

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11556

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞と凝固因子由来タンパク質を用いた新しいケロイド治療の開発

研究課題名(英文) Development of a new keloid treatment using dedifferentiated fat cells and coagulation factor-derived protein.

研究代表者

仲沢 弘明 (NAKAZAWA, Hiroaki)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60180270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗炎症作用と血管新生作用を持つ脱分化脂肪細胞(DFAT)と抗線維化作用を持つ第Ⅸ凝固因子由来上皮成長因子(EGF-F9)を用いた新しいケロイド治療の検討を行った。予備実験としてケロイドと同様に膠原線維の増生を生じる異物挿入モデルを用いて検討を行った。結果、EGF-F9の投与で膠原線維の増殖が抑制され、強い予防効果を認めた。DFATの投与では、予防効果と治療効果の両方を認めた。次にヒトケロイド組織の移植モデルにおいて検討を行った。結果、EGF-F9はケロイド組織の膠原線維の減少効果を持つことが示唆された。EGF-F9とDFATのいずれもケロイドの診療への有効性を有すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケロイドは、日常診療において経験することの多い疾患であるが、未だ、治療に難渋する疾患である。その詳細な病因・病態の解明には至っておらず、再発の多い難治性の疾患であり、根治性のある治療は確立されていない。

本研究で抗炎症作用と血管新生作用を持つDFATと抗線維化作用を持つと考えられるEGF-F9を用いて検討した結果、いずれでも一定の効果が得られ、ケロイド・肥厚性癬痕の新しい治療のオプションとなりえることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated a new treatment for keloids using dedifferentiated fat cells (DFAT), which has anti-inflammatory and angiogenic effects, and Epidermal Growth Factor domain of coagulation factor IX (EGF-F9), which has anti-fibrotic effects. As a preliminary experiment, we used a foreign body insertion model that produces collagen fibril growth similar to keloids. The results showed that the administration of EGF-F9 inhibited the proliferation of collagen fibers and had a strong preventive effect. The administration of DFAT showed both preventive and therapeutic effects. Next, we examined the results in a human keloid tissue transplantation model. The results suggest that EGF-F9 has the effect of reducing the collagen fibrils in keloid tissue. This study suggests that both EGF-F9 and DFAT are effective in the treatment of keloids.

研究分野：形成外科

キーワード：ケロイド 肥厚性癬痕 脱分化脂肪細胞 DFAT 第Ⅸ凝固因子由来上皮成長因子 インプラント 被膜拘縮

## 1. 研究開始当初の背景

ケロイドは、外傷・外科手術・熱傷後などの瘢痕や炎症性皮膚疾患さらには正常皮膚などに生じる赤色の増殖性の腫瘍性皮膚病変であり、醜状を呈するのみならず疼痛や搔痒を伴い患者のQOLを著しく損ねる。ケロイドの治療として、ステロイドの局所投与・局所の圧迫療法・トラニラストの内服・手術による切除や電子線の照射が行われているが、治療効果が乏しく局所再発を繰り返すことも少なくない。ケロイドの病態は、創傷治癒過程での炎症の遷延に加えて、真皮内における繊維芽細胞の増殖および型コラーゲンやプロテオグリカンを中心とする細胞外マトリックスの蓄積によるものとされている。ケロイドは日常診療で経験することの多い疾患である一方、ヒトにおいてのみ発生するため、詳細な病因・病態・治療法の検討が行われていない疾患の一つである。

間葉系幹細胞は、その多分化能ならびに種々のサイトカインの分泌能による paracrine により、多様な分野での治療が模索されている。ケロイドにおいても新しい治療法として、幹細胞の抗線維化作用や血管新生作用による治療の有効性に関する報告がみられる。われわれはブタの皮下脂肪組織を体外で脱分化させることにより、高い増殖能と他の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。これまでに DFAT が組織内で豊富な血管新生作用を有することを明らかにしてきた。さらに DFAT には、一定の抗炎症作用と抗線維化作用を有することが明らかになっている。DFAT の抗炎症作用と抗線維化作用は、ケロイドの治療に有効と考えられた。

