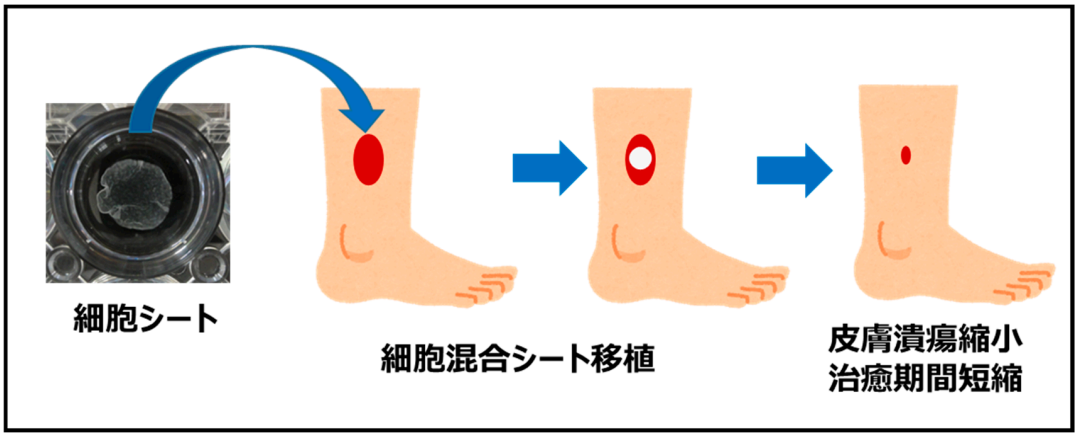
165　細胞シートを用いた難治性皮膚治療に対する細胞移植	上野　耕司

【目的】我々が所属する研究室では、これまでに難治性皮膚潰瘍に対して末梢血単核球と線維芽細胞から成る単層細胞混合シート移植の治療法の開発を行ってきた。本研究では、治療効果を高める為に、積層細胞混合シートの開発を行い、その機能を検証した。

【方法】末梢血単核球および線維芽細胞を用いて、積層細胞混合シートおよび積層線維芽細胞シート作製し、その培養上清中の成長因子等の濃度の測定を評価した。ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ積層線維芽細胞シートを NOD / Scid マウスの背部に作製した皮膚欠損部位に移植して細胞シートの残存期間を観察した。積層細胞混合シートを NOD / Scid マウスの背部に移植して 3 ヶ月後の造腫瘍性を評価した。

【結果】積層細胞混合シートは VEGF、HGF、Angiopoietin-1、SDF-1 α を分泌していた。NOD / Scid マウスの背部に移植したルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ積層線維芽細胞シートは、移植後 35 日目まで発光が観察されたが、移植後 45 日目には発光は観察されなかった。積層細胞混合シート移植 3 ヶ月後の NOD / Scid マウスにおいて、造腫瘍性は観察されなかった。

難治性皮膚潰瘍に対する細胞シート移植治療



165. 細胞シートを用いた難治性皮膚治療に対する細胞移植

上野　耕司

山口大学 医学部附属病院 第一外科

Key words：再生医療，細胞シート，難治性皮膚潰瘍

緒　言

本研究では、難治性皮膚潰瘍に対する新しい細胞移植療法の開発を目的とする。難治性皮膚潰瘍の原因は主に血行不良であり、血管内治療やバイパス手術による血行再建が最良の治療法であるが、血行再建が困難な症例や適応とならない症例も少なからず存在する。また血行再建が成功したとしても、局所の循環障害が残存した場合、皮膚潰瘍が難治性となることがある。国内には 130 万人の難治性皮膚潰瘍患者数が存在している。現在、難治性皮膚潰瘍の治療においては、治療薬や人工真皮が用いられているが、いずれも潰瘍部位にある程度の血流がないと治療効果が期待できないことや、人工真皮においては感染を伴った症例には用いられないなど適応や効果が限定的であり、新たな治療法の開発が望まれている。糖尿病患者や末梢血管障害患者の多くでは、患者自身の難治性皮膚潰瘍の予後不良により約 4 万人が指・下肢切断を余儀なくされている。

