

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25462805

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた凍結同種皮膚移植と自家培養表皮移植の検討

研究課題名(英文) Contribution of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells to the skin allograft and cultured epidermal autografts survival in swine.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、成熟脂肪組織から得られる脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cells, DFAT)が間葉系幹細胞と同等の多分化能を有するだけでなく、免疫抑制作用を有することに着目し、DFATによる凍結同種皮膚移植片の生着率ならびに自家培養表皮の生着率を向上しうるか検討した。

ブタの同種皮膚移植実験を行った結果、DFAT投与により炎症性細胞の遊走を抑制し一定の生着率向上効果が得られた。同種皮膚移植後にブタの自家培養表皮シートの移植実験を行ったが対照群とDFAT投与群いずれも自家培養表皮シートの生着は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We have established a culture method to prepare dedifferentiated adipocytes DFAT, which show a high-level proliferative potential and a multi-lineage potential equivalent to that of mesenchymal stem cells. DFAT has also been shown to have an immunosuppressive ability, like other mesenchymal stem cells. We report here results from a study to determine whether DFAT can extend the survival period of allogeneically grafted frozen porcine skin and improved survival rate of the cultured epidermis.

One week after the allo-skin graft of swine, reduced infiltration of inflammatory cells was observed and the surviving area of the allogeneic skin increases. However in autologous cultured epidermal transplants following allo-skin graft of swine, improvement of the engraftment rate could not be observed.

研究分野：形成外科

キーワード：脱分化脂肪細胞 同種皮膚移植 自家培養表皮移植

1. 研究開始当初の背景

採皮部の限られる広範囲重症熱傷治療において、自家培養表皮移植術は小範囲の健常皮膚より広範囲の創面被覆を可能とする新規な治療法であり 2009 年 1 月より保険収載された。自家培養表皮移植術は、体表面の 30%以上の深達性 度熱傷もしくは 度熱傷が保険適応となっている。真皮の欠損した全層皮膚欠損創への自家培養表皮移植の生着のためには、移植床となる創面の真皮組織の形成が不可欠であり、全層皮膚欠損創である 度熱傷創の皮膚再建を培養表皮で行うためには、Cuono らの報告に準じスキンバンクからの凍結同種皮膚移植による移植床形成が保険適応の条件となっている⁽¹⁾。すなわち、広範囲重症熱傷患者では熱傷の病態としての免疫能の低下により同種皮膚の拒絶までの期間が延長し、2-3 週間で表皮が拒絶され脱落し、その後創面に同種の真皮組織が一時的に残存する。この現象を利用して、同種真皮成分が残存した創面を培養表皮の移植床として利用する。しかしながら、現状では培養表皮の準備に 3~4 週間を要するので、同種真皮を移植床として使用できる時期と合致させることが困難なことが多い。このような理由により、一時的な免疫抑制や免疫寛容により同種皮膚の拒絶までの期間の延長をはかることで良好な移植床形成を可能とする方法の開発が望まれている。

ヒトにおける実質臓器の同種移植は、免疫抑制剤など免疫療法の発展により生着率が向上している。その中で、細胞治療による免疫寛容の試みが行われている。近年、骨髄や脂肪を細胞ソースとした多分化能を有する間葉系幹細胞が開発されてきた。間葉系幹細胞には、免疫抑制能があることが知られており移植医療の分野での研究が進んでいる。

骨髄由来間葉系幹細胞および脂肪由来間葉系幹細胞などに代表される MSC (Mesenchymal Stem Cells) の臨床応用には課題が残っている。骨髄由来間葉系幹細胞の採取は、骨髄穿刺を必要とし細胞採取に侵襲を伴うため高齢者では採取・調整が困難である。また、脂肪由来間葉系幹細胞は、細胞採取における侵襲の問題は軽減されたが、細胞の単離・培養には煩雑な手技を要し、多量の細胞を供給することは困難である。

