

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10018

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞(DFAT)を導入した人工真皮と自家培養表皮による皮膚再建法の確立

研究課題名(英文) Regenerative medicine of skin reconstruction using artificial dermis and cultured epithelium with dedifferentiated fat cells (DFAT)

研究代表者

副島 一孝 (SOEJIMA, Kazutaka)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：00246589

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)：先行実験で、ラットを用いた人工真皮移植実験モデルで、人工真皮移植時にDFATを投与すると人工真皮内への血管新生および真皮様組織構築が著明に促進されることを明らかにした。本研究では、ヒトDFATで同様の効果を再現できるかどうかについて検証することを目的とした。免疫不全マウスを用いた人工真皮移植実験により検証した。免疫不全マウス(SCIDマウス)の背部の皮膚欠損に人工真皮を移植する際に対照群とヒトDFAT治療群を作製し、移植後経時的に検討した。その結果、ヒトDFAT投与により血管新生および基底膜構築が著明に促進され、更に移植されたヒトDFATの血管内皮細胞への分化を示唆するデータが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DFATは脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を脱分化させることにより高い増殖能と間葉系幹細胞(MSC)と同等の多分化能を示すいわゆる人工MSCともいえる細胞群である。DFATを用いることの優位性は少量の成熟脂肪組織から純粋な細胞群を短期間に多量に調整することが可能な点である。今回の研究ではヒトDFATを用いた実験により再現性および移植安全性を検証して臨床応用への基礎データとするとともに、DFATの作用機序についても更に詳細な検討を加えた。その結果、ヒトDFATにより先行実験を同等の効果が再現され、また、DFATが血管内皮細胞に分化して血管新生に寄与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We previously found that artificial dermis combined with autologous DFAT cells promotes dermis-like tissue construction and angiogenesis in full skin layer defects in rats. Here, we investigated the potential clinical applications of artificial dermis combined with human DFAT cells in immunodeficient SCID mice. We created full-thickness skin defects on the dorsum, then transplanted a standard artificial dermis into it, and divided into two groups, control group and treated with human DFAT group. Tissues were harvested from transplanted areas and histologically tested. Histological findings revealed obviously thicker dermis-like tissues in the treated mice. The numbers of new blood vessels did not appreciably differ after 1 week, but were abundant in the treated mice at 2 weeks. Immunostaining with anti-human CD31 monoclonal antibody was positive at 3 weeks, which suggest that the human DFAT differentiated into endothelial cells.

研究分野：皮膚再生医療

キーワード：脱分化脂肪細胞 人工真皮

1. 研究開始当初の背景

再生医療導入のための幹細胞として人工多能性幹細胞であるiPS細胞が注目されているが、外胚葉組織である皮膚・軟部組織の再生医療には間葉系幹細胞の導入が現実的である。主要な間葉系幹細胞として骨髄、脂肪および臍帯由来の幹細胞がありその臨床研究には関する報告は既によく見られるが、それらは細胞ソースの採集が侵襲的であり、また異種細胞の混入が避けられず悪性腫瘍の発生リスクが完全には払拭されていないのが現状である。

われわれは少量の成熟脂肪細胞を天井培養することで得られる細胞が他の間葉系幹細胞と同等の多分可能を有することを明らかにし脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated Fat Cells: DFAT)と命名し研究を行っている。そして、DFATは低侵襲に採集可能な少量の皮下脂肪組織から安定して調整が可能であり、異種細胞を混入しないので悪性腫瘍発生リスクも低く、再生医療の細胞ソースとして優れていると考えている。皮膚再生医療へのDFATの導入として、(1)皮膚移植時の植皮生着促進効果¹⁾、(2)皮弁による再建時の皮弁血流促進効果²⁾、(3)人工真皮移植時の真皮様組織構築促進効果³⁾、(4)自家培養表皮移植時の基底膜構築促進効果⁴⁾について検討し報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では、われわれの一連の研究成果がヒトDFATでも同等の効果が得られることを免疫不全動物を用いた動物実験で検証し、その基礎研究データを蓄積して臨床研究へと展開することを目的としている。今回、免疫不全マウスを用いて人工真皮移植時の真皮様組織構築促進効果についてヒトDFATによる再現性の検証を行った。