我々が所属する研究室では、1999 年には重症下肢虚血に対する自己骨髄細胞移植治療を世界に先駆けて実施した[1]。その後、移植細胞種を骨髄細胞から末梢血単核球に変更して治療の低侵襲化に成功し、近年では、“成長因子産生能の増強”や“酸化ストレス抵抗性の獲得”等を誘導する「低酸素プレコンディショニング法」を考案した［2]。同法により治療効果は向上したが、十分な血流改善が得られない症例や潰瘍治癒までに長期間を要する症例などが存在し、依然として重症虚血障害の根治には至っていない。

我々が所属する研究室では、これまでに難治性皮膚潰瘍に対して末梢血単核球と線維芽細胞から成る単層細胞混合シート移植の治療法の開発を動物モデルにおいて実施してきた［3～5]。本研究では、治療効果を高める為に、ヒト積層細胞混合シートの作製法を開発し、その機能を検討した。

方法および結果

1. 積層細胞シート作製の試み

これまでの単層細胞混合シート作製において、線維芽細胞の細胞数は 0.625×10^5 個/cm^2 であったことから、積層細胞シート作製の試みとして、1 日目、2 日目、3 日目と同じウェルに、ヒト線維芽細胞を 2.5×10^5 個/cm^2 で播種し、1 ウェルの細胞数を合計で 7.5×10^5 個/cm^2 にして培養を続け、8 日目に細胞シートを剥離してハムに移植後、ホルマリン固定パラフィン包埋後に切片を作製して HE 染色により、細胞シートの断面を観察したところ、細胞が積層した状態が観察された（図 1)。

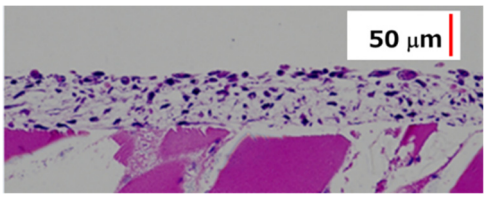


図 1. 積層細胞シート
作製した細胞シートをハムに移植してホルマリン固定パラフィン包埋後に切片を作製して HE 染色した図。

2. 積層細胞シート作製における線維芽細胞の細胞数の上限の検討

次に、積層細胞シート作製におけるヒト線維芽細胞の細胞数の上限を検討する為に、4.5～12.5 × 10^5 個/cm^2 でヒト線維芽細胞を播種して 3 日間培養後の培養上清中の VEGF 濃度を ELISA で測定した（図 2）。積層細胞シート作製におけるヒト線維芽細胞の細胞数の上限は、VEGF 産生量から 6 × 10^5 個/cm^2 であることが示唆された。

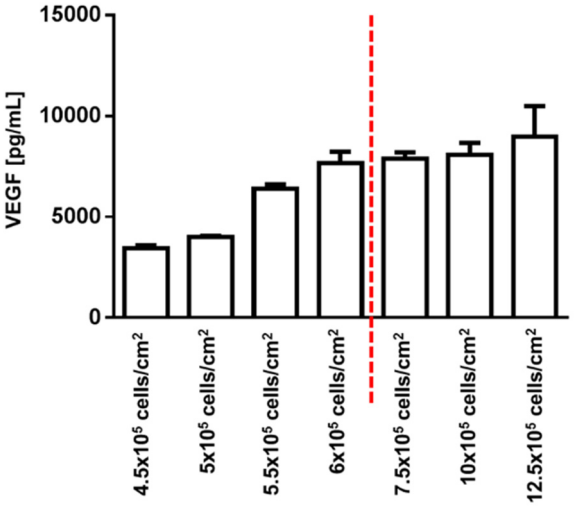


図 2. VEGF を指標とした積層細胞シートの播種する細胞数の上限の検討

積層細胞シート作製における線維芽細胞数の上限を培養上清中の VEGF を指標に検討した。エラーバーは SD を示す。

3. 積層細胞シートの厚さの比較

積層細胞シートの厚さと VEGF 産生能を比較するために、ヒト線維芽細胞を 2.5 × 10^5、4 × 10^5、6 × 10^5 個/cm^2 で播種して 3 日間培養後に細胞シートを剥離してハムに移植後、ホルマリン固定パラフィン包埋後に切片を作製して HE 染色により、細胞シートの断面を観察したところ、細胞数の増加に比例して細胞シートは厚くなり、また、培養上清中の VEGF 濃度も増加していた（図 3）。

