

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10759

研究課題名(和文) 積層化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 therapy for refractory cutaneous ulcers using multi-layered cell sheets

研究代表者

高橋 雅弥 (TAKAHASHI, Masaya)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：60634730

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)：難治性皮膚潰瘍に対する治療法として、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を開発した。積層細胞混合シートは従来の単層細胞混合シートに比べ、VEGF、HGF、TGF- β 1、CXCL-1、CXCL-2の産生量が高く、培養上清を用いたin vitro解析においても血管新生能や細胞遊走能が優れていた。マウス皮膚潰瘍モデルでの治療効果の検討では、創傷治癒早期において積層細胞混合シート治療群は無治療群に比べ、有意に高い創傷治癒率を示した。更に、血管内腔面積と微小血管密度は無治療群に比べ大幅に増加していた。本研究より、積層細胞混合シートは難治性皮膚潰瘍に対する有用な治療法となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物モデルにおいて単層細胞混合シート移植により一定の成果は得られたが、臨床応用へ向けては細胞シートの扱い易さの改善や治療効果の増強が必要であった。本研究で確立した積層細胞混合シートは、単層の細胞混合シートに比べ、厚みが増して安定した円形のシートとなった。さらに、積層細胞混合シートは創傷治癒に必要な成長因子やサイトカインを供給することにより血管新生と創傷治癒過程を促進し、治療効果を有することが示された。

研究成果の概要(英文)：We developed a multilayered mixed-cell sheet consisting of fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells as a treatment for refractory cutaneous ulcers. The concentration of secreted VEGF, HGF, TGF- β 1, CXCL-1, CXCL-2 in multilayered mixed-cell sheets was much higher than that in single-layered mixed-cell sheets. The supernatant in multilayered sheets enhanced angiogenic potency and fibroblast migration compared with single-layered mixed-cell sheets in an in vitro experiment. The wound healing rate in the multilayered mixed-cell sheet-treated group was higher compared with the no-treatment group (control) at the early stage of healing. Moreover, both vessel lumen area and microvessel density in tissues treated with multilayered sheets were significantly increased compared with tissues in the control group. These data suggest that multilayered sheets may be a promising therapeutic material for refractory cutaneous ulcers.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：細胞シート 難治性皮膚潰瘍 再生医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性皮膚潰瘍は、末梢動脈疾患を含む虚血性疾患、糖尿病、褥瘡および静脈不全によるうっ血などにより引き起こされ、それぞれ原因に応じた治療が行われている。閉塞性動脈硬化症、バージャー病、ブルートー症候群などの末梢動脈疾患は、世界中で2億人以上の罹患が報告されている。重症下肢虚血の最良の治療法は血管内治療やバイパス手術による血行再建術であるが、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、手術が成功しても局所の循環障害が残存した場合、皮膚潰瘍が難治化することがある。そのため、他に治療の選択肢のない重症末梢動脈疾患患者に対する新たな治療法として、側副血管の形成と血管新生を促進する血管新生促進療法の開発が望まれている。

血行再建が適応とならない重症下肢虚血患者を対象に、骨髄細胞移植による血管新生療法が試みられ、一定の効果が認められている。我々は、虚血組織での移植細胞の生存率を改善するために、「低酸素プレコンディショニング」という血管新生を促進する方法を考案した。我々は、治療の低侵襲化のために移植細胞種を骨髄細胞から末梢血単核球へ変更し、虚血下肢動物モデルにおいて、低酸素プレコンディショニング処理した末梢血単核球は微小血管密度と下肢の血流を改善することを報告した (Biochem Biophys Res Commun. 2014;443:370-5.)。

近年、移植部位での生着率を向上させる技術として細胞シートが開発され、様々な疾患モデルにおいて効果が認められている。難治性皮膚潰瘍の修復が不十分になる主な要因は、創傷領域での移植細胞や人工皮膚の保持が十分でないことである。そのため、我々は細胞シート技術を難治性皮膚潰瘍の治療に応用することを検討した。

