

ラット人工真皮移植モデルにおける脱分化脂肪細胞の効果に関する研究

Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting

副島一孝¹⁾、櫻村 勉¹⁾、浅見 崇¹⁾、風間智彦²⁾、松本太郎²⁾、仲沢弘明¹⁾
Kazuatak SOEJIMA¹⁾, Tsutom KASHIMURA¹⁾, Takashi ASAMI¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾,
Taro MATSUMOTO²⁾, Hiroaki NAKAZAWA¹⁾

¹⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野, ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

コラーゲンスポンジとシリコーン膜から成る2層性人工真皮(artificial dermis)は、真皮の欠損した全層皮膚欠損層に移植されると、移植床より宿主の細胞や毛細血管が侵入して真皮様組織が構築される。健常な創傷に移植された場合、約2~3週間の経過で真皮様組織が構築され、その上に薄い分層植皮を行って皮膚再建を完了する¹⁾。人工真皮の臨床使用上の課題は、真皮様組織構築に要する期間待機しなければならない点であり、その期間短縮が求められている²⁾。本研究³⁾では、ラットを用いた人工真皮移植モデルにおいて、人工真皮移植時に移植床に脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)を投与して真皮様組織構築に対する影響を検討した。尚、臨床で用いられているbFGF製剤の併用効果についても併せて検討した。その結果、DFAT投与により、人工真皮内への血管侵入および真皮様組織構築が促進され、bFGFとの併用によりその効果は有意に促進されることが認められた。人工真皮を用いた皮膚再建において、DFAT投与による待機期間短縮の可能性が示唆された。

【背景および目的】

1980年にYannas⁴⁾らにより報告されたartificial skinを基礎として開発された2層性人工真皮(artificial dermis: AD)はdermal regeneration templateとして機能するコラーゲンスポンジ層と細胞の侵入と水分喪失を防ぐ目的で表面に貼られたシリコーン膜の2層構造を成している。真皮の欠損した全層皮膚欠損創にADが移植されると、移植床より宿主の線維芽細胞が侵入し、細胞外マトリックスを産生して真皮様組織を構築するとともに、血管内皮細胞により毛細血管網が構築される。健常な創傷に移植された場合、約2~3週間の経過で真皮様組織が構築され、その上に薄い分層植皮を行って皮膚再建を完了する。すなわち、ADを用いた全層皮膚再建はAD移植と、真皮様組織構築を待つ2次的に行う分層皮膚移植の2回の手術を要する。ADの臨床使用上の課題は真皮様組織構築に要する期間待機しなければならない点であり、その期間短縮が求められている。現状では、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF製剤、トラフェルミン、フィブラスト、科研製薬)が臨床で使用されており、その血管新生促進効果を期待してAD移植時に併用されている。

本研究⁴⁾では、脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)の真皮様組織構築に対する効果を検討した。また、臨床で用いられているbFGF製剤の併用効果についても併せて検討した。

【方法】

1)DFAT の調整 Sprague-Dawley(SD)系ラット(8 週齢、雄)の腹腔内脂肪から単離した成熟脂肪細胞を天井培養法で調整し、実験に使用するまで凍結保存した⁵⁾。

2)ラット実験モデルの作成

同種同系ラットの背部に 1X1cm 大の全層皮膚欠損創を 4 カ所作成して人工真皮(Pelnac®、通常タイプ、グンゼ社製)を移植し人工真皮移植モデルとした。その際に

- ・対照群 (人工真皮のみを移植, n=8)
- ・DFAT 群:(DFAT 細胞(0.5×10^5 cells/cm²)を移植床に投与, n=8)
- ・bFGF 群:(bFGF 製剤 (30µg/ cm²)を移植床に投与, n=8)
- ・併用群:(DFAT 細胞(0.5×10^5 cells/cm²)および bFGF 製剤(30µg/ cm²)を移植床に投与する群, n=8)

を作成した。

移植後 2, 7 日目に組織学的に検討を行った。組織標本は屠殺後に体循環内に墨汁を注入し、毛細血管内を染色して作成した。そして、移植後 7 日目の標本を用いて、その中央の 200 x 200 µm の単位面積あたりの血管断面数および構築された真皮様組織の厚さにより定量的に評価を行った。真皮様組織の厚さの計測は digital photography analysis software (NIH image J, image processing program, Version 1.47n, National Institutes of Health)を用いて行った。統計処理は Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction により行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

【結果】

移植後 2 日目では対照群ではコラーゲンスポンジ層の真皮様組織構築、毛細血管侵入は全く見られなかった。DFAT 群、bFGF 群ではスポンジ層下層にわずかに真皮様組織構築が見られたものの、血管侵入は見られなかった。それらと比較して、併用群ではコラーゲンスポンジ層中層まで真皮様組織が構築されており、下層には毛細血管の侵入が認められた。移植後 7 日目では対照群ではまたスポンジ構造が残存しており血管侵入は殆ど見られなかったが、DFAT 群では真皮様組織構築、毛細血管侵入のいずれもが確認され、それらは、bFGF 群、併用群ではさらに促進されていた。

血管断面の定量結果は

group	血管数(per unit (200X200µm))
対照群	1.4 ± 1.3
DFAT 群	2.8 ± 1.3*
bFGF 群	5.8 ± 0.8 *
併用群	10.2 ± 1.3*

(*: $p < 0.05$ from control group)

bFGF 群、DFAT 群間にも有意差を認め、更に bFGF 群、併用群間にも有意差を認めた。

真皮様組織の厚さの定量結果は

group	真皮様組織厚(µm)
対照群	516.6.4 ± 33.7
DFAT 群	570.4 ± 68.5
bFGF 群	977.2 ± 231.2 *
併用群	1235.6 ± 99.8*

(*: $p < 0.05$ from control group)

対照群、DFAT 群間には有意差は認められなかったが、bFGF 群、DFAT 群間にも有意差を認

め、更に bFGF 群、併用群間にも有意差を認めた。

【考察】

今回の実験結果により、DFAT 群と対照群間に血管数に有意差を認めたことから、DFAT 自体が血管新生促進効果を有することが明らかとなった。また、bFGF との併用により bFGF 群よりも有意に血管新生促進、真皮様組織構築促進が認められたので、bFGF との併用による相乗効果も明らかとなった。

併用群では移植後 2 日目に既に真皮様組織内への血管侵入が確認された。皮膚の生着には移植床からの血管侵入による血行再開が必要であり、移植された皮膚は血行再開までの期間、創面からの漿液で栄養される。皮膚が漿液でどれくらいの期間保たれるかの検討報告は無いが、今後人工真皮と分層皮膚の同時移植の可能性も検討すべき課題と考えられた。

【結語】

人工真皮による皮膚再建時に移植床に DFAT を投与することにより血管新生促進効果が得られ、bFGF と併用すると真皮様組織構築、血管新生のいずれもが有意に促進されることが示された。

【参考文献】

- 1) Yannas IV, Orgill DP, Burke JF. Template for skin regeneration. *Plast Reconstr Surg*. Jan 2011;127 Suppl 1:60S-70S.
- 2) Soejima K, Chen X, Nozaki M, et al. Novel application method of artificial dermis: One-step grafting procedure of artificial dermis and skin, rat experimental study. *Burns*. 2006;32(3):312-318.
- 3) Soejima K, Kashimura T, Asami T, et al. Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting. *Journal of plastic surgery and hand surgery*. Jun 9 2014;49(1):25-31.
- 4) Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res*. 1980;14(1):65-81.
- 5) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol*. Apr 2008;215(1):210-222.