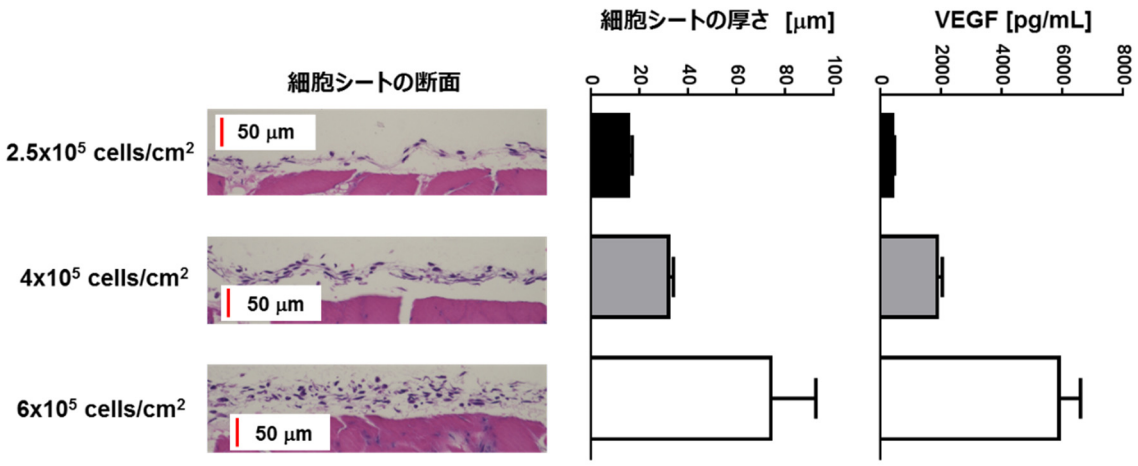


図 3. 播種する細胞数と積層細胞シートの厚さの比較

播種する細胞数による積層細胞シートの厚さと VEGF 濃度を測定した。エラーバーは SD を示す。

4. 積層細胞混合シートから分泌される成長因子解析

積層細胞混合シートを作製する為に、末梢血単核球 2×10^6 個と線維芽細胞 2×10^6 個を 3 日間共培養後の培養上清中の成長因子の濃度を ELISA で測定を行った。また、末梢血単核球 2×10^6 個のみと、線維芽細胞 2×10^6 個のみの培養上清も比較検討した。VEGF と HGF は共に、末梢血単核球からは分泌される量は検出限界値以下であったが、積層線維芽細胞シートからは分泌されていた。積層細胞混合シートから分泌される VEGF と HGF の濃度は、積層線維芽細胞シートよりも高い値であった。また、Angiopoietin-1 は末梢血単核球から分泌される濃度が最も高い値であり、SDF-1α は積層線維芽細胞シートから分泌される濃度が最も高い値であった（図 4）。

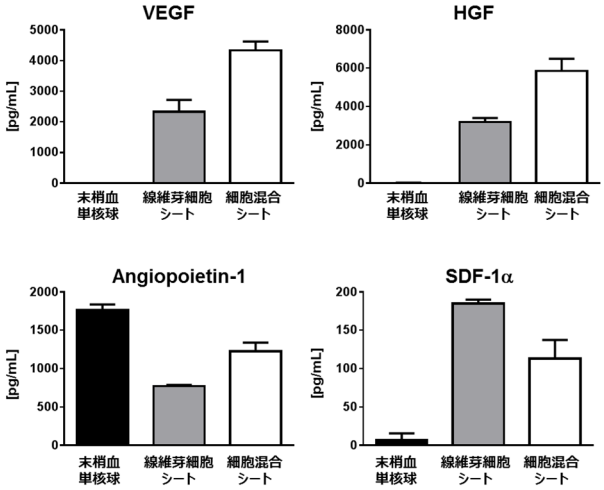


図 4. 積層細胞シートが分泌する成長因子の測定
末梢血単核球、積層線維芽細胞シート、積層細胞混合シートが分泌する成長因子の濃度を ELISA で測定した。エラーバーは SD を示す。