近年、幾つかの凝固因子には凝固活性以外の機能があることが判明し、その生理学的・病理学的意義についての研究が増えている。第Ⅸ凝固因子は、凝固因子のタンパク質であり、第一上皮成長因子(epidermal growth factor; EGF)ドメインはCXDXXXXYXCXCのアミノ酸配列(EGF-F9)を持つ。われわれは、EGF-F9 が一定の抗線維化作用を有すると考えている。本学では、EGF-F9 について研究を行い、貪食亢進やアポトーシス誘導や接着抑制・遊走亢進などの多彩な機能を持つことを明らかにしてきた。さらに、これらの作用が創傷治癒過程に影響を与えると考え、マウスの背部全層皮膚欠損創に対し EGF-F9 を投与しその影響につき検討した。EGF-F9 投与群は、対照群と比較して創傷治癒までの期間の短縮は認められなかった。しかしながら、創治癒後の創部周囲の拘縮による皮膚の皺の形成が有意に抑制された。また、組織学的検討では EGF-F9 投与群でコラーゲンの形成が有意に抑制されていた。これらより、EGF-F9 が組織の線維化を予防する作用を有し、ケロイド治療への応用の可能性を持つと考えた。

## 2. 研究の目的

ケロイドは、日常診療において経験することの多い疾患であるが、未だ、治療に難渋する疾患である。その詳細な病因・病態の解明には至っておらず、再発の多い難治性の疾患であり、根治性のある治療は確立されていない。

今回、抗炎症作用と血管新生作用を持つ DFAT と抗線維化作用を持つと考えられる EGF-F9 を用いてケロイドおよび肥厚性瘢痕の新しい治療法の確立のため研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) DFAT の調整

全身麻酔下に Sprague-Dawley (SD) 系ラットの腹部の皮下脂肪細胞を採取した。採取した脂肪組織をコラーゲナーゼ処理後、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 DFAT 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う。約2週間培養して得られた DFAT を凍結保存した。DFAT は、事前に凍結保存されているものを使用した。

### (2) EGF-F9 の調製

過去の報告から、凝固第Ⅸ因子のアミノ酸残基 47-130 に、最も高い治療効果が期待できると考えた。そこで、マウス凝固第Ⅸ因子のアミノ酸残基 47-130 からなる欠変異体の cDNA を逆転写ポリメラーゼ反応 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) により作製し、発現ベクターである AP-tag4 ベクター GenHunter, Nashville, TN, USA) に挿入した。このプラスミドを Chinese Hamster Ovary 細胞に導入し、培養することにより、組み換えタンパクを作製した。コントロールタンパクは、AP-tag4 ベクターのみを細胞に導入して作製した。

### (3) 異物挿入モデルでの検討

前述の通りケロイドおよび肥厚性瘢痕は、ヒトに特異的な疾患であり動物実験での再現が困難である。したがってより簡便に基礎データを収集するためにラットの異物の挿入モデルを使用し検討を行った。異物の挿入によって、ラットを含む生体は異物の周囲に線維成分に富む被膜を形成する。この被膜による被膜拘縮は、線維増殖性疾患としてケロイド肥厚性瘢痕と類縁疾患とされており本研究の初期に異物挿入モデルを使用した。

7週齢のSD系ラットの背部に2箇所/個体の皮下ポケットを作成し、シリコン製のSooth typeのティッシュエキスパンダー(Koken社製)より作成した2×2cm大のインプラントを挿入した。挿入と同時にインプラント表層にPBS(0.1ml, n=10)/EGF-F9(100pM/0.1ml, n=10)/DFAT( $1 \times 10^4$ cells/0.1ml, n=10)を投与する予防投与群および間経過して被膜を形成した後に同様にPBS(control: 0.1ml, n=10)/EGF-F9(100pM/0.1ml, n=10)/DFAT( $1 \times 10^4$ cells/0.1ml, n=10)を4週間かけて注入する治療投与群を作成した(各群n=10)。予防投与群では挿入術後4週間、治療投与群では挿入術後8週間で組織採取を行い評価した。(図1)

