

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592658

研究課題名(和文) 幹細胞とコラーゲン架橋を導入した無細胞真皮マトリックスによる結合組織の再生

研究課題名(英文) Effect of Adipose-Derived Stem Cells and Cross-linking of Collagen on Acellular Dermal Matrix

研究代表者

高見 佳宏 (Takami, Yoshihiro)

日本医科大学・医学部・その他

研究者番号：30201601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：無細胞真皮マトリックス(Acellular Dermal Matrix: ADM)にはさまざまな結合組織を再生させる可能性があるが、移植後の吸収が問題となる。本研究ではADMの吸収を抑制する方法として、脂肪組織由来幹細胞と架橋処理の効果についてラットのモデルで検討した。ADMによる皮下組織再生は幹細胞により促進された。架橋処理は移植後の吸収を抑制したがADMへの血管新生をも抑制した。ADMによる腱再生では幹細胞によりADMの吸収と炎症反応が抑制された。ADMへの架橋処理も移植後の吸収を抑制したが幹細胞の効果より劣った。ADMの移植安定性の向上には幹細胞の組み込みが有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been known that an acellular dermal matrix (ADM) is partially resorbed after transplanting. In this study, the effectiveness of adipose-derived stem cells (ASCs) and collagen cross-linking for the resorption of ADM was investigated. ADM was prepared from the skin of Fischer rats with trypsin. Cross-linking of ADM was performed with glutaraldehyde. ASCs from the inguinal fat pads were cultivated and the cells were seeded on ADMs. ADM with ASCs, cross-linked ADM and untreated ADM were respectively transplanted subcutaneously or into the defects of Achilles tendon of rats. As compared to the untreated ADMs, the subcutaneously transplanted ADM with ASCs significantly inhibited the ADM resorption. Although the cross-linked ADM inhibited the resorption, neo-vascularization was less induced than the ADM with ASCs. In the tendon regeneration, the ADMs with ASCs showed the better tendinous regeneration than the other types of ADMs. ASCs appeared effective for inhibiting ADM resorption.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 形成外科

キーワード：無細胞真皮 結合組織 再生医学 幹細胞 脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

機能を失った臓器や組織を再生させる方法には、同種の臓器・組織移植、生体外で臓器・組織を構築する方法(Tissue Engineering) 生体内で組織再生を誘導する方法がある。これらの中で臓器・組織移植は臨床的に確立した方法ではあるが、臓器・組織のドナー不足が常に大きな問題となる。Tissue Engineering は、皮膚、角膜、軟骨など、移植時に直接の血流を必要としない組織では成功しているが、移植時に十分な血流を要する臓器の開発は進んでいない。生体内で組織再生を誘導する方法には、幹細胞を中心とした細胞移植と、臓器・組織の Scaffold (担体、足場) を移植する方法があり、臨床応用が進められている。この Scaffold は、生体においては「結合組織」に相当する。現在用いられている Scaffold には、生体分解性の人工物、非分解性の人工物、動物由来のコラーゲンマトリックス、および同種の結合組織がある。これらの中で最も生体親和性が高いものは同種結合組織であり、通常はその抗原性を低減、除去するために、冷凍処理、放射線処理あるいは無細胞化処理が為される。同種心臓弁、同種骨、同種真皮などが実用化されており、最近では血管や気管のマトリックス移植も試みられている。

われわれは、ヒト同種皮膚を無細胞化した無細胞真皮マトリックス (Acellular Dermal Matrix: ADM と略す) を開発し、ADM による真皮再生、ADM を Scaffold とした Tissue Engineered Skin (複合型培養皮膚) の臨床応用を進めてきた(1,2)。同時に ADM による、皮膚の結合組織である真皮以外の結合組織、すなわち脳硬膜、腹膜等の再生誘導を試みてきた。こうした試みは世界的にも行われており、特に ADM が米国で商品化された 1990 年代後半以降、数多く検討されるようになった。現在までに硬膜の代用、乳房インプラントをカバーする組織の強化、鼠径ヘルニアの補強などが報告されている(3)。こうした試み