5. 積層線維芽細胞シート移植後の生体における残存期間

細胞シート移植後の生体における残存期間を観察する為に、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだヒト線維芽細胞で作製した積層線維芽細胞シートを、NOD/Scid マウスの背部に作製した皮膚欠損部位に移植し、経時的にルシフェラーゼの発光を観察することで、移植した細胞シートの存在を検出することにした。積層線維芽細胞シート 1 枚は 5×10^5 個で作製され、その細胞シート 1 枚が NOD/Scid マウスの背部に移植された。積層線維芽細胞シート移植後 35 日目では、ルシフェラーゼの発光が観察される NOD/Scid マウスも存在したが、移植後 45 日目では、ルシフェラーゼの発光は観察されなかった（図 5）。

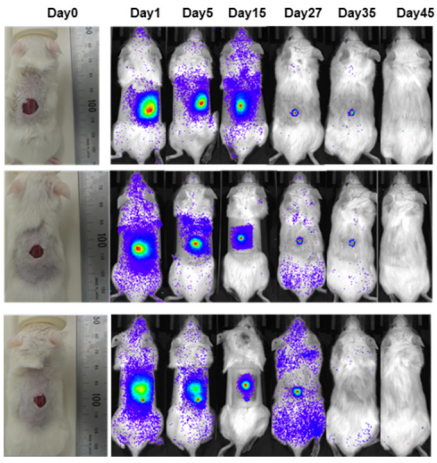


図 5. ルシフェラーゼ発光による移植した積層線維芽細胞シートの残存期間の観察

6. 積層細胞混合シートの造腫瘍性の観察

積層細胞混合シートの造腫瘍性を観察する為に、末梢血単核球 2×10^6 個と線維芽細胞 2×10^6 個を 3 日間共培養して作製した積層細胞混合シート 1 枚を、NOD/Scid マウスの背部に作製した皮膚欠損部位に移植して 3 ヶ月後の造腫瘍性および各臓器における移植細胞の有無を観察した。10 匹の NOD/Scid マウスの背部に積層細胞混合シート 1 枚を移植したが、10 匹のマウス全てにおいて移植部位における造腫瘍性は観察されなかった。また、積層細胞混合シート移植して 3 ヶ月後に犠牲死させるまで、10 匹の全てのマウスの死亡例はなかった。犠牲死後に、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、腸、脾臓、皮膚（細胞シート移植部位と非移植部位）を摘出し、ホルマリン固定パラフィン包埋後に切片を作製後、ヒト HLA に対する抗体（株式会社ホクドー社製、製品番号 AB-46-H、Anti HLA class I -A,B,C、Mouse Monoclonal antibody Conjugation：HRP）を用いた免疫染色では陽性は確認されなかった。マウス 1 匹に対して各臓器は 10 枚の切片で免疫染色が行なわれた（図 6）。

