

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592721

研究課題名(和文) 多分化能を有する脱分化脂肪細胞含有人工真皮による新規な皮膚再建法の開発

研究課題名(英文) Novel skin reconstruction method using artificial dermis 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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：成熟脂肪細胞から簡便・多量に調整が可能であり、間葉系間細胞と同等の多分化能を有する脱分化脂肪細胞(DFAT)を利用した新規な皮膚再建法について検討した。

植皮に際してDFATとbFGFを移植床に投与するとその生着過程が著明に促進された。人工真皮移植に際してDFATとbFGFを投与すると真皮様組織の構築および血管新生が著明に促進され、人工真皮内に移植後2日目に血管侵入が確認され、人工真皮と植皮の同時移植の可能性が示された。そして、自家培養表皮移植時にDFATを投与すると表皮真皮接着層にlamininの発現が促進し、基底膜の再構築が促進された。

研究成果の概要(英文)：Our group has established an adipocyte progenitor cell line from mature adipocytes and named them dedifferentiated fat (DFAT) cells. DFAT cells have been shown to have multilineage differentiation potential similar to that of adipose tissue-derived stem cells. This study aimed to investigate the effects of DFAT cells on novel skin reconstruction methods.

With combination therapy of bFGF and DFAT cells, skin graft revascularization was markedly promoted. Combined use of DFAT cells and bFGF markedly promoted dermis-like tissue generation and vascularization, and capillary infiltration into the dermis was obtained within 2 days after application of AD, which quite strongly suggests the feasibility of one-step grafting. In cases of autologous cultured epithelial grafting, treatment with DFAT enhanced laminin formation at the epidermal-dermal junction and regeneration of basement membranes.

研究分野：形成外科学

キーワード：人工真皮 培養表皮 脱分化脂肪細胞

## 1. 研究開始当初の背景

表皮と真皮の2層構造から成る皮膚は身体最大の臓器であり、早くから再生医療・組織工学の研究対象となってきた。表皮については1975年にGreenら<sup>1)</sup>が3T3 feeder layer法によるヒト表皮細胞培養法を確立し、本邦でもJ-TEC社の自家培養表皮(JACE®)が2007年に薬事承認を得て臨床の場での使用が開始された。真皮については1980年にYannas、Burke<sup>2)</sup>が報告したartificial skin Iから発展した人工真皮があり、米国のIntegra®が世界的に普及している。本邦でも1993年にテルモ社よりテルダーミス®<sup>3)</sup>、1996年にグンゼ社よりペルナック®<sup>4)</sup>が開発され臨床に供されている。

人工真皮はコラーゲンスポンジとシリコンシートの2層構造から成り、全層皮膚欠損創に移植されると移植床より細胞や毛細血管が侵入して真皮様組織が構築されるものであり、その上に極薄分層皮膚(8~10/1,000インチ程度)の移植を行って皮膚を完成する。広範囲な全層皮膚欠損創の治療に際して、患皮部の犠牲を軽減して良好な皮膚再建を行うための非常に有用な人工皮膚である。しかしながら、人工真皮を移植後、人工真皮内に十分に新生血管が侵入し、分層皮膚の生着が可能となるまでに2-3週間を要するので、2回の手術を要し、その間患者は創部感染を来さないよう厳重な管理のもとで待機しなければならないことが最大の問題点である。

われわれは人工真皮内への新生血管侵入を促進させることで人工真皮移植から分層皮膚移植までの期間短縮の可能性を追求して研究を行ってきた。そして、人工真皮移植に際してPDWHF (platelet derived wound healing factor)と同種培養血管内皮細胞、線維芽細胞を移植床に併用することで人工真皮と分層皮膚を同時に移植して

も生着が可能となった<sup>5)</sup>。しかしながら、同種培養線維芽細胞や血管内皮細胞の併用は倫理的問題が未解決であり、細胞培養手技も煩雑である。より簡便で倫理的問題解決の可能性の高い手技での同時移植法の確立が必要である。