3. 研究の方法

実験は40匹の免疫不全マウス(CB17/lcr-Prkdcscid/CrIcrlj, 日本チャールス・リバー)(6週齢)を用いて行った。尚、動物実験は日本大学医学部動物実験委員会の承認を得て(承認番号: 第AP20MED022-1号)行った。また、実験に用いたヒトDFATは手術時に余剰となった脂肪組織を用いて調整した(日本大学研究倫理審査承認番号RK-210914-1)。

(1)DFATの調整: 採取した脂肪組織は、眼科用ハサミを用いて細切し、0.1% (W/V) コラゲナーゼ溶液(Koken)に入れ、37℃で1時間処理し、細胞を単離した。次に孔径250µmのフィルターで未消化組織を濾過し、135×gで3分間遠心分離した後、最上層に浮遊した成熟脂肪細胞を採取した。Phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄後、20% fetal bovine serum (FBS, JRH Bioscience) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)で完全に満たされたT-25細胞培養フラスコに脂肪細胞を播種し、37℃, 5% CO₂の条件下で培養した。培養7日後に培養液を交換し、細胞付着面が底になるようにフラスコを反転させ培養を継続した。培養液の交換は4日ごとに行った。培養開始約2週間後に10cmディッシュ(BDFalcon)に継代培養を行い、80-90%コンフルエントに到達後移植実験に用いた。

(2)実験プロトコール: SCIDマウス(CB17/lcr-Prkdcscid/CrIcrlj)の背部に2x3cmの全層皮膚欠損創を作成し、人工真皮(標準タイプ、PeInac®, GUNZE社製)を移植した。移植時に生理食塩水0.2mlを移植床に散布したものを対照群、DFAT(1.0x10⁵cell/cm²)の生理食塩水0.2ml懸濁液を移植床に散布したものを治療群とした。人工真皮移植後1週および2週で、

移植部位の組織を採取し組織学的評価を行った。各週で対照群 n=10、治療群 n=10 とした。また、治療群については移植後 3 週の組織学的評価を行った (n=10)。

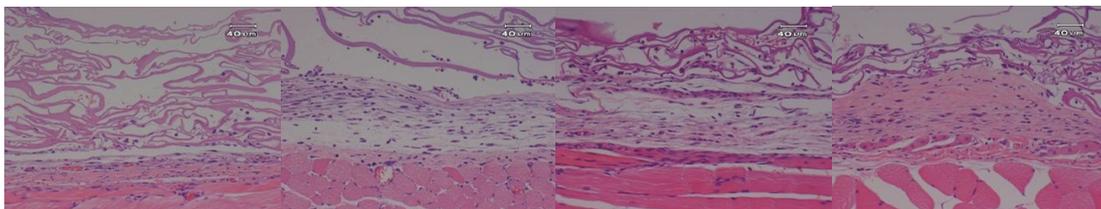
(3)組織学的検索：人工真皮移植後、1、2、3 週目に組織を採取して組織学的評価を行った。対照群、治療群いずれも 1、2 週目の組織に対して H-E 染色、Masson-trichrome 染色、抗マウス CD31 モノクローナル抗体免疫染色を行った。また、治療群には 1、2、3 週目組織に対して抗ヒト CD31 モノクローナル抗体染色を行った。H-E 染色像で真皮様組織の厚さを画像解析ソフト Image J(version. 1.51)を用いて計測した。Masson-trichrome 染色像では、真皮様組織における単位面積当たり (40×80 μm) の染色された膠原線維の割合を、構築されたコラーゲン量の比率として画像解析ソフト Pop Imaging(version 6.10)を用いて計測した。抗マウス CD31 モノクローナル抗体免疫染色像で真皮様組織の単位面積当たり (120×120 μm)の新生血管数を計測した。抗ヒト CD31 モノクローナル抗体免疫染色像でヒト DFAT の血管内皮細胞への分化を確認した。

