

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20359

研究課題名(和文) 伸展培養法を応用した、より迅速なGreen型培養表皮シート作成の試み

研究課題名(英文) Modified engineering epidermal sheet adding mechanical stretch

研究代表者

徳山 英二郎 (Tokuyama, Eijiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90379785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、培養表皮作成過程を通して、進展刺激による表皮角化細胞の速やかなspreadingが得られ、その結果、より早期の培養表皮シート作成が達成される可能性が示唆された。一方、培養表皮シートの組織像ではコントロール群との間に、明らかな構造的差異は見いだせず、伸展刺激が最終的に組織像、および最終目標である生体への移植成績に影響を及ぼすかについては明らかにすることができなかった。動物実験においては、両群の差より移植手技による部分が大きいと考えられるため、手技を改良し全体の生着率を向上させることで、進展刺激付加した表皮培養シートの優位性を明らかにしたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, rapid spreading of epidermal keratinocytes by progressive stimulation was obtained through cultivating epidermal making process, and as a result, it was suggested that the earlier production of cultured epidermal sheet could be achieved. On the other hand, in the histological image of the cultured epidermal sheet, no obvious structural difference was found with the control group, and it can not be clarified whether the stretch stimulation affects the histology of the tissue and the transplantation result to the living body.

研究分野：形成外科学

キーワード：進展培養 メカノメディスン 培養表皮

1. 研究開始当初の背景

一般的に熱傷範囲が広く深い重症熱傷においては、速やかな損傷組織の除去と分層植皮を主体とした自家皮膚移植による治療が行われる。しかし、熱傷が広範囲となると被覆を必要とする面積が増大するのに対し、逆比例して患部部位は減少するため、救命率の向上のためには十分な皮膚組織を調達することが一つの重要な課題であった。

これに対し Green らは 3T3 細胞を feeder としたヒト表皮細胞の培養手法 1) を応用し、重症熱傷患者に対する自家培養表皮移植治療を 1981 年に初めて報告した 2)。米国では、この自家培養表皮シートが「Epicel®」として製品化され、臨床使用されている。本邦でもようやく同様の Green 型培養表皮シート「ジェイス®」が薬事承認され、2009 年の保険収載以降、熱傷治療での使用が一気に加速することが期待された。

しかし、現状では培養表皮作成には 3~4 週間を要することから、培養表皮の完成を待たず救命のため数回の自家皮膚移植手術が行われることが多い。また、培養表皮シートは非常に脆弱であり、全層皮膚欠損層に対する単独での使用は困難で、原則として同種もしくは自家皮膚移植と併用する必要がある。この、作成期間と脆弱性が培養表皮治療の現在の課題といえる。

我々は、ヒト 3 次元培養全層皮膚に伸展刺激を加える事で表皮の重層化、角化が促進され、基底層の構造が改善することを世界で初めて報告した 3)。そこで、この伸展培養法の技術を応用することで、上記の課題を解決し、より迅速に、より強固な培養表皮が作成可能となるのではないかと考えるに至った。

参考文献

- 1) Green H, et al., (1975) *Cell*, 6, 331-344
- 2) O'connor NE, et al., (1981) *Lancet*, 1, 75-78
- 3) Tokuyama E, et al., (2015) *PLoS ONE*, journal.pone.0141989

2. 研究の目的

伸展培養を応用することで、迅速に強度の高い培養表皮の作成を可能とすることを目的とした。

そのため、green 型培養表皮に伸展刺激を加えて、その影響を解析し、また動物実験により、生着率を評価することとした。

3. 研究の方法

まず基本的な実験手技を示す。後述する (1)~(3) の実験では基本手技に即し、適宜細胞播種および培養条件や伸展刺激条件を変え実験を行った。

[基本・Green 型培養表皮シート作成]

培養表皮作成は専用シリコン製チャンバー (Menicon, Aichi, Japan) (図 1) で行う。

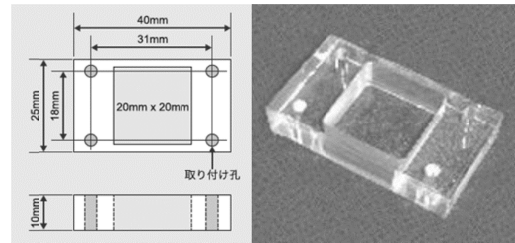


図 1 伸展培養チャンバー

Feeder としてマウス線維芽細胞 (3T3 Swiss Albino:RIKEN CELL BANK)、正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK:KURABO) を購入し、3T3 細胞は製品から 2-5 継代目、NHEK は 1-2 継代目のものを用いる。後に 3T3 Swiss Albino に対してより feeder として優れる 3T3-J2 (kerafast) を入手しこれを置き換えて実験を行った。