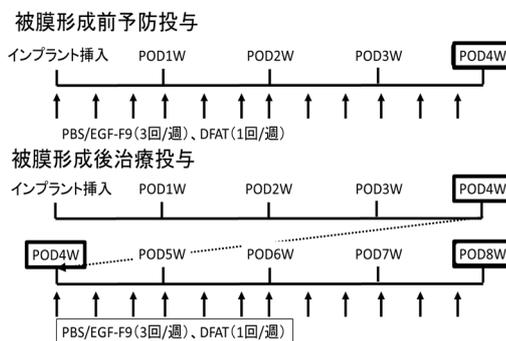


図1：異物挿入の実験スケジュール

採取した検体をHematoxylin Eosin (HE)染色、コラーゲン染色、 $\alpha$ -smooth muscle actin (ASMA)染色を行った。それぞれの群で、被膜の厚さを計測した。インプラントの表層の被膜の5箇所を計測しその平均値を被膜の厚さとした。ASMAの染色では、画像解析ソフトウェア(pop imaging®, Ver5.00, Dbkids)により、被膜内の $0.05 \text{ mm}^2$ 当たりの陽性部分の面積比を比較し評価を行った。統計解析はMann-Whitney U-testで行い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

#### (4) ヒトケロイド組織の移植モデルでの検討

ケロイド患者の切除手術の際に得られた切除検体の一部を免疫不全マウスに移植しEGF-F9およびDFATの効果について検討した。ヒトの検体を使用するため、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の審査と承認(承認番号: RK-181113-1)を受け研究を行った。

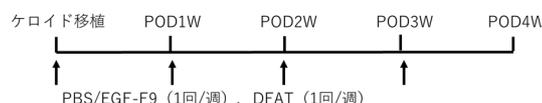


図2：ケロイド移植の実験スケジュール

ケロイド患者の手術検体の一部より組織の提供を受けた。ケロイドを脱上皮し組織を $13 \times 13 \times 5 \text{ mm}$  (0.6-0.8g)の直方体に形成し、免疫不全マウス(CB17/lcr-Prkdcscid/CrIcrIj)の背部に移植した。移植と同時にPBS(0.1ml)を投与する対照群(n=3)とEGF-F9(100pM/0.1ml, n=4)もしくはDFAT( $1 \times 10^4$ cells/0.1ml, n=3)を投与する治療群を作成した。それぞれの群で週に1回の投与を行った。移植後4週間で、ケロイド組織を摘出し大きさ、重量を測定した。また、HE染色・コラーゲン染色、masson trichrome染色などによる組織学的検討を行った。(図2)