(4)統計処理：統計処理は student t-test で行い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) H-E 染色結果

真皮の厚さは 1 週目で対照群と比較して治療群で有意に厚かったが(対照群：36.2±27.9 μm, 治療群：85.1±18.4* μm)、2 週目では有意差を認めなかった(対照群：78.4±23.4 μm, 治療群：100.8±39.6 μm)。



対照群 1 週目

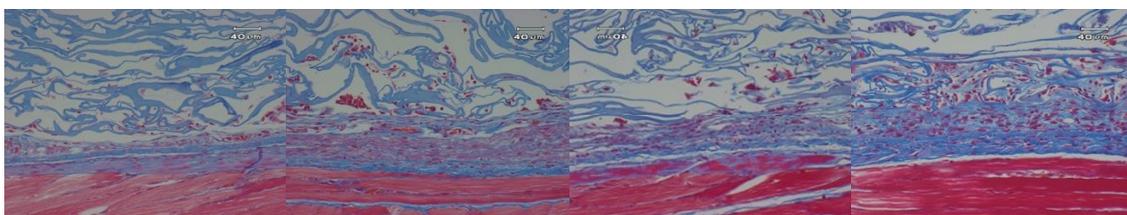
治療群 1 週目

対照群 2 週目

治療群 2 週目

(2) Masson-trichrome 染色結果

コラーゲンを選択的に染色する Masson-Trichrome 染色で各群の単位面積当たりのコラーゲン染色率を定量したところ、1 週目(対照群:44.0±5.8%, 治療群: 52.4±6.3*%) , 2 週目(対照群：49.3±5.9%, 治療群: 60.4±7.4*%)いずれにおいても治療群で有意にコラーゲン量が増加していることが示された。



対照群 1 週目

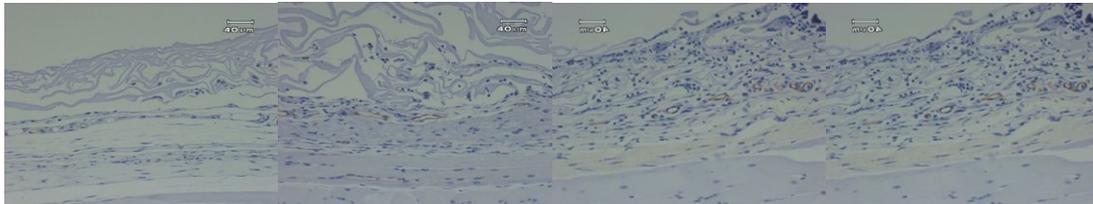
治療群 1 週目

対照群 2 週目

治療群 2 週目

(3) 抗マウス CD31 モノクローナル抗体免疫染色結果

血管内皮細胞のマーカーである抗 CD31 モノクローナル抗体免疫染色における単位面積あたりの陽性染色細胞(血管内皮細胞)は 1 週目では有意差が無かった(対照群：1.3±0.7, 治療群: 1.7±0.9)が、2 週目で治療群の方が有意に増加していることが示された(対照群：2.6±0.5, 治療群: 3.5±0.7*)。



対照群 1 週目

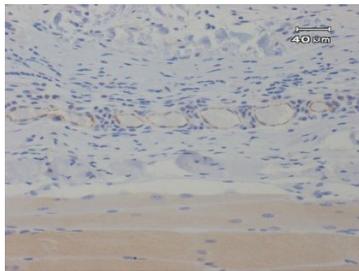
治療群 1 週目

対照群 2 週目

治療群 2 週目

(4) 抗ヒト CD31 モノクローナル抗体免疫染色結果

治療群において行った抗ヒト CD31 モノクローナル抗体免疫染色陽性細胞は 1, 2 週目では確認されなかったが、3 週目で観察され、ヒト DFAT が血管内皮細胞に分化したことが示された。