通常の治癒プロセスは、成長因子、サイトカインケモカインを含む複雑なシグナル伝達ネットワークによって制御され、(1)炎症期、(2)増殖期、(3)成熟期の3つの重複するフェーズに分けられる。静脈性および糖尿病性下肢潰瘍などの難治性皮膚潰瘍では、成長因子の異常発現が慢性炎症を誘発し、創傷治癒過程を遅延させていることが報告されている。VEGF、TGF- β 1、およびPDGF-BBは、炎症期から組織修復段階(増殖期・成熟期)への移行に必要な因子である。末梢血単核球は正常な創傷治癒過程の炎症期に必要なTGF- β 1やPDGF-BBなどの増殖因子やインターロイキンを分泌することが報告されている。また、TGF- β 1およびPDGF-BBは、線維芽細胞におけるVEGFおよびコラーゲンmRNAの発現レベルを増加させる。そのため、我々は自家の線維芽細胞と、炎症期から組織修復段階への移行に必要な成長因子を分泌する末梢血単核球から成る細胞混合シートを開発し、マウスとラビットの動物モデルで皮膚潰瘍治療の有効性を報告してきた (Scientific Reports. 2016;6:28538.)。しかし、これまで報告してきた細胞シートは単層の細胞シートであるため、臨床応用に向けては、治療効果の増強と細胞シートの扱い易さの改良が必要である。本研究では、独自の方法で細胞シートを積層化する方法を確立し、積層細胞混合シートの難治性皮膚潰瘍に対する治療効果を、マウスを用いた実験で検討した。

2. 研究の目的

細胞シートを積層化する方法を確立し、難治性皮膚潰瘍モデルマウスでその積層化された細胞シートの治療効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞シートの作製

線維芽細胞はC57BL/6マウスの尾先端約1cmを採取し、コラゲナーゼ(Wako)処理後、単離・培養した。末梢血単核球はLympholyte-M (CedarLane Laboratories)を用いてマウス末梢血から比重遠心法で分離した。単層細胞混合シート(線維芽細胞 1.25×10^5 個/wellと末梢血単核球 2.0×10^6 個/well; single-layered sheets)は温度応答性細胞培養皿であるUpCell 24-well plates (Cell Seed)を用いて培養した。積層線維芽細胞シート(線維芽細胞 5×10^5 個/wellと末梢血単核球無し; Fibroblast sheets)と積層細胞混合シート(線維芽細胞 5×10^5 個/wellと末梢血単核球 2.0×10^6 個/well; multilayered sheets)は通常培養皿の24-well plate (IWAKI)を用いて培養した。これらの3種類の細胞シートは、2日間通常酸素条件下(37 $^{\circ}$ C、20% O $_2$ 、5% CO $_2$)で培養後、1日間低酸素条件下(33 $^{\circ}$ C、2% O $_2$ 、5% CO $_2$)で培養した。培養後、単層細胞混合シートは温度応答性培養皿を室温下に静置してシート状に剥離し、また、積層線維芽細胞シートと積層細胞混合シートはディスペーゼ(10 PU/mL)を用いてシート状に剥離した。

(2) ELISAによる成長因子・サイトカイン測定

各細胞シートを通常培養皿の24-well plateを用いて、上記(2)の培養条件で3日間培養して得られた培養上清中の成長因子・サイトカインを測定した。VEGF、HGF、TGF- β 1、CXCL-1、CXCL-2、IL-6の測定は、Mouse Quantikine immunoassay kit (R&D Systems)を用いた。

(3) Tube formation アッセイ

マトリゲルコーティング(Corning)された96-well plateにHUVEC(2×10^4 個/well)を播種した。各細胞シートの培養上清100 μ Lを各wellに添加し、12時間後に細胞の様子を観察した。新鮮培地をコントロールとして使用した。

(4) Migration アッセイ

24-well plate に線維芽細胞を播種しコンフルエントになるよう培養した。200 μ L チップでウェルをスクラッチして細胞間隙を作製した。各細胞シートの培養上清を各 well に加え、培養開始直後 (0 時間後) と 18 時間後の状態を BZ-X710 オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence) の様子を観察した。

(5) TUNEL アッセイ

Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labelling (TUNEL)法によりアポトーシスを検出した。上記(2)の方法で作製した積層細胞混合シート及び単層細胞混合シートを生ハムに貼付し、10%ホルマリン中性緩衝液で固定後、パラフィン包埋切片を作製した。アポトーシスの検出は In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) を用いて、蛍光顕微鏡で観察した。

(6) 潰瘍モデルに対する細胞シート移植の治療効果

ストレプトゾトシン投与で糖尿病を誘発した 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 (n=9)、単層細胞混合シート群 (n=10)、積層線維芽細胞シート群 (n=10)、積層細胞混合シート群 (n=9) で治療効果を評価した。創傷治癒は day0、day7、day14 で評価した。