は、ADM の主成分である I 型コラーゲンが生体における普遍的な結合組織線維であることから、ADM が皮膚組織だけでなく、生体のさまざまな場所でそれぞれの結合組織を誘導しうる可能性を示すものであろう。しかし ADM による結合組織再生に対する評価は、未だ確立していない。その最大の理由は、移植後 ADM が組織吸収される可能性がある事である。言い換えれば、移植された ADM が、長期間にわたって必要な結合組織量と強度を保てない可能性があるという事である。移植された ADM は、そのコラーゲンマトリックスを鋳型として徐々に自己のコラーゲンで置換されていき、数ヶ月の経過で吸収・消失するが、添加される自己のコラーゲン量が多ければ組織として残存でき、少なければ結合組織としては残らない。われわれの検討でも、筋膜上に移植した ADM が、少なくとも 5 ヶ月までは移植部に残存するが、その残存量 (吸収量) を明確には予測出来なかった(1)。よって ADM の移植後の吸収や変性を抑制するための、ADM の加工法や修飾方法の検討が必要と考えられている。

参考文献: (1) Y. Takami, et al.: Dispace / Detergent Treated Dermal Matrix As A Dermal Substitute. Burns, 22 :182, 1996. (2) Yoshihiro Takami, et al.: Acellular Allogeneic Dermal Matrix. Atlas of Burn Reconstructive Surgery, Springer. 2010. (3) Chaplin JM, Costantino PD, Wolpoe ME, et al.; Use of an acellular dermal allograft for dural replacement: an experimental study. Neurosurgery 45:320, 1999.

2. 研究の目的

ADM の移植後の吸収・変性を抑え、移植特性を向上させるための方法として、ADM のマトリックス構造を分解・吸収に抵抗するように変化させるか、移植後の血管新生を促進させて生着性を向上させる事が考えられる。こうした観点からわれわれは、前者に対してはアルデヒドによる ADM のコラーゲン

架橋の、後者に対しては ADM に幹細胞（脂肪組織由来幹細胞：adipose derived stem cells；ASCs）を組み込む事の効果調べる事を目的とする研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ADM の作製

Fischer ラットあるいは Brown Norway ラット（♂10 週令）の背部分層皮膚（18/1000 inch）を Trypsin 処理にて無細胞化し ADM を作製した。無細胞化は HE 染色と SEM にて確認した。

(2) 脂肪組織由来幹細胞（adipose derived stem cells；ASCs）の培養と ADM への組み込み

Fischer ラットの鼠径部 Fat pad から collagenase (type I) 処理によって幹細胞を分離・培養した。第 3 継代の細胞を ADM に播種し（ $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$ ）組み込んだ。なお移植前に ASCs は DiI でラベルした。

(3) ADM の架橋処理

ADM の架橋は Oliver らの方法に準じ 0.01% グルタルアルデヒド、16 時間処理にて行った。

(4) ADM による皮下組織再生

未処理の ADM と上記処理を行った ADM（1cm 角）を Fischer ラットの背部皮下に移植した。8 週後の移植 ADM の変化を肉眼的・組織学的に検討した。

(5) ADM による腱再生

Fischer ラットのアキレス腱を 10mm 切除し、その腱欠損部に未処理の ADM と上記処理を行った ADM を移植した。4 週後の移植 ADM の変化を肉眼的・組織学的に検討した。

(6) ADM による腹膜再生

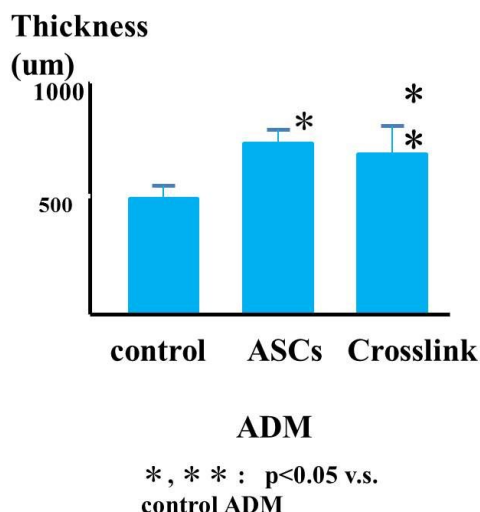
Fischer ラットの腹膜を 10mm 角切除し、その欠損部に未処理の ADM と上記処理を行った ADM を移植した。4 週後の移植 ADM の変化を肉眼的（腸管との癒着、腹壁ヘルニアの発症等を含む）・組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) ADM による皮下組織再生