われわれはブタの皮下脂肪組織からコラゲナーゼ処理と低速度遠心分離により分離した成熟脂肪細胞を体外で培養し、脱分化させることにより、高い増殖能と MSC 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⁽²⁾。成熟脂肪細胞分画より脱分化し得られる脱分化脂肪細胞は、成熟脂肪細胞以外の分画から得られる脂肪組織由来幹細胞 (ASC) とは異なる細胞群である。脱分化脂肪は、(1) 成熟細胞分画から調整される細胞であり、煩雑な選別操作なしに純度の高い細胞が得られる。(2) 皮下脂肪よ

り採取可能であり、組織採取量が 1 g 以下と微量ですむことから、細胞採取の侵襲が少ない。(3) 遺伝子操作やウィルスベクターなどを用いない簡便な方法で短期間に大量の調整が可能である。といった利点があり臨床応用への優位性を持つ。

2. 研究の目的

これまでにわれわれは、DFAT を用いた臓器移植モデルにおける急性拒絶反応の制御について検討を行い一定の効果を確認してきた (図 1)。

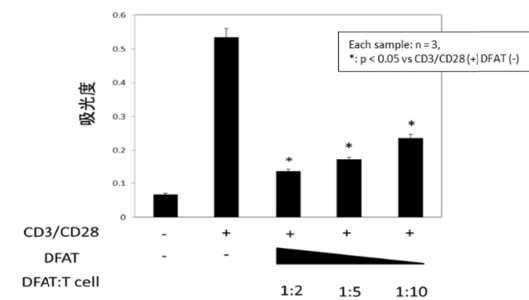


図 1 : CD3+ T 細胞増殖反応に対するマウス DFAT 共培養の影響

マウス CD3+ T 細胞をマウス DFAT 存在下または非存在下に抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、1 日後に T 細胞の増殖活性を ELISA にて解析した。DFAT と共培養を行うと、容量依存性に CD3+ T 細胞の増殖を抑制することが明らかになった。

本研究の目的は、同種皮膚移植モデルにおいて、ドナーの DFAT を用いた細胞治療を行い同種皮膚の生着期間を延長し自家培養表皮移植の生着率を高めることである。

3. 研究の方法

当初は実験動物として小動物であるラットを予定していたが、(1) ラット等の齧歯類は表皮の turn over が早く、培養表皮移植の実験が困難である。(2) 豚の皮膚には皮筋がないため皮膚再建モデルとして有用である。(3) DFAT の臨床応用のために大動物での実験が必要である。などの理由を勘案してブタでの実験を行うこととした。

(1) 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 (LWD、BW15kg、) の皮下脂肪細胞を採取した。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、培地にみ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った。約 2 週間培養して得られた脱分化脂肪細胞を凍結保存した。DFAT は、事前に凍結保存されているものを使用した。

(2) 分層皮膚の採取・凍結保存

臨床の現場に則して、ブタ(LWD、BW15kg、)の背部より 14/1000inch 厚の分層皮膚を採取しグリセリンを凍結保護剤として-90で1か月間凍結保存を行った。

(3) 同種皮膚移植

分層皮膚を採取した別個体のブタ(LWD、BW20kg、)6頭に同種皮膚移植実験を行った。レシピエントのブタの背部に3×3cmの全層皮膚欠損創を8カ所作成し、急速解凍した分層皮膚の同種移植を行った。移植部を対照群(PBS液0.1mlを注入 n=4) 治療群(ドナーのDFAT1×10⁵cells/0.1mlを注入, n=4)の2部位に分け移植した。術後1,2,3週目に肉眼的観察およびH-E染色・エラスチカワンギーソン染色・CD3免疫染色による組織学的評価を行った。術後1,2,3週目に、デジタルカメラで撮影した画像をImageJ®を用いて解析し同種移植片の生着域を計測した。