一方、人工真皮は重症広範囲熱傷の治療などにおいて同種皮膚の代替としての役割も期待されている。自家皮膚が不足する重症広範囲熱傷症例では同種皮膚の使用により救命率の向上が得られ、また培養表皮の真皮欠損創への生着率が極端に不良である現状において、真皮再建を同種皮膚で行わざるを得ない。皮膚が血管の再構築で生着するのと比較して、培養表皮は基底膜の再構築により生着するが、現在臨床に供されている培養表皮は培養皿から剥離する際の操作で酵素により基底膜が破壊されており、基底膜構成成分を有さない人工真皮上にはその生着率は未だに不良である。同種皮膚の供給に大きな制限のある本邦において培養表皮生着率を向上させた人工真皮の開発は喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は多分化能を有するDFAT含有人工真皮を用いた新規な皮膚再建法を開発することである。多分化能を有する細胞として骨髄や脂肪を細胞ソースとする間葉系幹細胞(MSC)があるが、その単離・培養は煩雑な手技を要し、また組織中に微量に存在する幹細胞であるため、多量の細胞を供給することは困難である。われわれは、成熟脂肪を脱分化させた脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cells, DFAT)の単離・培養法を確立し、MSCと同等の多分化能を有することを明らかにした<sup>6)</sup>。

人工真皮内へのDFATの導入により血管

内皮細胞や線維芽細胞へ分化することにより真皮様組織の構築期間の短縮、血管新生促進効果が期待される<sup>7)</sup>。また、3T3-L1脂肪前駆細胞が collagen type IV および laminin の合成を促進するとする報告が散見され<sup>8)</sup>、DFAT でも同様の効果を確認している。人工真皮内に DFAT を含有させることで、構築される真皮様組織内に基底膜の主要構成成分である collagen type IV と laminin の発現が促進され、基底膜再構成が促進されることで培養表皮生着率の向上が期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1)ラット実験モデルによる皮膚移植、人工真皮移植時におけるDFATの血管新生効果に関する検討

ラット腹腔内脂肪採取と脱分化脂肪細胞 (DFAT) の単離・培養

SD系ラット腹腔内から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、培地を満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する。培養7日後にフラスコを反転して通常の付着培養を行なう。約2週間培養して得られた脱分化脂肪細胞を凍結保存する。

GFP(Green Fluorescence Protein)トランスジェニックラットからも同様の手技でDFATを調整する。

ラット皮膚全層欠損創実験モデルによる実験

DFATを調整したラットと同じ納入業者の同種同系ラットを用いて、背部に1X1cm大の全層皮膚欠損創を4カ所作成し全層皮膚欠損創モデルを作製する。採取した全層皮膚を元にもどして縫着する全層皮膚移植モデル、人工真皮(ゲンゼ社製、Pelnac® 厚さ 3mm,

標準タイプ)を移植する人工真皮移植モデルを作製する。

対照群(未治療)、DFAT治療群(DFAT  $0.5 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup>)、bFGF治療群(bFGF:30  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)、DFAT+bFGF併用治療群を作製する。

GFPラット由来DFATについても同様に移植実験を行い、DFATの移植後の挙動について検討する。

術後2、7日目に移植床を含めて全層採取して組織学的評価の検体とし、墨汁を対体循環に注入することで皮膚内の血流のある血管を染色する。

#### (2)ブタ実験モデルにおける自家培養表皮生着率に対するDFATの効果に関する検討

ブタ皮下脂肪採取と脱分化脂肪細胞 (DFAT) の単離・培養

全身麻酔下にブタの頸部皮下脂肪組織を採取し、得られた成熟脂肪組織から上述と同様の手技で脱分化脂肪細胞(DFAT)を調整する。約2週間培養して得られた脱分化脂肪細胞を凍結保存する。

ブタ表皮細胞の培養

DFATを調整したブタと同一個体の頸部より全層皮膚片を採取して、Greenの3T3 feeder layer法で培養する。培養は市販のコラーゲンコーティングディッシュを用いて行い、重層化させた後、Dispaseを用いて培養皿より剥離し、実験に供するまで凍結保存する。