未処理 ADM に比べ、幹細胞（ASCs）を組み込んだ ADM では、移植 ADM の吸収が抑制された（図 1）。ADM への架橋処理は移植後の吸収を抑制したが、同時に ADM への血管新生をも抑制した。ADM の移植安定性の向上には幹細胞の組み込みが有効である可能性が示唆された。

図 1 移植後の再生皮下結合組織（ADM 部分）の厚さの比較



(2) ADM による腱再生

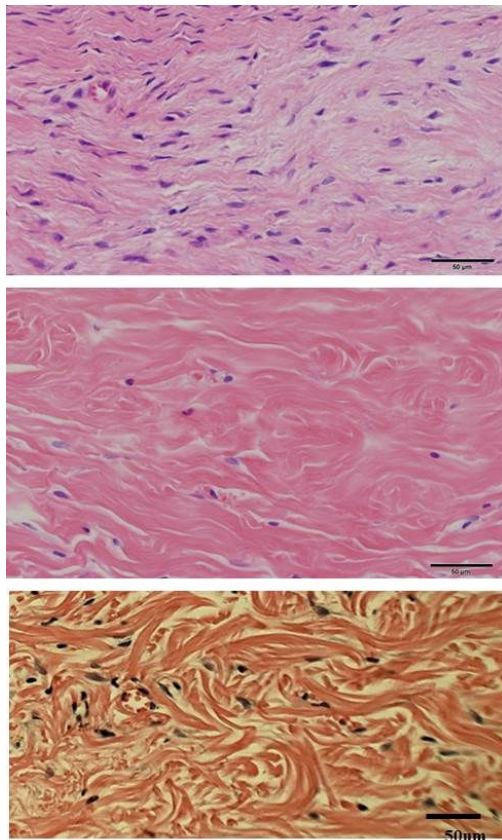
未処理 ADM に比べ、幹細胞（ASCs）を組み込んだ ADM では、移植 ADM の変性と炎症反応が抑制され、正常組織に近い腱再生が認められた。ADM への架橋処理も移植後の変性を抑制したが、ASCs の効果には及ばなかった（図 2）。

また ADM の皮下移植、腱移植共に、移植後の組織中に DiI 陽性細胞（ラベルされた ASCs）の存在が確認された。

(3) ADM による腹膜再生

腹膜再生において、ADM の処理方法による明らかな差異は認められなかった。腸管との癒着は、架橋処理 ADM に強い傾向が見られたが、確定的な結論は得られなかった。今後さらに移植数を増やして確認する必要があるものと考えられた。

図2 腱欠損部に移植した ADM の組織像



上：未処理 ADM、中：ADM with ASCs、
下：Cross-linked ADM。HE 染色。

【結論】

本研究結果は、同種無細胞化真皮マトリックスを用いた種々の結合組織再生の、より安定した臨床応用の可能性と方向性を示していると考えられる。

今回得られた結果から、ADM に対する脂肪組織由来幹細胞の組み込みが、移植後の安定性向上に貢献する可能性が示唆された。しかし今後の臨床応用ためには、ASCs の播種条件を含めた更なる検討が必要であろう。

ADM の架橋処理も移植後の組織吸収を抑制しうる可能性が示唆されたが、血管新生の促進には寄与しない可能性もあり、更なる検討を要する。欧米では架橋処理された ADM が商品化されているが、その臨床使用にあたっては、より慎重に移植後の長期経過を明ら

かにしていく事が望ましいと考えられた。

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 8 件)

〔 Proceedings 〕 (計 5 件)

〔 学会発表・講演 〕 (計 17 件)

〔 図書 〕 (計 3 件)

〔 産業財産権 〕
出願状況 (計 1 件)