### 4. 研究成果

#### (1) 異物挿入モデルでの検討

いずれの群においても挿入した異物の周囲に繊維成分に富む被膜が形成されていた。

##### (1)- EGF-F9の効果

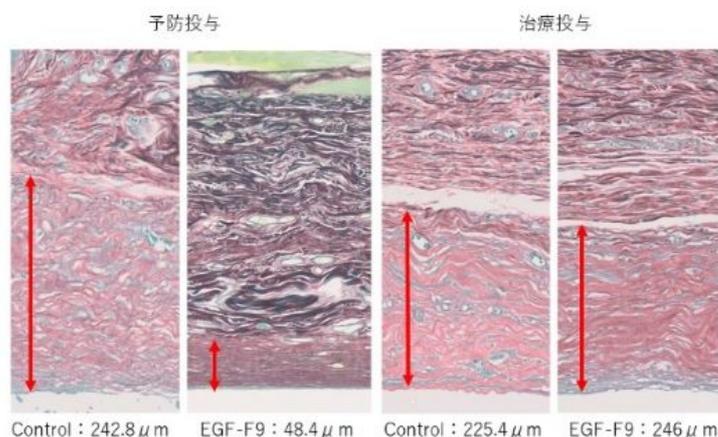


図3：対照群とEGF-F9投与群の代表例

EGF-F9投与群の代表例の被膜部分の組織像を示す。(図3) 予防投与の対照群では、 $228.1 \pm 45.2 \mu\text{m}$ 、EGF-F9投与群では、 $48.1 \pm 12.8 \mu\text{m}$ 、の被膜が形成されていた。治療投与の対照群では、 $240.5 \pm 48.0 \mu\text{m}$ 、EGF-F9投与群では、 $221.2 \pm 63.3 \mu\text{m}$ 、の被膜が形成されていた。EGF-F9の予防投与では、被膜の厚さが著明に薄く、対照群と比較し有意差を認めた。(図4) 一方で、治療投与では、差を認めなかった。EGF-F9には、被膜形成の予防効果がある一方で、被膜形成後の治療効果は乏しいことが示唆された。また、被膜内

の単位面積当たりのASMAの発現でも被膜の厚さと同様の傾向を認めた。予防投与でASMAの発現が有意に抑制されていた。(図5)

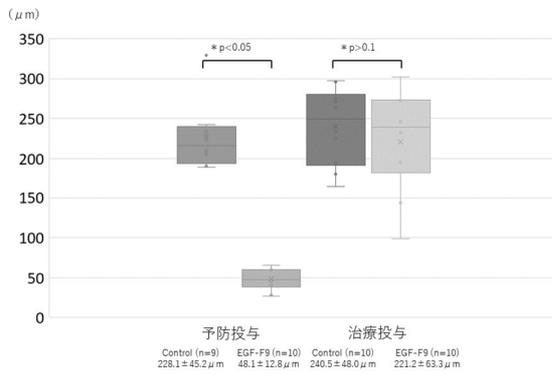


図 4 : EGF-F9 投与群の被膜の厚さの比較

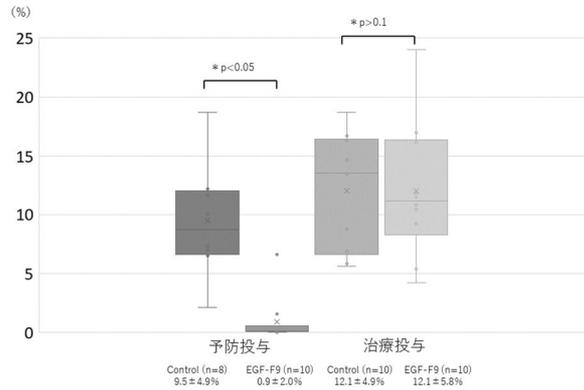


図 5 : EGF-F9 投与群の ASMA の比較

(1)- DFAT の効果

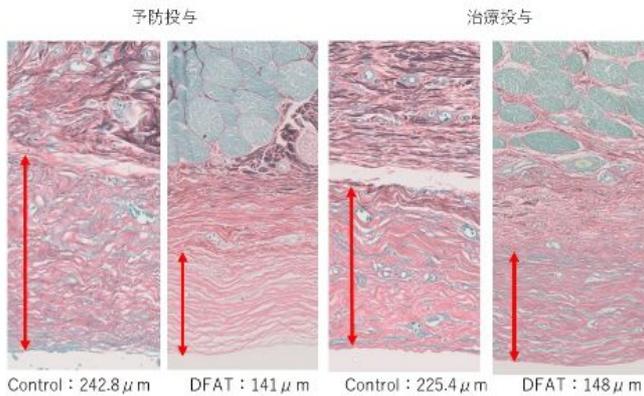


図 6 : 対照群と DFAT 投与群の代表例

DFAT 投与群の代表例の被膜部分の組織像を示す。(図 6) 予防投与の対照群では、 $228.1 \pm 45.2 \mu\text{m}$ 、DFAT の投与群では、 $180.7.1 \pm 63.6 \mu\text{m}$ 、の被膜が形成されていた。治療投与の対照群では、 $240.5 \pm 48.0 \mu\text{m}$ 、DFAT の投与群では、 $167.2 \pm 42.9 \mu\text{m}$ 、の被膜が形成されていた。DFAT の投与では、予防投与、治療投与の両方で有意に皮膜が薄く一定の予防効果と治療効果を認めた。(図 7) また、被膜内の血管数を計測したところ、予防投与において DFAT 投与群で有意に血管数が多く、治療投与でも DFAT 投与群で血管数が多い傾向を認めた。(図 8)

