

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10954

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞(DFAT)を導入した次世代型人工皮膚の開発

研究課題名(英文) Novel regenerative skin reconstruction with dedifferentiated fat (DFAT) cells

研究代表者

副島 一孝 (SOEJIMA, Kazutaka)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：00246589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本邦でも2009年に重症広範囲熱傷に対して自家培養表皮による治療が保険収載された。培養表皮は真皮成分のない移植床には生着しないので、凍結保存屍体皮膚や人工真皮を用いて真皮再建を行った後に移植する方法が行われている。しかしながら、現状ではその生着率が不良であることが課題である。培養表皮は移植床との間で基底膜を再構築して生着するので、collagen IVやlaminin-5などの基底膜構成タンパクが移植床に存在することが生着条件である。脱分化脂肪細胞(DFAT)を真皮構築の際に投与すると、CEA後の真皮表皮接着層における基底膜構成タンパクの発現が促進され基底膜構築が促進されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In Japan, a cultured epithelial autograft (CEA) was approved in 2009 by the public health insurance system for use in treatment of patients with severe burns. Wound bed preparation was performed with cryopreserved cadaver allograft skin or artificial dermis prior to CEA, because the CEA "take" rate on full-thickness skin defects without a dermal structure is poor.

Cultured epithelium takes due to formation of a basement membrane between the epidermis and dermis, basement membrane protein such as collagen IV or laminin-5 are essential for epithelial attachment to the dermis.

Treatment of AD (artificial dermis) with DFAT (dedifferentiated fat) cells promotes post-CEA production and deposition of laminin-5 at the dermal-epidermal junction and development of BM together with anchoring fibrils.

研究分野：形成外科

キーワード：脱分化脂肪細胞 自家培養表皮 人工真皮 基底膜

1. 研究開始当初の背景

2008年に本邦でも自家培養表皮移植による広範囲熱傷治療が保険収載された。その適応はIII度熱傷を含む体表面積30%以上の熱傷症例であるが、III度熱傷創の焼痂を切除した後の真皮の欠損した全層皮膚欠損創には培養表皮の生着は著しく不良なので、凍結保存屍体皮膚あるいは人工真皮を用いて真皮再構築を行うことが前提である^{1,2}。屍体皮膚の供給に制限のある本邦では人工真皮による真皮再構築が重要な方法であるが、人工真皮上への自家培養表皮の生着率は不良である³。その原因は培養表皮移植後の表皮真皮接着層における基底膜構築の遅延であることが指摘されている。すなわち、培養表皮は表皮と真皮の共同作業により基底膜を再構築して生着するが、人工真皮で構築された真皮上に培養表皮を移植した後の基底膜構築過程の研究によるとcollagen IV, laminin-5などの基底膜構成タンパクの発現が遅延し、collagen VIIを主成分とするanchoring fibrilの形成も数ヶ月以上を要することが明らかとなっている^{2,4}。それに対して、臨床では人工真皮により構築した真皮上に自家培養表皮移植を行う際に、正常皮膚成分として高倍率網状植皮を併用することが行われている⁵。また、2016年には本邦で巨大母斑に対しても自家培養表皮移植が保険適応となった。巨大母斑の母斑細胞は皮膚全層～脂肪層にも存在することが明らかとなっており、皮膚全層切除を行っても根治切除とはならないが、現状では真皮欠損創には培養表皮生着が著しく不良なので、巨大母斑切除に際して真皮を温存して切除し、その上に自家培養表皮移植を行っているのが現状である。その結果、術後早期の再発例の報告が散見されている⁶。

人工真皮による母床形成に際して、基底膜構成タンパクの発現促進の可能性について検討する過程で、間葉系幹細胞から脂肪分化の際に基底膜構成タンパクであるcollagen IV, lamininの発現が促進されるという報告を渉猟した^{7,8}。脂肪固有基底膜と皮膚の表皮真皮接着層の基底膜においてcollagen IV, lamininなどが共通のタンパクであるためである。そこで、間葉系幹細胞投与により基底膜構築が促進されるという仮説を立てた。

間葉系幹細胞としてはわれわれが取り組んでいる脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)を選択した。DFATは少量の成熟脂肪細胞から安定して調整が可能であり、間葉系幹細胞と同等の多分可能を有することを報告してきた^{9,10}。

2. 研究の目的

自家培養表皮移植による広範囲熱傷治療の本来の目的は、正常皮膚の採取が困難な広範囲熱傷症例を、少量の正常皮膚から作成した培養表皮で皮膚再建を完遂することである。また、巨大母斑を皮膚全層で切除して、人工

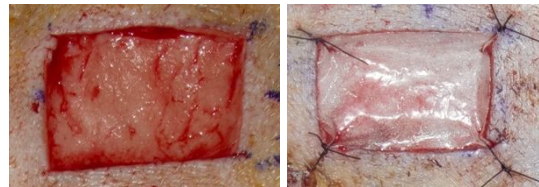
真皮による母床形成を行い、その上に自家培養表皮移植を行い得れば術後再発の予防に効果が期待される。