【原著論文】

- 1 Yoshihiro Takami, Ryo Yamaguchi, Shimpei Ono, Hiko Hyakusoku.: Clinical application and histological properties of autologous tissue-engineered skin equivalents using an acellular dermal matrix. J Nippon Med Sch, 81: 2014, in press. 査読有 . <http://www.nms.ac.jp/jnms/>
- 2 高見佳宏、秋山豪、長嶋有紀、櫻井透、飯村剛史、百束比古：重症感染性糖尿病性足壊疽に対する治療戦略：治療のプロトコール化について. Skin Surgery 22 : 159 - 162, 2013. 査読有. <http://www.jsds.jp/>.
- 3 Takami Y, Hyakusoku H : Feasibility of dermis grafts in burn surgery. Burns 39:369-370, 2013. 査読有 . <http://www.journals.elsevier.com/burns/>
- 4 高見佳宏、百束比古：外来の小外科—その標準化に向けて. 日本医師会雑誌.141 (10):2269, 2013. 査読有. <http://www.med.or.jp/cme/jjma/>
- 5 Ono S, Ogawa R, Hayashi H, Takami Y, Hyakusoku H: How large can a pedicled flap be? Plast Reconstr Surg. 130(1):195e-196e, 2012. 査読有 . <http://journals.lww.com/plasreconsurg/>
- 6 Ono S, Ogawa R, Eura S, Takami Y, Hyakusoku H. :Perforator-supercharged perforator-based propeller flaps. Plast Reconstr Surg, 129(5):875e-7e, 2012. 査読有. <http://journals.lww.com/plasreconsurg/>
- 7 Ono S, Chung KC, Takami Y, Chin T, Ogawa R, Gao JH, Hyakusoku H.: Perforator

-supercharged Occipito -cervico-pectoral (OCP) Flaps for Lower Face and Neck Reconstruction. *Plast Reconstr Surg*, 129(4):879-887, 2012. 査読有.

<http://journals.lww.com/plasreconsurg/>

- 8 Orbay H, Takami Y, Hyakusoku H, Mizuno H.: Acellular Dermal Matrix Seeded with Adipose-Derived Stem Cells as a Subcutaneous Implant. *Aesthetic Plast Surg*. 35(5):756-763, 2011. 査読有. DOI 10.1007/s00266-011-9683-2

【Proceedings】

- 1 Takami Y, Orbay H, Ono S, et al.: Effect of adipose derived stem cells and collagen cross-linking in subcutaneous transplantation of acellular dermal matrix. *Wound Repair and Regeneration*, 22: A21, 2014. 査読無. [onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1524-475X](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1524-475X)
- 2 Matsumoto N, Takami Y, Ono S, Sugimoto A, Hyakusoku H : Functional damage of human dermal lymphatic endothelial cells by a high glucose condition. *Wound Repair and Regeneration*, 22: A11, 2014. 査読無. [onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1524-475X](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1524-475X)
- 3 Yoshihiro Takami, et al.: Effect of adipose-derived stem cells on tendon regeneration using acellular dermal matrix. *WRR*, 21:S5-3, 2013. 査読無. [onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1524-475X](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1524-475X)
- 4 Yoshihiro Takami, Jingping Guo, Shimpei Ono, Hakan Orbay, Rei Ogawa, Hiko Hyakusoku: Influence of negative atmospheric pressure on cultured human dermal fibroblasts. *Journal of Wound Technology*, No.15: 62, 2012. 査読有. www.journalofwoundtechnology.com/journal.jsp

- 5 Yoshihiro Takami, Hakan Orbay, Shimpei Ono, Hiko Hyakusoku: Altered expression of apoptosis-related genes in human dermal microvascular endothelial cells in high-glucose condition. *Wound Repair and Regeneration*. 査読無. [onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1524-475X](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1524-475X), 20:A7, 2012.

【講演】

- 1 高見佳宏:「皮膚外科手術」 2013年度日本臨床皮膚外科学会、教育セミナー 2013年7月7日(東京)。
- 2 高見佳宏:創傷治癒の基礎とアップデート.日本臨床皮膚外科学会、教育セミナー 2011年7月4日、東京。
- 3 Yoshihiro Takami: Tissue regeneration using acellular dermal matrix. 1st Sino-European Joint meeting of Wound Healing. April 9-10, 2011, Shanghai, China.

