soejima K, Kashimura T, Matsumoto T, Nakazawa H. et al.: Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting. *Journal of*

plastic surgery and hand surgery. 2014

3. Kashimura T, Soejima K, Matsumoto T, Nakazawa H, et al.: The Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on a Dorsal Skin Flap Model. Journal of Investigative Surgery 16:1-7, 2015

5. 主な発表論文など

[学会発表](計3件)

Kashimura T, Soejima K, Kikuchi Y, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H, The Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on Ischemic Tissue of Normal and Diabetic Rat., International Federation for Adipose Therapeutics and Science Annual meeting, 2018年

櫻村 勉、副島 一孝、仲沢 弘明、風間 智彦、松本 太郎, 脱分化脂肪細胞による血流不全組織の救済効果に関する検討、平成29年度戦略的研究基盤形成支援事業 研究成果公開シンポジウム、2018年

Kashimura T, Soejima K, Kikuchi Y, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H, The Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on Ischemic Tissue, 17th European Adipose Association Congress, 2017年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：副島 一孝

ローマ字氏名：(SOEJIMA, Kazutaka)

所属研究機関名：日本大学・医学部

職名：准教授

研究者番号：00246589

研究分担者氏名：松本 太郎

ローマ字氏名：(MATSUMOTO, Taro)

所属研究機関名：日本大学・医学部

職名：教授

研究者番号：50366580

研究分担者氏名：仲沢 弘明

ローマ字氏名：(NAKAZAWA, Hiroaki)

所属研究機関名：日本大学・医学部

職名：教授

研究者番号：60180270