<feeder layer 作成> 3T3 細胞を 1.0×10^6 cells/cm² の密度で播種し、24 時間以上培養しチャンバーへの定着を確認後、マイトマイシン処理 (4 μg/ml 2hr) を行う

<表皮細胞播種> feeder 作成後のチャンバーへ NHEK を 1.0×10^4 cells/cm² で播種し 24 時間以上培養し定着させる

[基本・伸展刺激付加]

伸展刺激付加には伸展装置 (STB-140; STREX, Osaka, Japan) を用いた。NHEK 播種後定着を確認したチャンバーを装填し、ストレッチ刺激は [伸展 1 秒 30 秒保持 復帰 1 秒 30 秒保持のくり返し] に設定する。

[培養表皮シート回収]

チャンバー内に作成された表皮培養シートはディスペルゼ処理 (300PU/ml 37 40min) にて剥離させ、上側に濾紙を担体として付着させて、底面が露出する形で回収する。

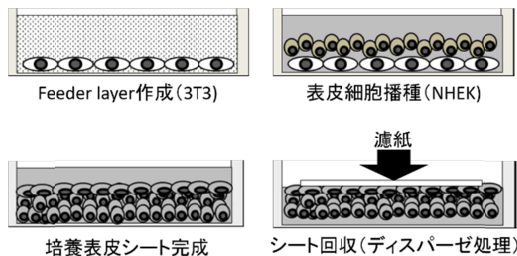


図 2 培養表皮作成の流れ

(1) 表皮細胞コロニー拡大速度の観察

培養初期 (伸展刺激開始後 2, 5 日目) における表皮細胞の spreading の評価を Rhodamine B 染色にてチャンバー上の上皮細胞を選択的に染色することで、表皮細胞の専有面積を測定し評価した。

(2) 光学顕微鏡による組織学的観察

表皮培養シート（伸展刺激開始後 1, 2, 3 週目）を回収しホルマリン固定し、パラフィン切片作成後、H.E.染色を行い、光学顕微鏡で観察し、表皮層の厚さ、基底層における基底細胞の細胞密度を計測した。

(3) ノードマウスへの移植、収縮率の測定

ヌードマウス（BALB/c-nu, charles river）の背部に 10×10mm の皮膚欠損を 2ヶ所作成し、作成した表皮培養シート 2種（伸展刺激なし 伸展刺激あり）を担体の濾紙ごと移植、周囲をナイロン糸で縫合固定する。

1) 生着率、収縮率の計測

移植後 1 週間で、表面のろ紙を除去し、生着の可否を確認後、

面積を計測する。移植後 2 週間/4 週間での面積を同様に計測

し、移植後 1 週間と比べ、どの程度収縮したかを計測する。

4. 研究成果

(1) 伸展刺激による表皮細胞の spreading への影響の評価

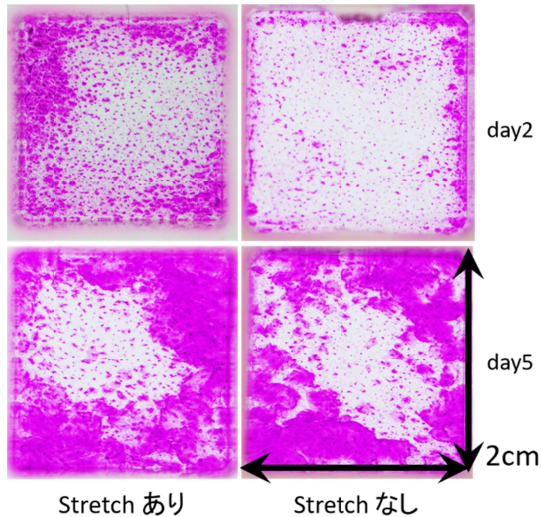


図 3-1 Rhodamin B 染色（培養初期）
右は伸展刺激開始後日数

上皮細胞を選択的に染色する Rhodamine B 染色を直接容器上で行い、染色された表皮細胞部分の面積を比較した。

シート状となる前の培養初期において、伸展刺激群では非伸展刺激群（以下コントロール群）に比較して、表皮細胞の速やかな spreading が認められた(n=3)(図 3-1)。

また、確認のため培養後期において同様に染色評価したところ、伸展刺激群、コントロール群共に表皮細胞は完全にチャンバー内

を占有しシートを形成していた。(図 3-2)

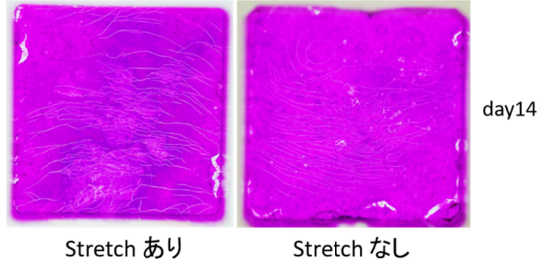


図 3-2 同（培養後期）

(2) 光学顕微鏡による組織学的観察 伸展刺激開始後 2 週および 3 週で培養表皮シートを回収し、H.E.染色を行った。(図 4)