(4) ブタ由来培養表皮シートの作成

ブタ(LWD、BW15kg、)1頭の頸部及び鼠径部から2×3cmの全層皮膚を採取した。皮膚組織から0.25%のトリプシンで表皮細胞を分離し、Greenの3T3 feeder layer methodに則りフィーダーフラスコ4.1~4.8×10⁴個/cm²に播種し、表皮細胞増殖用培地で培養した。

(5) 自家培養表皮移植

(3)と同様の同種皮膚移植実験モデルを作製した。同種皮膚移植に先立ち前述(4)の通り培養表皮シートの作製を行った。同種皮膚移植後1週間で、同種皮膚の表皮を剥離した同種真皮層に自家培養表皮移植を行った。コントロール群とDFAT治療群((3)と同じ投与量、投与方法)における培養表皮の生着率を比較した。

培養表皮移植後1,2,3週目に肉眼的観察およびH-E染色・エラスチカワンギーソン染色・CD3免疫染色による組織学的評価を行った。術後1,2,3週目に、デジタルカメラで撮影した画像をImageJ®を用いて解析し同種移植片の生着域を計測した。

4. 研究成果

(1) 同種皮膚移植実験

ブタを使用し同種皮膚の移植実験を施行した(n=6)。

同種皮膚移植1か月後のそれぞれの生着域は、対照群:51.2%、DFAT治療群:70.4%

対照群:24.2%、DFAT治療群:59.5%(図2)

対照群:66.7%、DFAT治療群:78.9%

対照群30.5%、DFAT治療群19.7%

対照群:25.0%、DFAT治療群:54.0% 対照群とDFAT治療群いずれも全体に植皮片が拒絶されていた。DFAT治療群では、生着域が大きい傾向を認めた。

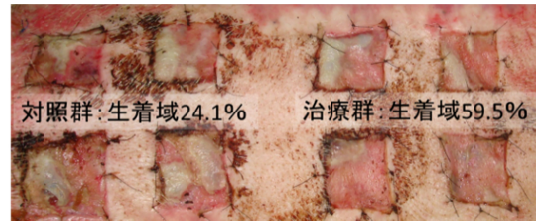


図2：術後1週間の局所所見
術後2週目以降は、移植片は拒絶され脱落した。

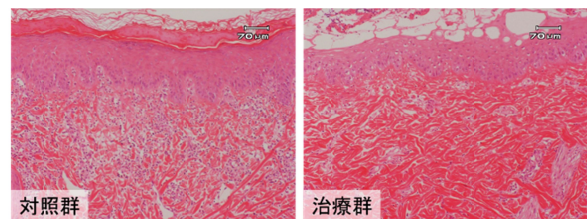


図3：術後1週間のH-E染色

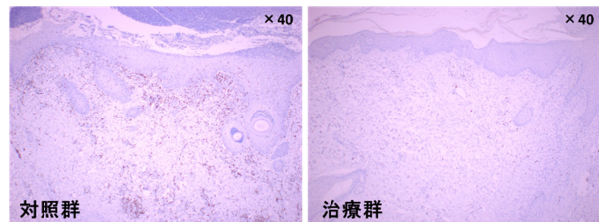


図4：術後1週間のCD3免疫染色

術後1週間で対照群では移植皮膚片全層に炎症性細胞浸潤を認めた。一方でDFAT治療群では、炎症性細胞浸潤は真皮深層に局限しており真皮表層への炎症性細胞の浸潤は少なかった(図3)。免疫染色でも治療群の真皮浅層へのCD3陽性細胞の浸潤が抑制されていた(図4)。術後2週目以降は、両群で移植片全層への同程度の炎症性細胞浸潤および真皮膠原繊維の減少を認めた。