凍結保存同種皮膚の準備

スキンバンクの凍結保存同種皮膚を模してDFAT・培養表皮を調整したブタと異なる個体のブタの背部より分層皮膚を採取し、グリセリンを凍結保護剤として-80℃で1ヶ月間凍結保存

し、凍結保存同種皮膚とする。

ブタ実験モデルによる培養表皮移植のための真皮構築

ブタ背部に III 度熱傷創を模して脂肪が露出する 2X3cm 大の全層皮膚欠損創を作製し、予め準備した凍結保存同種皮膚および人工真皮(ゲンゼ社製、Pelnac® 厚さ 3mm, 標準タイプ)を移植する。その際に未治療の対照群と、DFAT 治療群 ( $0.5 \times 10^5 \text{ cell/cm}^2$ ) を作製する。

自家培養表皮移植実験

10 日間待期した後に、凍結保存同種皮膚移植部では拒絶された同種皮膚を剥削した後の同種真皮上、人工真皮移植では構築された真皮様組織上に Green 型自家培養表皮を移植する。移植片はポリウレタンフォームドレッシング材(Smith & Nephew 社製、HydroSite®)で被覆固定する。

2 週間後に開創して肉眼的に評価し、組織片の採取を行う。

組織学的評価

組織学的評価は H-E 染色、collagen type IV, laminin の蛍光免疫染色を行い、また表皮真皮接着層における基底膜構築過程を透過電子顕微鏡で検討する。

#### 4. 研究成果

(1) ラット実験モデルによる皮膚移植、人工真皮移植時における DFAT の血管新生効果に関する検討

皮膚移植モデルでの検討結果

移植後 2 日目の時点で、未治療群、DFAT 治療群では移植片真皮内の血流再開は認められなかったが、bFGF 治療群および DFAT+bFGF 併用治療群では移植片真皮内の血流再開が認められた。bFGF 治療群では血流の再開は真皮下層に限局していたが、DFAT + bFGF 併用治療群では真皮上層まで血流の再開が確認された。bFGF は既に臨床の場で広く普及している細胞

増殖因子であり、皮膚移植時の生着促進効果が再確認された。また、DFAT を併用して投与することで皮膚生着促進効果が著しく促進されることが示された<sup>9)</sup>。

人工真皮移植モデルでの検討

移植後 2 日目の時点で、未治療群では人工真皮内にほとんど真皮様組織の構築が観られないが、DFAT 治療群では中層以上まで真皮様組織の構築が観られた。DFAT+bFGF 治療群では更に真皮様組織の構築の促進が観られ、2 日目の時点で既に真皮内に血管侵入が認められた。

人工真皮移植後 7 日目では、未治療群では未だに人工真皮内に血管侵入が観られず、人工真皮のスポンジ構造も残存していた。DFAT 治療群では血管侵入が観られ、真皮様組織も全層に密に構築されていた。bFGF との併用群では真皮様組織の構築、血管新生いずれもが著明の促進されていた。

GFP 標識ラット由来 DFAT での治療群では血管内皮細胞のマーカーである isolectin B4 と GFP で標識した DFAT の 2 重性像が確認され、移植された DFAT が血管内皮細胞に分化し、血管新生に寄与した可能性が示唆された<sup>10)</sup>

(2) ブタ実験モデルにおける自家培養表皮生着率に対する DFAT の効果に関する検討

同種皮膚移植群、人工真皮移植群いずれにおいても培養表皮移植後 14 日目の時点で表皮真皮接着層の電子顕微鏡像で anchoring fibril の形成が確認されなかった。それと比較して、DFAT 治療群では同種皮膚移植群、人工真皮移植群いずれの群でも anchoring fibril の良好な形成が確認された。collagen type IV は同種皮膚、人工真

皮のいずれの群においても DFAT の治療の有無にかかわらず陽性発現像が確認された。laminin に関しては未治療群では発現が微弱であった。それと比較して DFAT 治療群では laminin の発現が増強していた。

本研究における DFAT 治療により、同種皮膚および人工真皮で構築された真皮内に laminin の発現が促進され培養表皮の生着（接着）が促進されたことが示唆された。