(7) 組織学的解析

治療後のマウスの皮膚組織を採取し、10%ホルマリン中性緩衝液で固定後、パラフィン包埋切片を作製し、HE 染色と蛍光免疫染色に用いた。免疫染色では、脱パラフィンした切片は、Target Retrieval Solution (DAKO) で抗原賦活化後、ブロッキング処理 (DAKO) した。一次抗体として、抗 GFP 抗体 (MBL) 及び抗 CD31 抗体 (Abcam) を、二次抗体として抗 rabbit IgG H&L (DyLight550, Abcam) を用いた。

4. 研究成果

(1) 積層細胞混合シートの作製法の検討

我々がこれまでに報告した単層細胞混合シートは、線維芽細胞 1.25×10^5 個と末梢血単核球 2.0×10^6 個を温度応答性細胞培養皿 UpCell 24-well plates に播種して作製している。末梢血単核球の細胞数は単層細胞混合シートで用いる細胞数と同じ 2.0×10^6 個として、播種可能な最大の線維芽細胞数 (1.25, 2.5, 5.0, 10×10^5 個/well) を検討した。UpCell では 1.25×10^5 個以上の線維芽細胞を播種すると、細胞混合シートは培養器内で自然に剥離し、意図的に細胞シートを剥離することができなかった。そのため、培養皿を通常の 24-well plate に変更し、同様の検討を行った。 10×10^5 個の線維芽細胞では細胞は意図せずに勝手に細胞がシート状に剥離したが、線維芽細胞数を 2×10^5 個および 5×10^5 個では意図的に細胞をシート状に剥離することが可能であった。次に、培養上清の VEGF 濃度を比較したところ、 5×10^5 個の積層細胞混合シートは他のシートに比べて最も高い結果となった (図 1A)。plate のウェルから剥離した細胞シートの形を比較すると、 5×10^5 個の線維芽細胞で作製した積層細胞混合シートは単層細胞混合シートより大きい細胞シートであることが肉眼的に観察された (図 1B)。単層細胞混合シートおよび積層細胞混合シートの厚さを HE 染色で観察したところ、積層細胞混合シートは単層細胞混合シートよりも厚さを有する細胞シートであった (図 1C、D)。積層細胞混合シート内に末梢血単核球が取り込まれているか否かを、GFP マウスの末梢血単核球を用いて検討したところ、免疫染色により細胞シート内に GFP 陽性の末梢血単核球を検出した (図 1E)。以上より、 5×10^5 個の線維芽細胞と 2×10^6 個の末梢血単核球を通常の 24-well plate に播種して作製したものを積層細胞混合シート

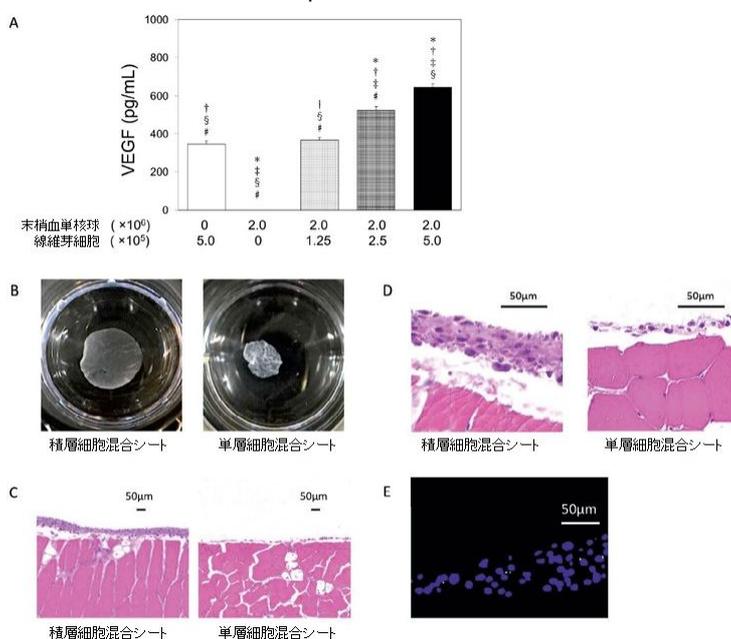


図1 線維芽細胞と末梢血単核球からなる積層細胞混合シート

として、以下の実験に用いた。

(2) 積層細胞混合シートは成長因子とサイトカイン分泌を促進する

培養上清中の VEGF、HGF、TGF-beta1、CXCL-1、CXCL-2、IL-6 の濃度を ELISA 法で測定した(図2)。積層細胞混合シートは単層細胞混合シートと積層線維芽細胞シートよりも、IL-6 を除くすべての成長因子・サイトカインで有意に高値を示した。IL-6 の濃度は積層細胞混合シートと単層細胞混合シートで同等であった。