そこで、人工真皮による真皮再建時に脱分化脂肪細胞(DFAT)を投与すると、基底膜構成タンパクの発現が促進さえるという仮説を検証し、正常皮膚成分添加を不要とする培養表皮移植を可能とすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養表皮、DFATの調整：Green型培養表皮およびDFATをブタ頸部皮膚および皮下脂肪より調整した。培養表皮はGreenらの3T3 feeder layer法で、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング株式会社(J-TEC)の協力を得て行った。DFATは天井培養により初期培養し、その後翻転して培養を継続し、confluentに達したものを移植実験まで凍結保存した。

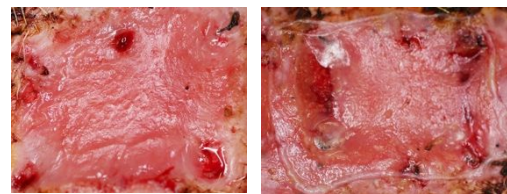
(2) 真皮構築：同一個体ブタの背部皮膚に2X3cm大の脂肪が露出した全層皮膚欠損創を12カ所作成し、人工真皮(Pelnac®、通常タイプ、グンゼ社製)を移植するモデルを作成した。その際に、移植床に 0.5×10^5 のDFATを投与するDFAT群と人工真皮移植のみを行う対照群を作成した。(各群n=12)



2X3cm 皮膚欠損創

人工真皮移植後

(3) 自家培養表皮移植：人工真皮移植後10日目に、構築された真皮様組織上に予め作成して凍結保存していた自家培養表皮を移植し、ポリウレタンフォームドレッシング材(HydroSite®、スミスアンドネフュー社製)で被覆保護した。



構築された真皮様組織 培養表皮移植後

(4) 組織学的検討：培養表皮移植後14日目に開創して肉眼的に観察した後、組織採取して組織学的検討を行った。H-E染色、collagen IV, laminin-5に対する免疫染色および表皮真皮接着層の透過電子顕微鏡像による基底膜構築の評価を行った。H-E染色標本で、表皮の厚さについてデジタル画像解析ソフトウェア(NIH image J, image processing program, Version 1.47n, National Institute of Health)を用いて解析した。また、免疫染色

標本で真皮表皮接着層の中央部に 40X80 μm の矩形の単位面積を作り、その単位面積中の染色面積(%)をデジタル画像解析ソフトウェア (PopImaging®, Ver.6.10, Digital being kids Ltd., Japan) を用いて定量した。

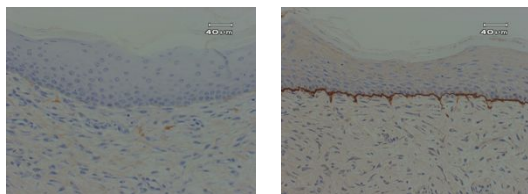
(5) 統計処理 統計処理は student T test で行い $P < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 光学顕微鏡所見

H-E 染色標本では表皮真皮接着層は対照群では全く平坦であったが、DFAT 治療群ではわずかに波打っており rete ridge 形成初期と推測された。表皮の厚さは対照群が $86.0 \pm 26.0 \mu\text{m}$ 、治療群が $85.9 \pm 10.4 \mu\text{m}$ であり有意差を認めなかった。

基底膜構成タンパクである collagen IV、laminin-5 の免疫染色標本では治療群で強く発現していた。

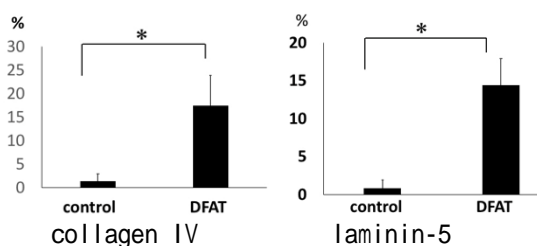


laminin-5 対照群

DFAT 群

(2) 基底膜構成タンパク発現の定量評価

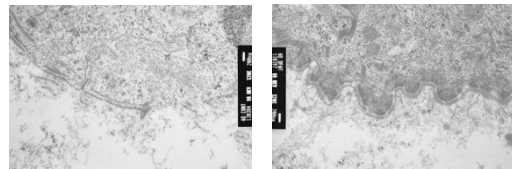
単位面積あたりの染色面積を定量したところ、collagen IV については対照群が $1.9 \pm 1.5\%$ であったのに対して、DFAT 治療群が $17.4 \pm 6.5\%$ と有意に染色面積が増加していた。laminin-5 については対照群が $0.8 \pm 1.0\%$ 、DFAT 治療群が $14.4 \pm 3.5\%$ とやはり DFAT 群で著明に染色面積が拡大していた。築が促進されていることが示唆された。



(3) 電子顕微鏡所見

真皮表皮接着層の透過電子顕微鏡像を観察すると、対照群では基底膜形成は断続的であり、hemidesmosome、anchoring fibril の形成も認められなかった。それに対して、DFAT 治療群では基底膜は連続的に認められ、hemidesmosome、anchoring fibril の形成も確認され基底膜構築が著明に促進されていることが確認された。

