

令和元年6月5日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10661

研究課題名(和文) 他家線維芽細胞シートを用いた難治性皮膚潰瘍に対する再生医療法の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine for refractory skin ulcers using fibroblasts

研究代表者

鈴木 亮 (SUZUKI, Ryo)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10570319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：フィブリングルーを用いた細胞移植の検討において、細胞はフィブリングルーの内部には存在せず、フィブリングルーの周囲表面に存在することから、移植された細胞が効率的に移植部位と接することが示唆された。また、マウスを用いた皮膚潰瘍モデルにおいて、フィブリングルーを用いた末梢血単核球と線維芽細胞を皮膚欠損部位に移植する方法は、細胞シート移植による治療よりも創傷治癒率が優位に高い結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性皮膚潰瘍に対する新たな治療法として細胞移植治療があるが、皮膚潰瘍の形態は症例によって異なる。そのため、本研究では、様々な皮膚潰瘍の形態に対応する細胞移植法としてフィブリングルーを用いた細胞移植法を検討した。本研究結果は、フィブリングルーを用いた末梢血単核球と線維芽細胞の移植は、細胞シートよりも治療効果が高い可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：In examination of cell implantation using fibrin glue, cells were present on the surface of fibrin glue but not inside. This result suggested that implanted cells effectively come in contact with implantation sites. In ulcer mouse model, implantation of PBMCs and fibroblasts using fibrin glue had a high therapeutic effect compared to implantation of cell sheet.

研究分野：細胞移植

キーワード：細胞移植 難治性皮膚潰瘍 再生医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、国内の難治性皮膚潰瘍治療においては、フィブラスプレー®と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。

我々は、これまでに末梢血単核球と線維芽細胞から作製する細胞混合シートの有用性を動物モデルで報告している (Sci Rep 2016; 6: 28538, Am J Transl Res. 2017;9:2340-2351)。しかし、臨床的視点から細胞シート移植治療の課題として、細胞シートが、様々な形態の潰瘍を完全に覆うことは難しいのではないかと考えている。

そこで、我々は既に臨床の現場で使用されているフィブリングルーを用いれば、様々な形態の潰瘍に効率よく細胞を移植できるのではないかと考え、本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、皮膚潰瘍モデルに対してフィブリングルーを用いた細胞移植法を確立し、その治療効果を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 細胞単離法: C57BL/6 マウスの尾約 1cm の組織をコラゲナーゼ処理し、その組織から単離された線維芽細胞を用いた。また、末梢血単核球は、腹部大静脈から採血後に、Lympholyte®-M (Cedar-Lane Laboratories 者) を用いて単離した。

(2) フィブリングルーを用いた細胞移植法: 図 1 に示すように、線維芽細胞 5×10^5 個と末梢血単核球 2×10^6 個をトロンピン溶液 80 μ l に準備後、動物の潰瘍モデル部位および 24-well plate の 1 ウェルに移植し、次にフィブリノゲン溶液 80 μ l を加えることで固体化させた。また、細胞シートには、フィブリノゲン溶液を加えなかった。フィブリングルーはベリプラスト (CSL Behring 社) が使用された。

(3) 細胞生存評価: CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社) を 1:5 で混合した培養液で細胞を 2 時間反応させた後に、その溶液の一部を 96-well plate に移し、2030 ARVO X4 microplate reader (PerkinElmer 社) を用いて 490nm で測定した。

(4) ELISA による成長因子測定: 24-well plate で作製されたフィブリングルーおよび細胞シートは、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、大気圧酸素能で 2 日間培養後、33 $^{\circ}$ C、5%CO₂、2%O₂ で 1 日間培養され、その培養上清中の成長因子が ELISA で測定された。ELISA キットは R&D Systems 社製が使用された。

(5) Tube formation アッセイ: マトリゲルコーティング (Corning 社) された 96-well plate の 1 ウェルに 2×10^4 個の HUVEC が播種された。末梢血単核球と線維芽細胞をフィブリングルーまたは細胞シートで、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、大気圧酸素能で 2 日間培養後、33 $^{\circ}$ C、5%CO₂、2%O₂ で 1 日間培養した培養上清が HUVEC のウェルに加えられた。新鮮培地がコントロールとして使用された。6 時間後に、HUVEC の形態が観察された。

(6) Migration アッセイ: 24-well plate に線維芽細胞が播種され、200 μ l チップで細胞が剥離された。末梢血単核球と線維芽細胞をフィブリングルーまたは細胞シートで、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、大気圧酸素能で 2 日間培養後、33 $^{\circ}$ C、5%CO₂、2%O₂ で 1 日間培養した培養上清が線維芽細胞のウェルに加えられた。培養開始直後と培養開始 16 時間後に、細胞の様子が観察された。