#### 引用文献

- 1) Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975; 6: 331-343.
- 2) Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res*. 1980; 14: 65-81.
- 3) 松田和也, 鈴木繁彦, 一色信彦, 筏 義人. 再凍結乾燥処理した 2 層性人工皮膚. *熱傷*. 1991; 17: 77-83.
- 4) Suzuki S, Matsuda K, Isshiki N, Tamada Y, Yoshioka K, Ikada Y. Clinical evaluation of a new bilayer "artificial skin" composed of collagen sponge and silicone layer. *Br J Plast Surg*. 1990; 43: 47-54.
- 5) Soejima K, Chen X, Nozaki M, Hori K, Sakurai H, Takeuchi M. Novel application method of artificial dermis: One-step grafting procedure of artificial dermis and skin, rat experimental study. *Burns*. 2006; 32: 312-8.
- 6) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J*

*Cell Physiol*. 2008; 215: 210-22.

7) Fu X, Shen Z, Chen Y, Xie J, Guo Z, Zhang M, Sheng Z. Recombinant bovine basic fibroblast growth factor accelerates wound healing in patients with burns, donor sites and chronic dermal ulcers. *Chin Med J (Engl)*. 2000; 113: 367-71.

8) Aratani Y, 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.

9) 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 revascularisation. *J Plast Surg Hand Surg*. 2015: 1-5.

10) Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting. *J Plast Surg Hand Surg*. 2014; 49: 25-31.

#### 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 2 件 )

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 2015,49:1-5  
DOI:10.3109/2000656x.2015.1020315  
Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: Effects of mature adipocyte derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on hgeneration and vascularization of dermis-like tissue after artificial dermis grafting. J Plast Surg Hand Surg 査読有 2015:49:25-31  
DOI: 10.3109/2000656x.2014.920712

〔学会発表〕(計7件)

副島一孝、松本太郎、櫻村 勉、風間智彦、加野浩一郎、仲沢弘明：文科省大学発新産業創出拠点(START)プロジェクト脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床 y 用細胞製造と細胞治療への応用 第 58 回日本形成外科学会総会・学術集会 2015 年 4 月 8~10 日 ウェスティン都ホテル(京都府・京都市)

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 2015 年 3 月 19~21 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

風間智彦、副島一孝、加野浩一郎、松本太郎：吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調整法と機能解析 第 14 回日本再生医療学会 2015 年 3 月 19~21 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

副島一孝、松本太郎、櫻村 勉、風間智彦、今田正人、仲沢弘明：シンポジウム幹細胞の研究、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実験的検討 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 9~10 日 キッセイ文化ホール (長野県・松本市)

山本 改、副島一孝、櫻村 勉、仲沢弘明、松本太郎、今田正人、高萩みき、井家益和：ブタ培養表皮シートの作製と移植実験モデルの確立 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 9~10 日 キッセイ文化ホール (長野県・松本市)

副島一孝、櫻村 勉、山本 改、浅見 崇、風間智彦、松本太郎、今田正人、仲沢弘明：パネルディスカッション 熱傷基礎研究の最前線 創傷治療に対する脱分化脂肪(DFAT)細胞の効果 第 40 回日本熱傷学会総会・学術集会 2014 年 6 月 5~6 日 ラフレ埼玉 (埼玉県・大宮市)

Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama H, Matsumoto T, Nakazawa H: Panel Discussion Basic Research and Stem cell: Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin reconstruction. The 12th Korea-Japan

Congress of Plastic Reconstructive Surgery 2014年5月15~17日、Incheon (Korea)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：自家培養表皮生着向上効果を有する脱分化脂肪細胞を含有した真皮再建テンプレート

発明者：副島一孝

権利者：学校法人 日本大学

種類：特許

番号：特願 2014-226599

出願年月日：2014年11月7日

国内外の別：国内

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

松本 太郎 (MATSUMOTO, Taro)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：50366580

櫻村 勉 (KASHIMURA, Tsutomu)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：20570740

仲沢 弘明 (NAKAZAWA, Hiroaki)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60180270