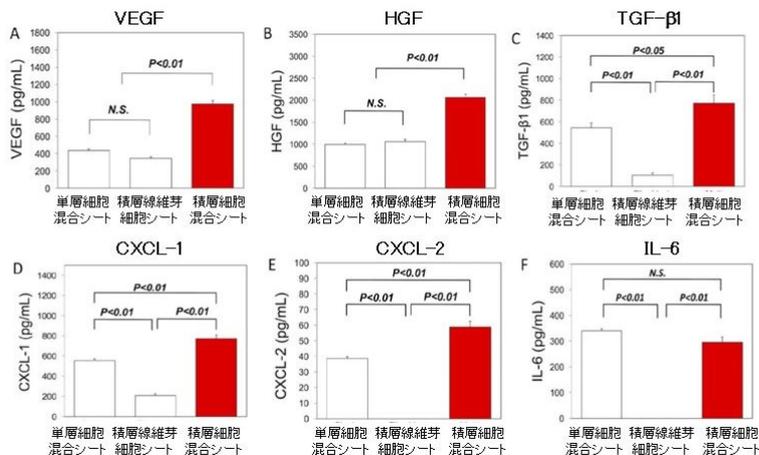


図2 積層細胞混合シートが分泌する成長因子・サイトカイン濃度

(3) 積層細胞混合シートの血管新生能

積層細胞混合シートの培養上清は、新鮮培地よりも tube junction の数が多く、有意に tube formation を促進した(図3A)。積層細胞混合シートから分泌された VEGF が血管新生を促進していることが示唆された。

(4) 積層細胞混合シートの細胞遊走能

積層細胞混合シートの培養上清を加えた線維芽細胞は、単層細胞混合シートや積層線維芽細胞シートの培養上清を加えた線維芽細胞よりも、細胞の遊走能が有意に促進した(図3B)。

(5) 積層細胞混合シートの細胞生存率

積層細胞混合シートにおける細胞生存率を評価するため、積層細胞混合シートと単層細胞混合シートを構成する細胞のアポトーシスを TUNEL 染色で検討した(図3C)。単層細胞混合シートに比べ、積層細胞混合シートは線維芽細胞の数が多いが、TUNEL 陽性細胞の割合は同等であった。

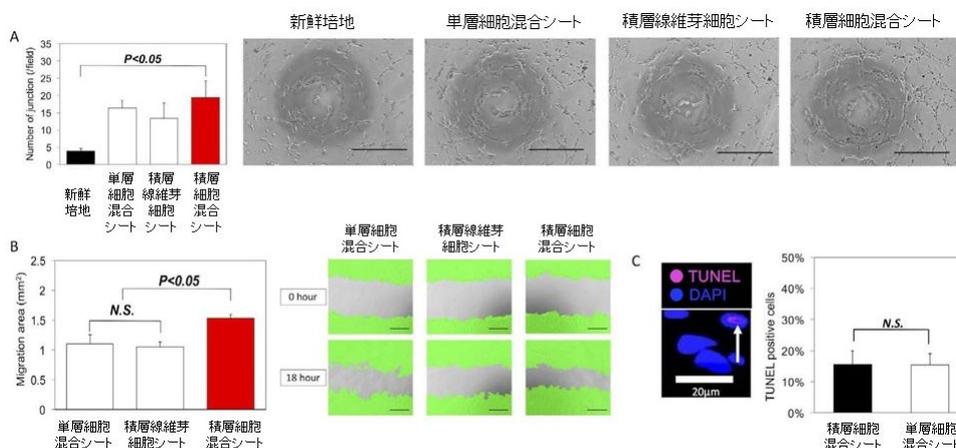


図3 積層細胞混合シートの培養上清を用いた血管新生能と細胞遊走能

(6) マウス皮膚潰瘍モデルにおける積層細胞混合シートの治療効果

積層細胞混合シートの皮膚潰瘍に対する治療効果の検証するため、糖尿病マウスの背部に皮膚全層欠損を作製し、細胞シートを移植した。単層細胞混合シート移植群と積層細胞混合シート移植群では、治療開始 7 日目において無治療のコントロール群よりも有意に高い創傷治癒率を示した。治療開始 14 日目において細胞シートを用いて治療した 3 群は無治療のコントロール群よりも有意に高い創傷治癒率を示した。治療開始 7 日目、14 日目において、シート移植 3 群間における有意差は認めなかった(図4)。全てのマウスにおいて治療