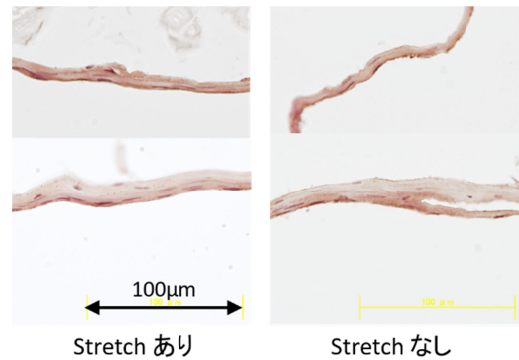


図 4 伸展刺激開始後 14 日目の組織像
(H.E.染色)

伸展刺激群、コントロール群ともに重層化した表皮構造の形成を認めた。

しかし、図 4 に示した様に、両群とも良好な重層化を認める部位と、薄く重層が不十分な部分とが混在し、一様な厚みのシート作成には至らなかった。

両群において 1 切片当たりの平均厚（全長の 5 均分点における平均厚に差を認めなかった (n=3)

(3) ノードマウスへの移植

免疫不全マウス BALB/nu (8 週齢) を用い、培養表皮の移植比較実験を行った。

移植片として伸展開始 10 日目の培養表皮シートを使用した。

まず移植時の状態を示す。

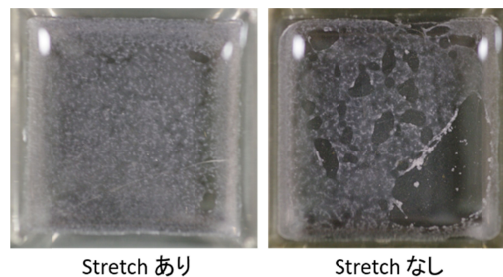


図 5-1 ディスパーゼ処理後の培養表皮シート
(伸展開始後 10 日)

図 5-1 に示す様に、ディスペルゼ処理後、濾紙に付けて回収する前の状態で、コントロール群はシートの破損が明らかであった。

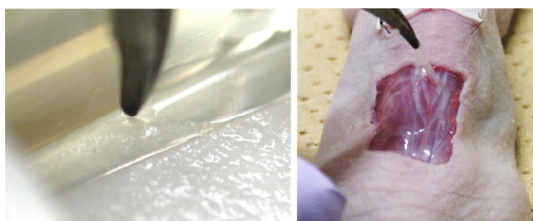


図 5-2 表皮培養シート（伸展あり）を把持したところ

対して、伸展刺激群においては比較的培養期間が短いにもかかわらず、図 5-2 に示した様に、かろうじてシートとして把持可能な程度には強度を得ることができた。

移植後 1 週で固定の濾紙を除去して創部を確認したところ、両群とも培養表皮の一部については生着の可能性が示唆されたものの、大部分は融解、脱落した。(図 6)

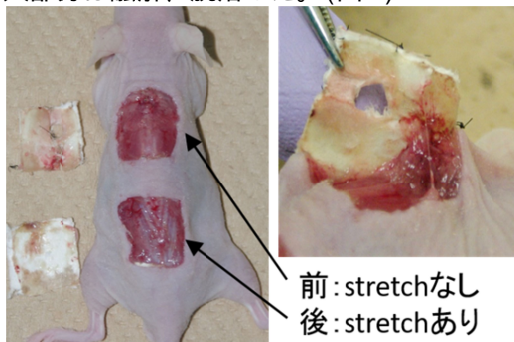


図 6 濾紙除去時の状態
上皮化は殆ど得られていない

培養表皮の生着が不十分であった原因としては、感染、マウスの免疫反応、固定不良、培養表皮自体の活性の他、移植先の皮膚欠損創の環境（脂肪、筋膜上、あるいは真皮様構造の必要性等）が関係していると思われる。

本研究においては、培養表皮作成過程を通して、伸展刺激による表皮角化細胞の速やかな spreading が得られ、その結果、より早期の培養表皮シート作成が達成される可能性が示唆された。

一方、培養表皮シートの組織像ではコントロール群との間に、明らかな構造的差異は見いだせておらず、伸展刺激が最終的に組織像、および最終目標である生体への移植成績に影響を及ぼすかについては明らかにすることができなかった。

動物実験においては、両群の差より移植手技による部分が大きいと考えられるため、手技を改良し全体の生着率を向上させることで、伸展刺激付加した表皮培養シートの優位性を明らかにしたいと考えている。

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)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

徳山英二郎 (TOKUYAMA EIJIRO)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90379785

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

木股敬裕 (KIMATA YOSHIHIRO)

杉山成史 (SUGIYAMA NARUSHI)