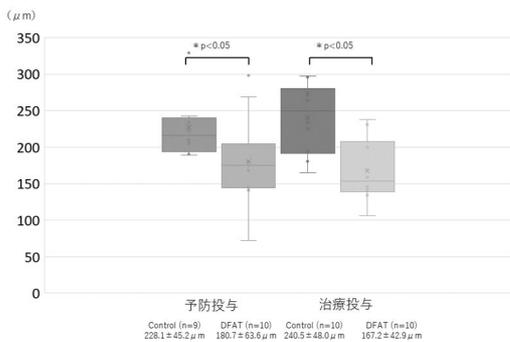


図 7 : DFAT 投与群の被膜の厚さの比較

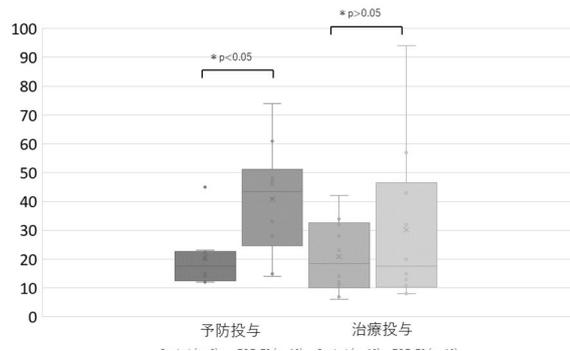


図 8 : DFAT 投与群の被膜の血管数の比較

形成外科領域においては、乳房再建や乳房増大術で異物(インプラント)の挿入が広く行われている。インプラントの挿入後、一部症例で被膜拘縮の重症度分類である Baker 分類の 3 もしくは 4 に相当する被膜拘縮を生じる。これらは、膠原線維の異常な増殖としてケロイドなどと類縁疾患と考えられる。被膜拘縮は、術後の感染、血腫、放射線照射や挿入位置により発症リスクが上昇することが知られており、これらの症例では被膜拘縮の発症を予見することができる。すなわち、被膜拘縮の治療には、予防的介入と治療的介入の 2 通りのアプローチが想定される。同様に、ケロイド肥厚性癒痕でも患者の体質や病変の部位や創傷の状況により、発症のリスクが高いことが知られている。そのため、本研究では被膜形成前の予防投与と被膜形成後の治療投与の検討を行った。その結果、EGF-F9 には線維化に対して強い予防作用を持つことが示唆された。前述のとおり EGF-F9 は、多彩な作用を持つ。また、EGF には、筋線維芽細胞への分化を制御する作用を有することも報告されている。また、われわれは EGF-F9 の投与により MMP (Matrix metalloproteinase) 9 が発現することを明らかにしている。MMP は、細胞外マトリックスの再構築を主な作用に持つ。また、インプラントの被膜拘縮やケロイド肥厚性癒痕は、MMP も関与していることが報告されている。これらの作用により予防投与において被膜の形成が抑制されたと考える。DFAT では、EGF-F9 ほどではないが、一定の予防効果と治療効果を有することが示唆さ

れた。これまでに異物挿入モデルと幹細胞をもちいた研究では、血管新生作用と抗炎症作用により線維化が抑制されたことが報告されている。これまでにわれわれは、皮弁、植皮、人工真皮を用いた研究で DFAT が強い血管新生作用を持つことを明らかにしてきた。本研究では、明らかな炎症性細胞の浸潤の抑制は認めなかったが、DFAT には抗炎症作用を有することが明らかになっている。これらの血管新生作用や抗炎症作用により DFAT が線維化の予防及び治療効果を持つと考えられた。