開始後 21 日目までに創傷治癒が得られた。治療開始 21 日目の組織学的解析において、HE 染色像では、無治療のコントロール群と細胞シート治療 3 群で組織再生に明らかな違いを認めた (図 5A)。細胞シート治療群では治癒組織が正常皮膚様であるのに対して、コントロール群では炎症細胞が多く浸潤しており、異常な組織形態を示していた。CD31 抗体で血管内皮細胞を免疫染色したところ、積層細胞混合シート移植群では、他群よりも内腔面積が大きく、小血管密度も高い結果であった (図 5B,C)。

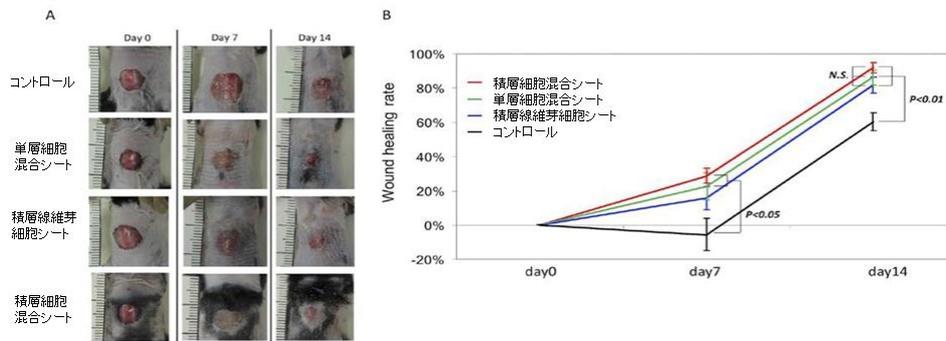


図4 積層細胞混合シートの治療効果

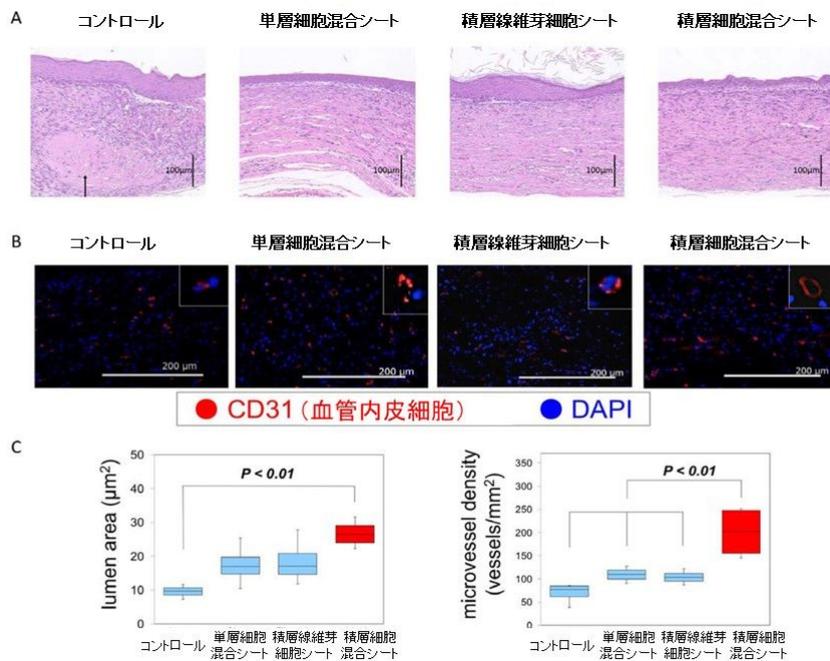


図5 細胞シート治療後の治癒組織における検討

本研究から、積層細胞混合シートは創傷治癒に必要な成長因子やサイトカインを供給することにより血管新生と創傷治癒過程を促進することが示された。積層細胞混合シートは難治性皮膚潰瘍に対する有用な治療法となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizoguchi Takahiro, Ueno Koji, Takeuchi Yuriko, Samura Makoto, Suzuki Ryo, Murata Tomoaki, Hosoyama Tohru, Morikage Noriyasu, Hamano Kimikazu	4. 巻 47
2. 論文標題 Treatment of Cutaneous Ulcers with Multilayered Mixed Sheets of Autologous Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 201 ~ 211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000489767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	上野 耕司 (UENO Koji) (30736070)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	