表皮真皮接着層の透過電子顕微鏡像



対照群

DFAT 群

< 引用文献 >

- Matsumura H, Matsushima A, Ueyama M, et al. Application of the cultured epidermal autograft "JACE((R))" for treatment of severe burns: Results of a 6-year multicenter surveillance in Japan. *Burns*. 2016;42:769-76
- Wood FM, Kolybaba ML and Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature. *Burns*. 2006;32:395-401
- Matsumura H, Gondo M, Imai R, et al. Chronological histological findings of cultured epidermal autograft over bilayer artificial dermis. *Burns*. 2013;39:705-13
- Woodley DT, Peterson HD, Herzog SR, et al. Burn wounds resurfaced by cultured epidermal autografts show abnormal reconstitution of anchoring fibrils. *Jama*. 1988;259:2566-71
- Sood R, Balledux J, Koumanis DJ, et al. Coverage of large pediatric wounds with cultured epithelial autografts in congenital nevi and burns: results and technique. *J Burn Care Res*. 2009;30:576-86
- Morimoto N, Kakudo N, Kako A, et al. A case report of the first application of culture epithelial autograft (JACE((R))) for giant congenital melanocytic nevus after its approval in Japan. *J Artif Organs*. 2018;21:261-264
- Aratani Y and Kitagawa Y. Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. *J Biol Chem*. 1988;263:16163-9
- Noro A, Sillat T, Virtanen I, et al. Laminin production and basement membrane deposition by mesenchymal stem cells upon adipogenic differentiation. *J Histochem Cytochem*. 2013;61:719-30
- Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, et al. A novel preadipocyte cell line

established from mouse adult mature adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2004;321:967-74
Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. J Cell Physiol. 2008;215:210-22

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kashimura T, Soejima K, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: The effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on a dorsal skin flap model. J Invest Surg. 査読有、29(1):6-12. 2016
DOI: 10.3109/08941939.2015.1035820

Asami T, Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Morioka K, Nakazawa H: Effects of combination therapy using basic fibroblast growth factor and mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin graft revascularization. J Plast Surg Hand Surg. 査読有、49(4):229-233,2015 (corresponding author)
DOI: 10.3109/2000656X.2015.1020315

Kashimura T, Soejima K, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: The Effect of Mature Adipocyte - Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on a Dorsal Skin Flap Model. J Invest Surg. 査読有、16:1-7,2015
DOI: 10.3109/08941939.2015.1035820

〔学会発表〕(計 9 件)

Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin reconstruction using artificial dermis in wound management. Stem Cells 2018 Winter symposium Miami, USA, 2018

副島一孝、櫻村 勉、風間智彦、松本太郎、菊池雄二、仲沢弘明: シンポジウム臨床へはばたく基礎研究 熱傷創治療における脱分化脂肪細胞(DFAT)の有用性 第43回日本熱傷学会総会学術集会 東京 2017年

副島一孝、櫻村 勉、風間智彦、松本太郎、仲沢弘明: シンポジウム脱分化脂肪細胞の再生医療への応用 皮膚の再生医療における脱分化脂肪細胞(DFAT)の有用

性 第16回日本再生医療学会総会 仙台、2017年
Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: The effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin reconstruction in burn wound management. 11th Asia Pacific Burn Congress (招待講演), Taipei, Taiwan, 2017

副島一孝、櫻村 勉、風間智彦、松本太郎、菊池雄二、仲沢弘明: 自家培養表皮移植時の脱分化脂肪細胞(DFAT)併用療法による基底膜構築促進効果 第25回日本形成外科学会基礎学術集会 大阪、2016年

副島一孝、櫻村 勉、藤原英紀、風間智彦、松本太郎、仲沢弘明: シンポジウム1 培養表皮とアログラフトを用いた重症熱傷ハイブリッド治療 アログラフトにより再構築した真皮への培養表皮生着促進のための試み 第42回日本熱傷学会総会学術集会 舞浜、2016年

副島一孝、櫻村 勉、風間智彦、松本太郎、仲沢弘明: 脱分化脂肪(DFAT)細胞の自家培養表皮生着促進効果に関する検討 第14回日本再生医療学会 横浜、2015年

副島一孝、櫻村 勉、風間智彦、松本太郎、仲沢弘明: シンポジウム 培養表皮移植の生着率向上をめざして 「脱分化脂肪(DFAT)細胞の再建真皮上への自家培養表皮生着促進効果に関する検討」 第41回日本熱傷学会総会学術集会 名古屋、2015年

6. 研究組織

(1)研究代表者

副島 一孝 (SOEJIMA, Kazutaka)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 00246589

(2)研究分担者

櫻村 勉 (KASHIMURA, Tsutomu)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 20570740

松本 太郎 (MATSUMOTO, Taro)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 50366580

仲沢 弘明 (NAKAZAWA, Hiroaki)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 60180270