## (2) ヒトケロイド組織の移植モデルでの検討

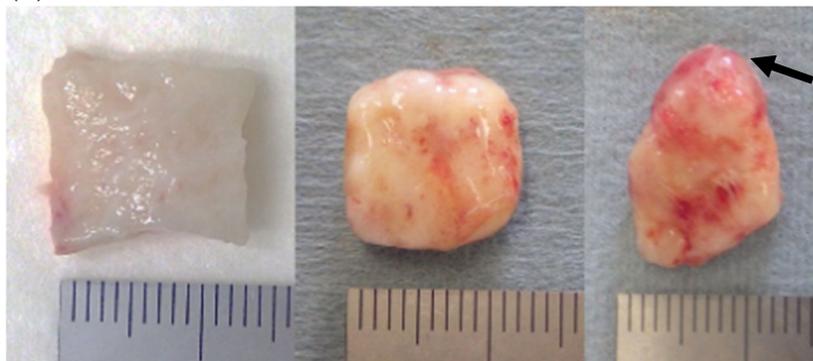


図 9：移植ケロイドの肉眼初見

左：移植前、中：対照群摘出時、右：EGF-F9 群摘出時、軟化部分（ 〇 ）

移植後 4 週間目に摘出したケロイド組織は、対照群とそれぞれの治療群で重量と体積に有意差は認めなかった。

DFAT の投与群では、対照群と比較し肉眼的組織学的に差異を認めなかった。しかしながら、EGF-F9 の投与群の 2 検体においてケロイド組織の一部が膨隆し軟化している箇所を認めた。( 図 9 )

組織学的には、対照群と DFAT 投与群では大きな差異はなく均一な膠原線維から構成されるケロイド組織を認めた。EGF-F9 の軟化した部分（ 図 10 印 ）は、H-E 染色で炎症性細胞の浸潤、コラーゲン染色でコラーゲンの減少、masson trichrome 染色で膠原線維の減少を認めた。( 図 10 ) ヒトケロイド組織を用いた検討では、EGF-F9 の投与で治療効果を認めることが示唆された。

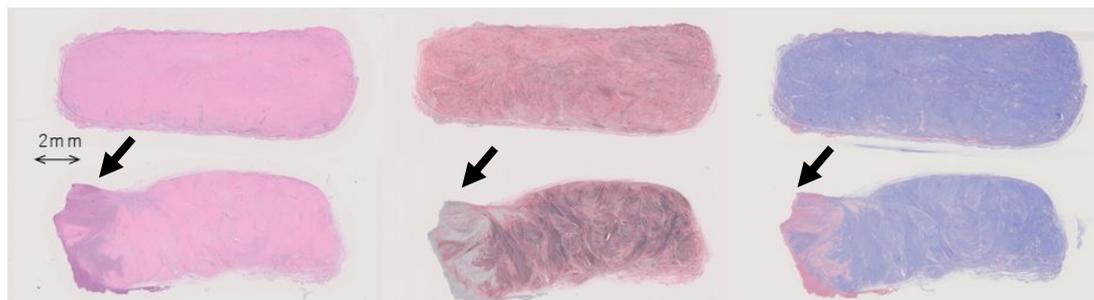


図 10：対照群と EGF-F9 投与群の代表例

左上：対照 HE 染色、中上：対照コラーゲン染色、右上：対照 masson trichrome 染色

左下：EGF-F9HE 染色、中下：EGF-F9 コラーゲン染色、右下：EGF-F9masson trichrome 染色

本研究では、予備実験としてケロイド・肥厚性瘢痕と類縁疾患と考えられる膠原線維の増殖を伴う異物挿入モデルを用いて検討を行った。異物挿入モデルにおいては、EGF-F9 で被膜形成前の投与で強い予防効果を認め、DFAT の投与で予防効果と皮膜形成後の治療効果の両方を認めた。次により臨床像に近いヒトケロイド組織の移植モデルにおいて検討を行った。移植されたケロイドへの投与であり、予備実験の治療投与に相当する実験であった。その結果、予備実験とは異なり EGF-F9 の治療投与によりケロイドの組織破壊の効果を認めた。また、DFAT 投与では、明らかな効果を認める事ができなかった。ケロイド移植モデルでは、実験に用いた個体数が少なく、移植後の投与期間や方法を含め、今後さらに検討を要すると考えられた。

