

脱分化脂肪細胞による自家培養表皮移植時の基底膜構築

促進効果に関する研究

Effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on formation of basement membrane after cultured epithelial autograft on artificial dermis

副島一孝¹⁾、樫村 勉¹⁾、浅見 崇¹⁾、風間智彦²⁾、松本太郎²⁾、仲沢弘明¹⁾
Kazuataka SOEJIMA¹⁾, Tsutomu 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】

培養表皮は移植床真皮との共同作業により基底膜を再構築して生着するので、真皮成分の存在しない移植床には著しく生着が不良である。重症熱傷症例に移植するためには、凍結保存同種皮膚や人工真皮で予め真皮構築を行ってから移植する必要がある¹⁾。本邦でも自家培養表皮移植が重症熱傷に保険収載され、臨床で広く行われている²⁾。しかしながら、現状の臨床での課題は、人工真皮を用いて真皮構築を行っても、自家培養表皮移植後に長期間移植皮膚の脆弱性が持続することであり³⁾、基底膜構成タンパク発現の遅延が原因として指摘されている⁴⁾。

本研究⁵⁾では、ブタを用いた自家培養表皮移植モデルにおいて、人工真皮による移植床準備に際して脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)DFAT 投与による基底膜構築促進効果を検討した。

その結果、DFAT 投与群では主要な基底膜構成タンパクである collagen type IV と laminin-5 が表皮真皮接着層における発現が有意に促進され、anchoring-fibril を含めて基底膜形成が促進されることが示され、DFAT 投与により自家培養表皮の人工真皮上への生着促進効果が示唆された。

【背景および目的】

1975 年に Green ら⁶⁾によりヒト表皮培養法が確立され、1981 年に O'Connor ら⁷⁾により初めて重症熱傷症例に培養表皮移植が行われた。しかし、その後、真皮成分の存在しない移植床には著しく生着が不良であることが明らかとなり、Cuono ら¹⁾により重症熱傷症例に凍結保存同種皮膚を用いて予め真皮構築を行ってから移植する方法が報告された。本邦でも自家培養表皮移植が重症熱傷に保険収載され、Cuono ら¹⁾の方法を用いて広く臨床で広く行われている²⁾。また、凍結保存同種皮膚の供給に制限がある本邦では人工真皮を用いた真皮構築も重要なオプションである。しかしながら、人工真皮を用いて真皮構築を行っても、自家培養表皮移植後に長期間移植皮膚の脆弱性が持続することが現状の臨床での課題であり³⁾、基底膜構成タンパク発現の遅延が原因として指摘されている⁴⁾。

本研究⁵⁾では、ブタを用いた自家培養表皮移植モデルにおいて、人工真皮による移植床準備に際して脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)DFAT 投与による基底膜構築促進効果を検討した。

【方法】

- 1) DFAT の調整 LWD 系ブタ(15kg, 雄)の頸部皮膚より Green 型培養表皮を 3T3 feeder layer 法で培養した。また、同部位皮下脂肪より天井培養法により DFAT を調整した⁸⁾。
- 2) 真皮構築 上記と同一個体ブタの背部の 2X3cm 大の脂肪が露出する全層皮膚欠損創を作成して人工真皮(Pelnac®, 通常タイプ、ゲンゼ社製)を移植した。その際に
対照群 (人工真皮単独移植 n=12)
DFAT 群 (DFAT 細胞(0.5X10⁵ cells/cm²)を移植床に投与, n=12)
を作成した。
- 3) 自家培養表皮移植 真皮構築手術後 10 日目に構築された真皮様組織上に自家培養表皮移植を行った。
- 4) 組織学的検討 移植後 14 日目に開創して、組織採取を行い、collagen type IV, laminin-5 の免疫染色を行い、表皮真皮接着層中央部で 40X80μm の単位面積内の染色部位の定量を行った。解析は digital image analysis software (Popimaging, Version 6.10: Digital being kids Ltd., Tokyo, Japan)を用いて行い、統計処理は t-test で行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

【結果】

対照群と比較して、DFAT 群では表皮真皮接着層において collagen type IV, laminin-5 の発現が促進されており、単位面積当たりの染色度を定量評価した結果、

	collagen type IV (%)	laminin-5 (%)
対照群	1.9 ± 1.5	0.8 ± 1.0
DFAT 群	17.4 ± 6.5*	14.4 ± 3.5*

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

いずれも、DFAT 群で有意に染色度の促進が見られた。

また、真皮表皮接着層の透過電子顕微鏡像では、対照群では基底膜構築も不完全であったのに対して、DFAT 群では正常皮膚と遜色のない基底膜、hemidesmosome, anchoring fibril が形成されていた。

【考察】

今回の実験結果より自家培養表皮移植のための移植床を人工真皮により準備する際に、移植床に DFAT を投与すると基底膜構築促進が得られることが示唆された。現状での課題である移植後の長期脆弱性は表皮-真皮の接着不良が原因であるので、laminin-5, anchoring fibril の形成促進はその解決に寄与するものと期待される。表皮真皮接着層における基底膜と脂肪細胞の固有基底膜は構成タンパクに共通なものが多く、collagen type IV, laminin は共通しており、間葉系幹細胞が脂肪分化する際に多く発現することが報告されている^{9,10)}。DFAT にはこれらのタンパク質の発現能が備わっていると考えられ、培養表皮移植時に併用することでその能力を発揮し必要部位に作用したと推測された。

自家培養表皮の培養と調整には約 3-4 週間を要するので、重症熱傷患者を自家培養表皮移植で治療するためには、急性期に熱傷壊死組織を切除し、真皮構築手術を行う必要がある。自家 DFAT の調整には約 2 週間を要するので、今後同種 DFAT ででの効果も検討する必要がある。

【結語】

自家培養表皮移植のための移植床を人工真皮により準備する際に、移植床に DFAT を投与すると基底膜構築促進が得られることが示唆され、それにより生着促進効果が期待される。

【参考文献】

- 1) Cuono CB, Langdon R, Birchall N, et al. Composite autologous-allogeneic skin replacement: development and clinical application. *Plast Reconstr Surg*. Oct 1987;80(4):626-637.
- 2) 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*. Jun 2016;42(4):769-776.
- 3) Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature. *Burns*. Jun 2006;32(4):395-401.
- 4) Matsumura H, Gondo M, Imai R, et al. Chronological histological findings of cultured epidermal autograft over bilayer artificial dermis. *Burns*. Jun 2013;39(4):705-713.
- 5) Soejima K, Kashimura T, Asami T, et al. Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on Formation of Basement Membrane after Cultured Epithelial Autograft on Artificial Dermis. *Plast Reconstr Surg*. 2019;in press.
- 6) Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331-343.
- 7) O'Connor NE, Mulliken JB, Schlegel SB. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet*. 1981;1(8211):75-78.
- 8) 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.
- 9) 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*. Nov 5 1988;263(31):16163-16169.
- 10) Noro A, Sillat T, Virtanen I, et al. Laminin production and basement membrane deposition by mesenchymal stem cells upon adipogenic differentiation. *J Histochem Cytochem*. Oct 2013;61(10):719-730.