(7) 潰瘍モデルに対するフィブリングルーを用いた細胞移植の治療効果: ストレプトゾシン投与で糖尿病を誘導した C57BL/6 マウスの背部に外科的手法で直径 8mm の皮膚全層欠損を作製し、潰瘍モデルとした。無治療であるコントロール群、フィブリングルーのみ群、細胞シート移植群、細胞をフィブリングルーで移植した群で治療効果が評価された。1 群のマウスは 6 匹で実施された。創傷治癒率は day0、day9、day14 で評価された。

4. 研究成果

(1) フィブリングルーを用いた細胞移植法の検討

図 1A で示す方法は、末梢血単核球と線維芽細胞をフィブリングルーで移植する方法である。固体化したフィブリングルーを HE 染色で観察すると、細胞は固体化したフィブリングルーの内部には存在せず、固体化したフィブリングルーの周囲に存在していることが観察された (図 1B)。また、細胞生存アッセイを実施したところ、フィブリングルーを用いた末梢血単核球と線維芽細胞の細胞生存は、細胞シートを構成する末梢血単核球と線維芽細胞の細胞生存よりも高い結果であった (図 1C)。

(2) フィブリングルーを用いた細胞が分泌する成長因子濃度

フィブリングルーを用いた末梢血単核球と線維芽細胞が分泌する VEGF、HGF、TGF- β 1 の濃度は、細胞シートを構成する末梢血単核球と線維芽細胞のよりも高い結果であった (図 2)。

(3) HUVEC を用いた血管新生能評価

フィブリングルーを用いた末梢血単核球と線維芽細胞の培養上清を加えた HUVEC は、細胞シートを構成する末梢血単核球と線維芽細胞の培養上清を加えた HUVEC に比べて junction の数が多い結果であった (図 3)。