これらの結果から、DFAT および EGF-F9 のいずれもケロイドの新しい治療のオプションとなることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 榎村 勉, 日台 智明, 副島 一孝, 菊池 雄二, 仲沢 弘明	4. 巻 14
2. 論文標題 線維増殖性疾患に対する第9凝固因子由来上皮成長因子の影響に関する検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 瘢痕・ケロイド治療ジャーナル	6. 最初と最後の頁 25-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 榎村 勉、日台智明、菅原 隆、吉田光徳、菊池雄二、副島一孝
2. 発表標題 当科におけるインプラント周囲被膜の基礎研究. 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
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 榎村 勉、日台智明、菅原 隆、長崎敬仁、吉田光徳、菊池雄二、副島一孝、仲沢弘明
2. 発表標題 当科における熱傷後瘢痕に対する再生医療の試み
3. 学会等名 第46回日本熱傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎村 勉、仲沢弘明
2. 発表標題 熱傷治療の変遷
3. 学会等名 第28回日本熱傷学会関東地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻村 勉, 長崎敬仁, 竹田昌平, 吉田栄香, 吉田光徳, 副島一孝, 菊池雄二, 仲沢弘明
2. 発表標題 線維増殖性疾患に対する第9凝固因子由来上皮成長因子 (EGF-F9) の影響に関する検討
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsutomu Kashimura, Takashi Sugawara, Keito Nagasaki Koutoku Yoshida, Yuji Kikuchi, Kazutaka Soejima, Hiroaki Nakazawa
2. 発表標題 Effect of the First Epidermal Growth Factor Motif of Coagulation Factor IX on Fibroproliferative Disease
3. 学会等名 The 2nd Congress of The Asian Pacific Society for Scar Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻村 勉, 長崎敬仁, 竹田昌平, 吉田栄香, 吉田光徳, 副島一孝, 菊池雄二, 仲沢弘明
2. 発表標題 第9凝固因子由来上皮成長因子 (EGF-F9) による被膜拘縮の予防効果についての検討
3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kashimura T, Hidai C, Soejima K, Kikuchi Y, Nakazawa H
2. 発表標題 Effect of The First Epidermal Growth Factor (EGF) Motif of Coagulation Factor 9 (EGF-F9) on Capsular Formation Around Silicone Implants.
3. 学会等名 American Society of Plastic Surgery The Meeting, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻村 勉, 長崎敬仁, 竹田昌平, 吉田栄香, 吉田光徳, 副島一孝, 菊池雄二, 仲沢弘明
2. 発表標題 第9凝固因子由来上皮成長因子による繊維増殖性疾患の治療の検討
3. 学会等名 第2回城北形成外科懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻村 勉, 日台智明, 堀米迪生, 吉田光徳, 屋形有美, 副島一孝, 菊池雄二, 仲沢弘明
2. 発表標題 第9凝固因子由来上皮成長因子 (EGF-F9) による被膜形成の抑制効果についての検討
3. 学会等名 第61回形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻村 勉, 竹田昌平, 堀米迪生, 吉田光徳, 屋形有美, 副島一孝, 菊池雄二, 仲沢弘明
2. 発表標題 当科における熱傷後瘢痕拘縮およびケロイド・肥厚性瘢痕の治療の現況と展望
3. 学会等名 第44回日本熱傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2018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
研究分担者	副島 一孝  (SOEJIMA Kazutaka)  (00246589)	日本大学・医学部・教授    (32665)	



6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	櫻村 勉  (KASHIMURA Tsutomu)  (20570740)	日本大学・医学部・准教授    (32665)	
研究分担者	松本 太郎  (MATSUMOTO Taro)  (50366580)	日本大学・医学部・教授    (32665)	
研究分担者	日だい 智明  (HIDAI Chiaki)  (70228732)	日本大学・医学部・教授    (32665)	

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