【学会発表】

- 1 高見佳宏、小野真平、百束比古:無細胞真皮マトリックスによる腱再生:脂肪組織由来幹細胞とコラーゲン架橋による影響について. 第43回日本創傷治療学会、2013年11月15日(別府)。
- 2 高見佳宏、秋山豪、長嶋有紀、櫻井透、百束比古:重症感染性足趾壊疽の治療指針:救肢までの段階的なプロトコルについて. 第55回全日本病院学会、2013年11月3日(大宮)。
- 3 高見佳宏、大澤幸代、中馬久美子、石井啓子、百束比古:アルデヒド処理ラット血管を用いた微小血管吻合のトレーニング 第81回日本医科大学医学会総会、平成25(2013)年9月7日(東京)。
- 4 高見佳宏、長嶋有紀、秋山豪、飯村剛史、百束比古:大切断を回避する重症感染性糖尿病性壊疽の治療戦略. 第31回日本臨床皮膚外科学会学術大会、高雄、台湾、

- 2013年2月1-2日.
- 5 Yoshihiro Takami, Shimpei Ono, Hakan Orbay, Goh Akiyama, Yuki Nagashima, Teruyuki Dohi, Hiko Hyakusoku.:Tendon regeneration with acellular dermal matrix and adipose-derived stem cells. 4th Congress of the world union of wound healing societies, Sep 5, 2012, Tokyo, Japan.
 - 6 Yuki Nagashima, Goh Akiyama, Teruyuki Dohi, Yoshihiro Takami, Hiko Hyakusoku: Conservative therapy using the artificial dermis for intractable ulcer of the skin. 4th Congress of the world union of wound healing societies, Sep 2-6, 2012, Tokyo, Japan.
 - 7 高見佳宏、Hakan Orbay、小野真平、百束比古：脂肪由来幹細胞とコラーゲン架橋による無細胞真皮マトリックスの移植特性の変化. 第42回日本創傷治癒学会、2012年12月4日、札幌.
 - 8 松本典子、高見佳宏、杉本貴子、小野真平、百束比古：高濃度グルコース環境による皮膚リンパ管内皮細胞障害. 第42回日本創傷治癒学会、2012年12月3日、札幌.
 - 9 高見佳宏、百束比古、他：高濃度グルコースによる培養皮膚リンパ管内皮細胞の変化. 第21回日本形成外科学会基礎学術集会、2012年10月4日、福島.
 - 10 高見佳宏、松本典子、百束比古：高濃度グルコースによる培養皮膚リンパ管内皮細胞の変化. 第80回日本医科大学医学学会総会、2012年9月1日、東京.
 - 11 松本典子、高見佳宏、百束比古：ラット腹部皮弁における Supercharge の効果について. 第80回日本医科大学医学学会総会、2012年9月1日、東京.
 - 12 高見佳宏、Hakan Orbay、秋山豪、他：脂肪組織由来幹細胞による無細胞真皮マトリックスの移植特性影響. 第30回日本臨

床皮膚外科学会学術大会、2012年2月11-12日、ハノイ、ベトナム.

- 13 高見佳宏、Hakan Orbay、他：組織再生のための新知見2：脂肪組織幹細胞と無細胞真皮マトリックスによる腱組織再生. 第41回日本創傷治癒学会、2011年12月5-6日、名古屋.
- 14 高見佳宏、Hakan Orbay、秋山豪、他：幹細胞と無細胞真皮マトリックスによる腱再生. 第20回日本形成外科学会基礎学術集会、2011年10月6-7日、東京.

【著書】

- 1 高見佳宏 手術手技アトラス 「無細胞化組織」.東京、克誠堂出版 2014 出版予定
- 2 高見佳宏：熱傷・熱傷潰瘍. 傷のきれいな治し方. 第2版、(百束比古、小川令 編集)、東京、全日本病院出版会、p125-132, 2012. (総頁数 191)
- 3 高見佳宏：熱傷の治療. アトラス形成外科手術手技. (百束比古 編集)、東京、中外医学社、p80-87、2011. (総頁数 217)

【特許出願】

名称：手袋用粘着性低減組成物.

発明者：高見佳宏

権利者：日本医科大学

種類：特願

番号：2013-15432

出願年月日：2013年1月30日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

【その他】

ホームページ等：なし.

6. 研究組織

(1)研究代表者：

高見佳宏 (TAKAMI Yoshihiro)

日本医科大学 形成外科 非常勤講師

研究者番号：30201601

(2)研究分担者 なし.

(3)連携研究者 なし.