図1 フィブリンゲルを用いた細胞移植法

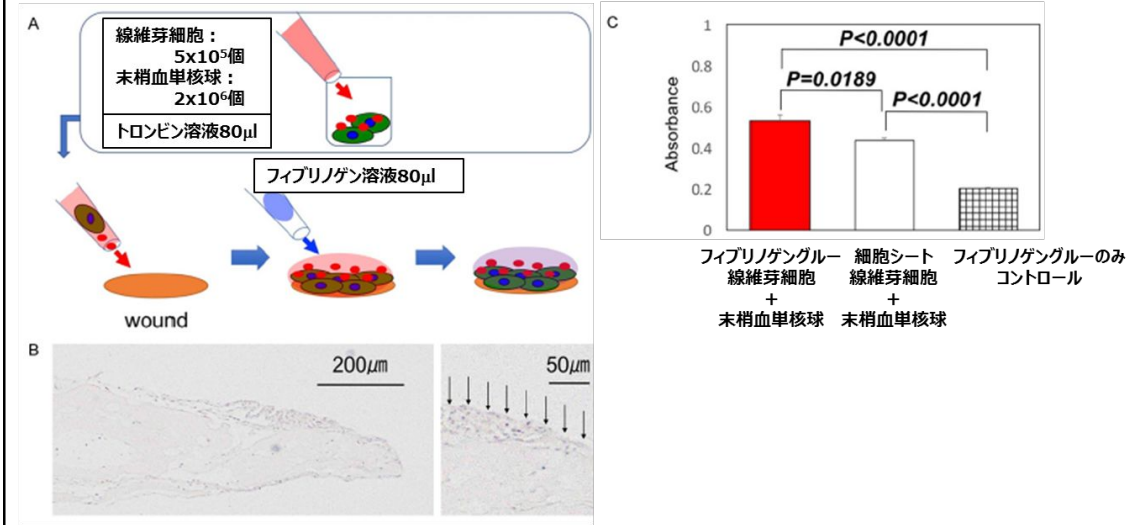


図2 フィブリンゲルを用いた細胞が分泌する成長因子濃度

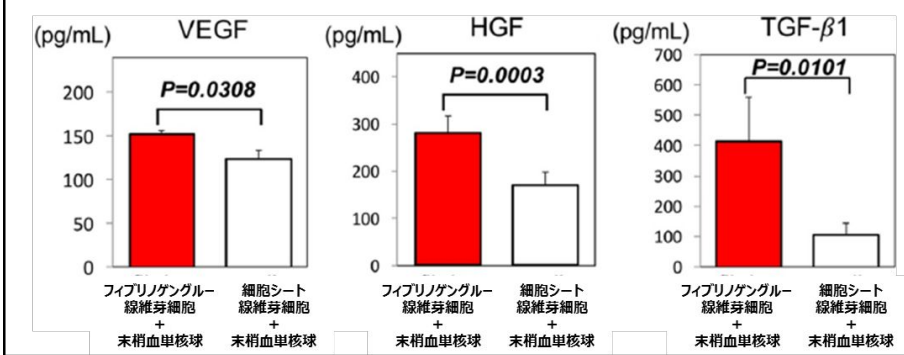


図3 フィブリンゲルを用いた細胞の培養上清によるHUVECを用いた血管新生能評価

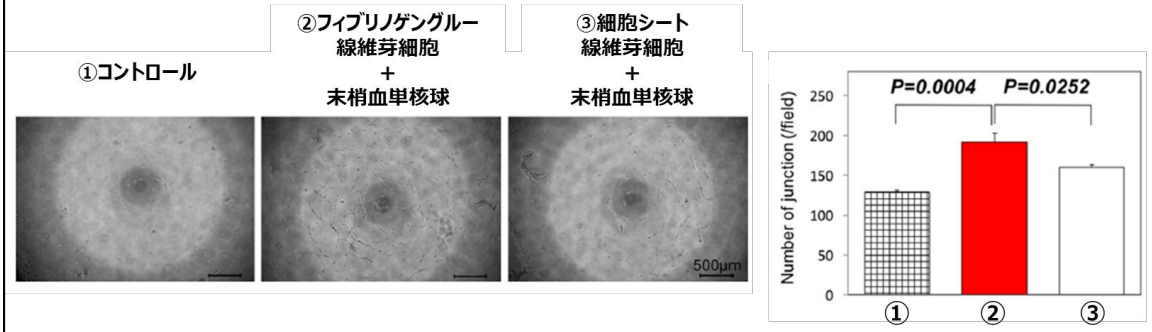
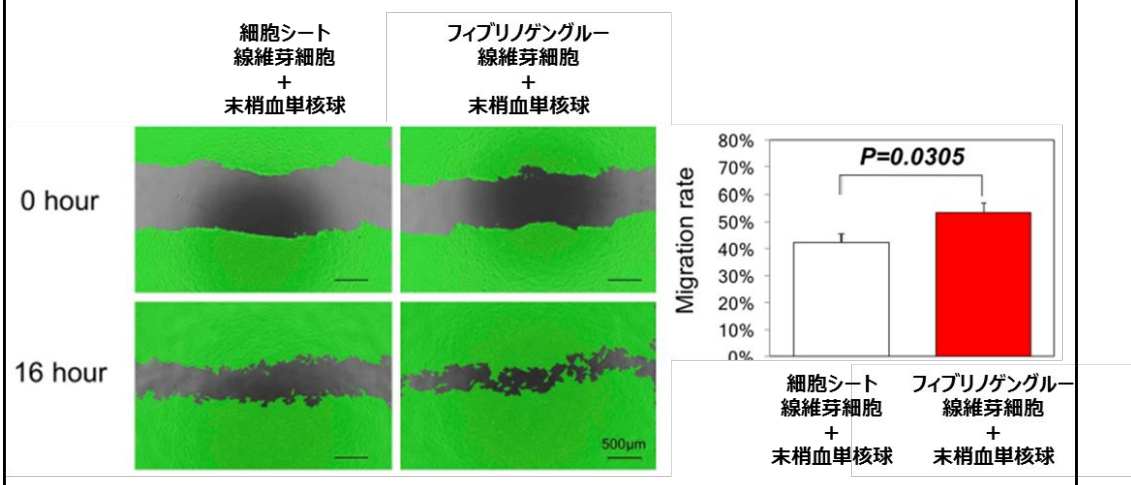