(5) 考察

本研究で使用した人工真皮は全層皮膚欠損創に移植されると、移植床から線維芽細胞が dermal replacement layer に侵入してコラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生し、真皮様組織を構築する。また毛細血管も dermal replacement layer に侵入して二次的に行う分層植皮の移植床となる。しかしながら、十分な真皮様組織が構築されて分層植皮の移植床として完成するに 3~4 週間を要するので、人工真皮を移植して二次的分層植皮を行うまで待機する必要がある、患者の負担が大きいのみならず、その間の創部管理を行う医療者側にも大きな負担となるので、人工真皮を用いた皮膚再建の適応制限の原因となっている。

そこで、われわれは人工真皮内への真皮様組織構築と血管新生を促進することによる 2 次植皮までの期間短縮について模索し、間葉系幹細胞の併用効果について検討してきた。間葉系幹細胞としては、DFAT を用いている。DFAT は創傷治癒現象における肉芽組織形成促進効果について報告、血管内皮細胞への分化を確認した報告が既に見られ、われわれもラットを用いた先行研究で、人工真皮移植時に移植床に自家 DFAT を移植すると真皮様組織構築および血管侵入が著明に更新されることを明らかにして報告した。今後、臨床展開を行うために、ヒト DFAT でも同様の効果が得られるかについて検証する必要がある、今回免疫不全マウスを用いた実験モデルで検討を行った。

その結果、ヒト DFAT による治療群では、Masson-Trichrome 染色で dermal replacement layer 内のコラーゲン蓄積が著明に促進されており、ヒト DFAT による真皮様組織構築の促進効果が示された。また、抗マウス CD31 モノクローナル抗体免疫染色で、陽性発現した血管内皮細胞も治療群で有意に増加していたので、ヒト DFAT 投与の血管新生促進効果 (angiogenesis) が示された。更に、抗ヒト CD31 モノクローナル抗体免疫染色によりヒト DFAT を投与した治療群で移植後 3 週目に陽性発現細胞が観察されたことにより、移植されたヒト DFAT がヒト血管内皮細胞に分化した (vasculogenesis) ことも示され Jumabay の報告

5)を検証する結果となった。

今回の実験では、ヒト DFAT が血管内皮細胞への分化が示されたのは移植後 3 週目であり、3 週目までは陽性発現細胞が観察されなかったが、治療群で血管新生が促進されたのは、DFAT から VEGF や bFGF などの血管新生促進因子が放出され、その paracrine 効果によるものと推測している。

【参考文献】

- 1) Asami T., Soejima K., Kashimura T., et al. J Plast Surg Hand Surg 2015;49(4):229-33.
- 2) Kashimura T., Soejima K., Asami T., et al. J Invest Surg 2016;29(1):6-12.
- 3) Soejima K., Kashimura T., Asami T., et al. J Plast Surg Hand Surg 2014;49(1):25-31.
- 4) Soejima K., Kashimura T., Kazama T., et al. Plast Reconstr Surg 2019;143(5):983e-992e.
- 5) Jumbay M, Abdmoulen R, Urs S et al. J Mol Cell Cardiol 2012;53(6):79-800.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 副島一孝、櫻村 勉、風間智彦、松本太郎、仲沢弘明
2. 発表標題 ヒトDFATの人工真皮への真皮様組織構築促進効果の検証-免疫不全マウスでの実験的検討-
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 副島一孝、櫻村 勉、吉田光徳、長崎敬仁、菅原 隆、菊池雄二、仲沢弘明
2. 発表標題 Scarless wound healingに対する細胞治療の試み
3. 学会等名 第63回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 副島一孝、櫻村 勉、風間智彦、松本太郎、仲沢弘明
2. 発表標題 人工真皮移植時のヒトDFATの血管新生効果-免疫不全マウスによる実験的検討-
3. 学会等名 日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019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	三角 浩司 (MISUMI Kouji) (00442682)	日本大学・生物資源科学部・准教授 (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	松本 太郎 (MATSUMOTO Taro) (50366580)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究分担者	榎村 勉 (KASHIMURA Tsutomu) (20570740)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	
研究分担者	仲沢 弘明 (NAKAZAWA Hiroaki) (60180270)	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