(2) ブタ自家培養表皮シートの作成

鼠径部では重層化された培養表皮シートが作成不可能であったが、頸部では良好な自家培養表皮のシートが作成できた(図5,6)。

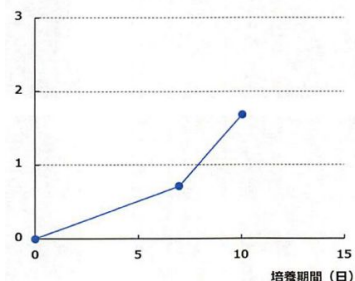


図5：頸部表皮の細胞増殖速度（PDL）

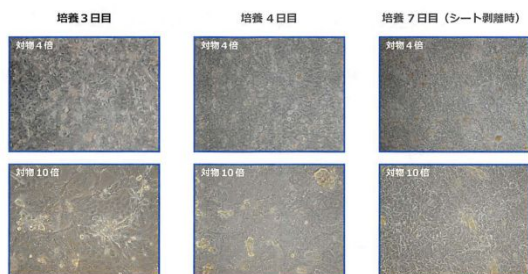


図6：頸部表皮のシート化培養時顕微鏡像

(3) 自家培養表皮移植実験

自家培養表皮移植後1週間で、対照群とDFAT治療群いずれも移植表皮は肉眼的に乾燥していた。H-E染色では、対照群において自家培養表皮と同種真皮の間に空隙を認め自家培養表皮の生着は確認できなかった。一方でDFAT治療群では、表皮と真皮が密着している部分も散見されたが、おおむね空隙を形成しており生着は確認できなかった(図7)。また、自家培養表皮移植後2週間で同種真皮が母床より拒絶され脱落した。

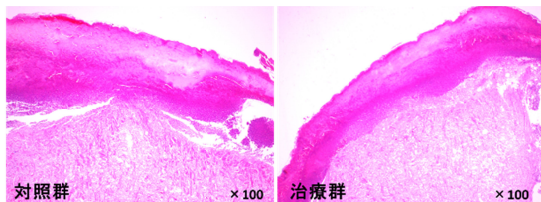


図7：自家培養表皮移植後1週間

(4) 結語

ブタの同種皮膚移植実験を行った結果、DFAT投与により炎症性細胞の遊走を抑制し一定の生着率向上効果が得られた。同種皮膚移植後にブタの自家培養表皮シートの移植実験を行ったが対照群とDFAT治療群いずれも自家培養表皮シートの生着は得られなかった。

本実験モデルでは、同種皮膚移植のレシピエントに健康なブタを使用したが、臨床の現場では重症熱傷により免疫能の低下した状態での同種皮膚移植が行われている。したがって、今後は免疫能の低下したブタを用いての検討が必要と考える。

本研究では、DFATにより同種皮膚の生着率向上効果は認められたが、自家培養表皮の生着率向上効果は認められなかった。

<引用文献>

Cuono C et al.(1986) Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. Lancet 17:1 1123-4

Matsumoto T, et al. (2008) Mature

adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. J Cell Physiol.;215(1):210-22.

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)

[学会発表](計4件)

Tsutomu Kashimura, Contribution of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells to the skin allograft survival in swine, 16th European Burns Association Congress, 2015年9月16日~2015年9月19日, Hannover (Germany)

Tsutomu Kashimura, Prolongation of skin allograft Survival by the transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells, 10th Asia Pacific Burn Congress, 2015年08月29日~2015年08月31日, Bali(Indonesia)

櫻村 勉, 脱分化脂肪細胞(DFAT)による凍結保存同種皮膚移植片の生着期間延長の試み, 第7回創傷外科学会総会・学術集会, 2015年07月24日~2015年07月25日, 東京ドームホテル(東京都文京区)

櫻村 勉, 脱分化脂肪細胞(DFAT)による凍結保存同種皮膚移植片に対する免疫抑制効果の検討, 第23回日本形成外科学会基礎学術集会, 2014年10月09日~2014年10月10日, キッセイ文化ホール(長野県松本市)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

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

下田 勝巳 (SHIMODA, Katsumi)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 00266793

櫻村 勉 (KASHIMURA, Tsutomu)
日本大学・医学部・助教
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