図4 フィブリンゲルを用いた細胞の培養上清による細胞移動評価

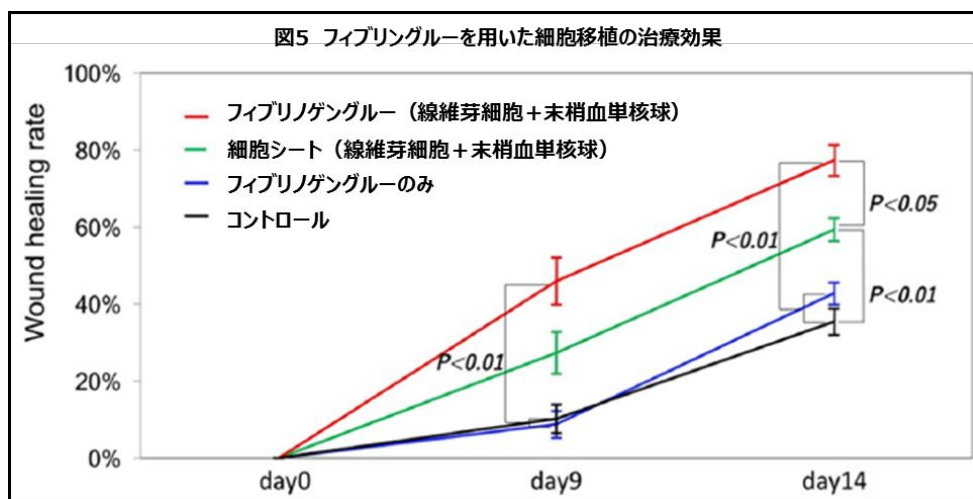


(4) 細胞移動評価

フィブリングルーを用いた末梢血単核球と線維芽細胞の培養上清を加えた線維芽細胞は、細胞シートを構成する末梢血単核球と線維芽細胞の培養上清を加えた線維芽細胞よりも、細胞の移動度が高い結果であった(図4)。

(5) フィブリングルーを用いた細胞移植の治療効果

フィブリングルーを用いた末梢血単核球と線維芽細胞の移植は、day14において他の3群よりも有意に創傷治癒率が高い結果であった(図5)。



本研究から、フィブリングルーを用いた末梢血単核球と線維芽細胞の移植は、潰瘍面に効率的に細胞を移植することが可能であり、フィブリングルーは細胞を移植する足場として有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Takahiro Mizoguchi, Koji Ueno, Yuriko Takeuchi, Makoto Samura, Ryo Suzuki, Tomoaki Murata, Tohru Hosoyama, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano. Treatment of Cutaneous Ulcers with Multilayered Mixed Sheets of Autologous Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells. Cellular Physiology and Biochemistry. 2018;47:201-211. 査読有 doi:10.1159/000489767

Takahiro Mizoguchi, Koji Ueno, Masashi Yanagihara, Makoto Samura, Hiroshi Kurazumi, Ryo Suzuki, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano. Autologous fibroblasts, peripheral blood mononuclear cells, and fibrin glue accelerate healing of refractory cutaneous ulcers in diabetic mice. American Journal of Translational Research. 2018;10:2920-2928. 査読有 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6176242/>

Hiroshi Kurazumi, Akira Fujita, Tamami Nakamura, Ryo Suzuki, Masaya Takahashi, Bungo Shirasawa, Akihito Mikamo, Kimikazu Hamano. Short- and long-term outcomes of intramyocardial implantation of autologous bone marrow-derived cells for the treatment of ischaemic heart disease. Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery. 2017;24:329-334. 査読有 doi:10.1093/icvts/ivw412

Tamami Nakamura, Tohru Hosoyama, Junichi Murakami, Makoto Samura, Koji Ueno, Hiroshi Kurazumi, Ryo Suzuki, Akihito Mikamo, Kimikazu Hamano. Age-related increase in Wnt inhibitor causes a senescence-like phenotype in human cardiac stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2017;487: 653-659. 査読有 doi:10.1016/j.bbrc.2017.04.110

Tamami Nakamura, Tohru Hosoyama, Daichi Kawamura, Yuriko Takeuchi, Yuya Tanaka, Makoto Samura, Koji Ueno, Arata Nishimoto, Hiroshi Kurazumi, Ryo Suzuki, Hiroshi Ito, Kensuke Sakata, Akihito Mikamo, Tao-Sheng Li, Kimikazu Hamano. Influence of aging on the quantity and quality of human cardiac stem cells. Scientific Reports. 2016;6:22781. 査読有 doi:10.1038/srep22781

Yosuke Miyazaki, Takayuki Okamura, Akira Fujita, Akihito Mikamo, Tetsuro Oda, Yasuaki Wada, Atsuo Yamashita, Ryo Suzuki, Masaya Takahashi, Kimikazu Hamano, Masafumi Yano. Coronary obstruction occurring 72 h after transcatheter aortic valve replacement with a self-expandable valve. International Journal of Cardiology. 2016;223:1 - 3. 査読有 doi:10.1016/j.ijcard.2016.08.132

〔学会発表〕(計 16 件)