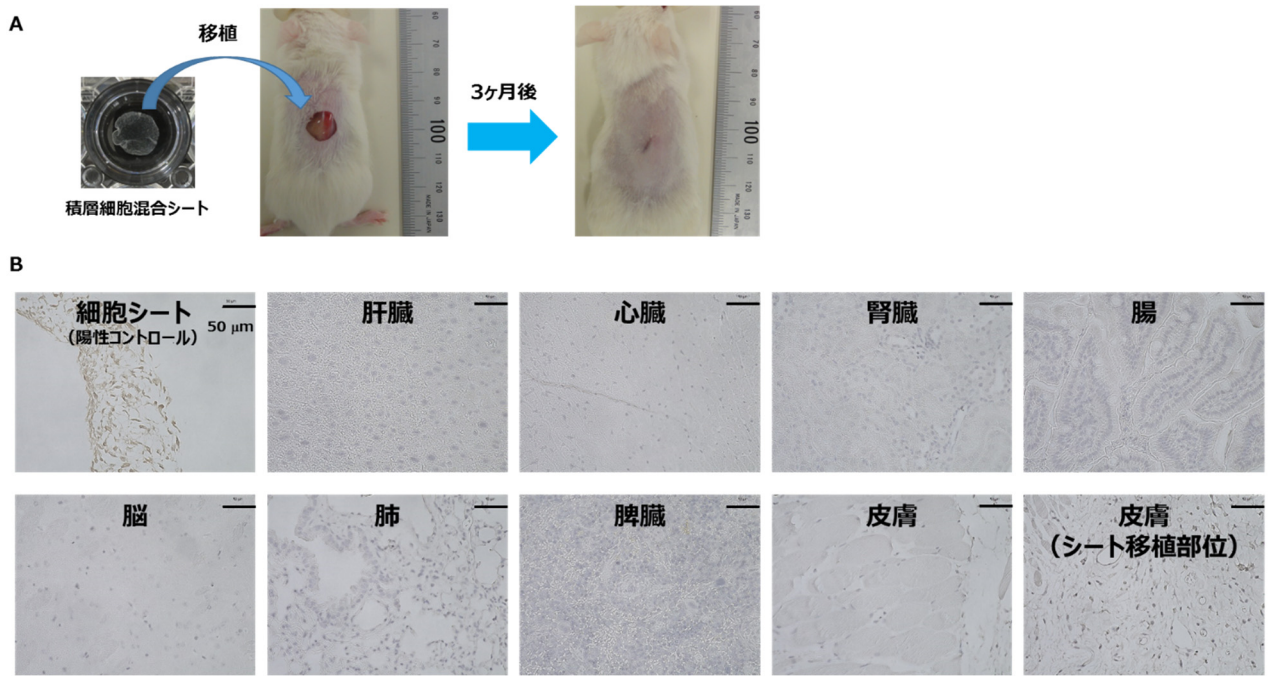


図 6. 積層細胞混合シートの造腫瘍性の観察

(A) NOD/Scid マウスの背部に作製した皮膚欠損部位に積層細胞混合シートを移植し、移植 3 ヶ月後における移植箇所の写真。

(B) 積層細胞混合シート移植 3 ヶ月後の各臓器におけるヒト細胞の有無をヒト HLA に対する抗体で免疫染色した図。

考　察

本研究は、線維芽細胞を播種する細胞数によって厚みのある積層細胞シートを簡便に作製する方法を提示すると考えられるが、成長因子の一つである VEGF の産生量を指標とした場合には、播種する細胞数および積層細胞シートの厚さの上限が存在することが示唆された。

これまでの研究からも、マウスの背部に作製した皮膚欠損部位に移植した細胞シートは治癒した組織には存在しないことが報告されているのと同じく [3]、本研究のルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ線維芽細胞シート移植の結果からも、移植した細胞シートは生体には生着せずに消えていくことを示唆する結果となった。本研究の結果が示すように、積層細胞混合シートは造腫瘍性が低いことから、難治性皮膚潰瘍に対する細胞シート移植としては安全性の高い治療であると考えられる。

本研究の結果は、難治性皮膚潰瘍に対して末梢血単核球と線維芽細胞から成る積層細胞混合シート移植が新たな治療法として有用性が高いことを示唆し、実用化に向けて強く後押しする結果であると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、山口大学大学院医学系研究科器官病態外科学の濱野公一教授である。

文　献

1) Esato K, Hamano K, Li TS, Furutani A, Seyama A, Takenaka H, Zempo N. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease. Cell Transplant. 2002;11(8):747-52. PMID: 12588106

2) Kudo T, Hosoyama T, Samura M, Katsura S, Nishimoto A, Kugimiya N, Fujii Y, Li TS, Hamano K. Hypoxic preconditioning reinforces cellular functions of autologous peripheral blood-derived cells in rabbit hindlimb ischemia model. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Feb 14;444(3):370-5. PMID: 24463101 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.054.

3) Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Tanaka Y, Nakamura T, Nishimoto A, Murata T, Hosoyama T, Hamano K. Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. Sci Rep. 2016 Jun 22;6:28538. PMID: 27329845 doi: 10.1038/srep28538.

4) Takeuchi Y, Ueno K, Mizoguchi T, Samura M, Harada T, Oga A, Murata T, Hosoyama T, Morikage N, Hamano K. Ulcer healing effect of autologous mixed sheets consisting of fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells in rabbit ischemic hind limb. Am J Transl Res. 2017 May 15;9(5):2340-2351. PMID: 28559984

5) Takeuchi Y, Ueno K, Mizoguchi T, Samura M, Harada T, Oga A, Murata T, Hosoyama T, Morikage N, Hamano K. Development of Novel Mouse Model of Ulcers Induced by Implantation of Magnets. Sci Rep. 2017 Jul 7;7(1):4843. PMID: 28687753 doi: 10.1038/s41598-017-05250-y.