鈴木 亮、美甘章仁、池下貴広、中村玉美、高橋雅弥、白澤文吾、濱野公一、大動脈弁輪破壊を伴う活動期感染性心内膜炎に対する治療成績、第 118 回日本外科学会定期学術集会、2018 年

鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、中村玉美、藏澄宏之、白澤文吾、立石裕樹、小田哲郎、岡村誉之、矢野雅文、濱野公一、当院における TransApical Transcatheter Aortic Valve Implantation の治療成績、第 112 回日本循環器学会中国・四国合同地方会、2018 年

鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、中村玉美、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一、高齢者(80 歳以上)の単独狭心症に対する単独冠動脈バイパス術の外科治療成績、第 61 回関西胸部外科学会学術集会、2018 年

鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、中村玉美、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一、冠動脈バイパス術施行時の free graft とした内胸動脈と大伏在静脈を用いた V composite graft の治療成績、第 23 回日本冠動脈外科学会学術大会、2018 年

鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一、三尖弁閉鎖不全症に対する三尖弁輪形成術の遠隔期成績 軽度以下の三尖弁閉鎖不全症に対する予防的三尖弁輪形成術の適応、第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会、2018 年

Ryo Suzuki, Akihito Mikamo, Yutaro Matsuno, Akira Fujita, Hiroshi Kurazumi, Bungo Shirasawa, Kimikazu Hamano, Intimal protected adventitial inversion technique during total aortic arch replacement accelerates false-lumen thrombosis and aortic remodeling for acute type A aortic dissection, 32nd EACTS Annual Meeting, 2018

鈴木 亮、美甘章仁、池下貴広、藤田 陽、高橋雅弥、濱野公一、弓部大動脈瘤に対する弓部大動脈全置換術の成績 脳合併症低減のための統合的治療戦略、第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会、2017 年

鈴木 亮、美甘章仁、池下貴広、藤田 陽、高橋雅弥、濱野公一、後天性三尖弁閉鎖不全症に対する治療成績と治療戦略、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年

鈴木 亮、美甘章仁、山本直宗、藤田 陽、中村玉美、高橋雅弥、濱野公一、右小開胸 MICS (minimally invasive cardiac surgery) は心臓手術の標準アプローチとなり得るか? 第 60 回関西胸部外科学会学術集会、2017 年

鈴木 亮、美甘章仁、池下貴広、藤田 陽、中村玉美、高橋雅弥、濱野公一、CABG、apico-aortic valved conduit 術後の MR に対して右小開胸による心室細動下 MVR を施行した 1 例、第 110 回日本循環器学会中国・四国合同地方会、2017 年

鈴木 亮、美甘章仁、池下貴広、藤田 陽、中村玉美、高橋雅弥、白澤文吾、濱野公一、Malperfusion は急性大動脈解離 (Stanford A 型) の治療成績に影響するか、第 70 回日本胸部外科学会定期学術集会、2017 年

鈴木 亮、美甘章仁、池下貴広、中村玉美、高橋雅弥、濱野公一、大動脈縮窄症に伴う側副血行路の肋間動脈瘤に対して血管内治療を施行した 1 例、第 111 回日本循環器学会中国地方会、2017 年

Ryo Suzuki, Akihito Mikamo, Akira Fujita, Tamami Nakamura, Masaya Takahashi, Bungo Shirasawa, Kimikazu Hamano, Effect of autotransfusion using intraoperative predonation on coagulopathy after thoracic aortic surgery with hypothermic circulatory arrest, The 24th Annual Meeting of Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (ASCVTS), 2016

鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、中村玉美、高橋雅弥、濱野公一、大動脈弁狭窄症(AS)に対する治療成績 重症 AS 治療における Transcatheter Aortic Valve Implantation (TAVI) の役割、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016 年

鈴木 亮、美甘章仁、藤田 陽、中村玉美、高橋雅弥、白澤文吾、濱野公一、Transcatheter Aortic Valve Replacement (TAVR)後の Left ventricular mass index (LVMI)の変化、第 59 回関西胸部外科学会学術集会、2016 年

鈴木 亮、美甘章仁、藤田 陽、高橋雅弥、濱野公一、三尖弁閉鎖不全症に対する三尖弁輪形成術- flexible ring vs rigid ring、第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：濱野 公一
ローマ字氏名：HAMANO, Kimikazu
所属研究機関名：山口大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：60263787

研究分担者氏名：上野 耕司
ローマ字氏名：UENO, Koji
所属研究機関名：山口大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：30736070

(2)研究協力者

研究協力者氏名：溝口 高弘
ローマ字氏名：MIZOGUCHI, Takahiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。