

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592291

研究課題名（和文） 組織工学的手法を用いた癒痕組織の改善促進に関する研究

研究課題名（英文） The research for scar tissue improvement  
using tissue engineering methods

研究代表者

西口 浩明 (NISHIGUCHI HIROAKI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00335043

研究成果の概要：

血管内皮前駆細胞が MMP-2/-9 分泌により、癒痕形成の主体である筋線維芽細胞のアポトーシスを誘導し、癒痕組織を改善するかの検討を行った。血管内皮前駆細胞からの MMP-2/-9 の分泌は確認できたものの、in vitro では筋線維芽細胞のアポトーシスを認めず、また in vivo でも癒痕組織自体の質も改善してはいなかった。これらの結果より、血管内皮前駆細胞は癒痕組織改善に寄与しないと考えた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：再生医療、歯学、移植再生医療、癒痕、筋上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

癒痕および癒痕拘縮は機能的・精神的問題となるが、手術や薬剤のみで制御することが困難であり、画期的な治療法の開発が望まれている。現在までに、癒痕組織形成には筋線維芽細胞の関与が示唆されている。同細胞は平滑筋細胞と線維芽細胞の性質を併せ持ち、自らフィブロネクチンなどの細胞外基質を豊富に産生することにより、組織の収縮が促進するように働くと考えられている。正常な治癒過程では、肉芽形成期に同細胞は細胞死

を起こすが、癒痕組織ではアポトーシスを起こさず過剰に残存するために組織の拘縮を起こすと考えられている。

近年、血管内皮前駆細胞が細胞外基質分解酵素matrix metalloproteinase (MMP)-2/-9を分泌することが報告された。MMPはすでに形成されたコラーゲンなどの細胞外基質に働きかけて分解するのみでなく、筋線維芽細胞のアポトーシスを促進し、さらに筋線維芽細胞から分泌される細胞外器質の一つであるフィブロネクチンの合成阻害を起こすこ

とが報告されている。すでに形成された細胞外基質の分解のみでなく、癒痕形成に主体的な役割を果たす筋線維芽細胞のアポトーシスを促進することで、これらの細胞が癒痕拘縮の抑制に働く可能性が期待されるが、これらに関する報告はほとんどない

## 2. 研究の目的

本研究の目的は血管内皮前駆細胞など幹細胞と線維芽細胞が筋線維芽細胞に与える影響の解明することである。具体的には、各細胞からのMMPの分泌の解析と、癒痕形成の主体とされる筋線維芽細胞のアポトーシス誘導の可能性について検討する。

癒痕形成の主な担い手と考えられる筋線維芽細胞には、MMPがアポトーシスの誘導など抑制的に作用することが知られている。筋線維芽細胞は創傷治癒には必須であるが、必要以上に残存することが癒痕の一つの要因と考えられる。一部の培養細胞からはMMPを分泌されることが報告されている。したがって、培養細胞を創傷部位に注入することで、筋線維芽細胞へのアポトーシスの誘導などによる癒痕抑制効果が期待できると考えている。そこで、培養細胞による筋線維芽細胞のアポトーシス誘導の可能性について検討するために、ヒト血管内皮前駆細胞、ヒト骨髄由来幹細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、口腔粘膜線維芽細胞からのMMPの分泌を測定した。血管内皮前駆細胞が分泌するMMP-2/-9が既存の癒痕部位に作用し、豊富に残存する細胞外基質を分解することが期待される。一方、筋線維芽細胞のアポトーシスを促進し癒痕拘縮を抑制する可能性が考えられる。

初年度には筋線維芽細胞の培養とキャラクターライゼーションを行った。これまでの報告ではヒト胎児肺由来のセルラインであるMRC-5に形質転換増殖因子 Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1を添加させることで、筋線維芽細胞へと分化誘導可能であることが知られている。実際に平滑筋マーカーの分析により、MRC-5から筋線維芽細胞への分化誘導を確認した。次に培養細胞によるMMPの分泌を、ELISA、RT-PCRを用いて解析し、各種細胞について比較検討を行った。特に、血管内皮前駆細胞で分泌されているMMP-2/-9の発現レベルについて血管内皮前駆細胞を含めた細胞（対照細胞）を用いて定量化し、評価した。これらMMPは、筋線維芽細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。MRC-5との共培養を行い、アポトーシスの評

価を行った。

次年度では、実際の癒痕収縮に近いモデルとして、コラーゲンゲルの収縮モデルを用いて、細胞の影響を比較検討した。移植された血管内皮前駆細胞は創傷治癒の遷延部位に対し血流を改善することで、癒痕組織の形成と拘縮の抑制効果が予想される。ヌードマウスに皮膚移植を行い、線維芽細胞に起因する組織の拘縮に対する移植細胞の影響について検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養上清中のMMP-2/-9量測定

ヒト血管内皮前駆細胞、ヒト骨髄由来幹細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、口腔粘膜線維芽細胞からのMMPの分泌を測定した。これらの細胞を10%血清入りDMEMにて培養し、コンフルエントとした後、無血清培地に交換し培養を続けた。24, 48, 72時間後に培養上清を回収し、培地中に分泌されたMMP-2/-9をELISA法にて定量化した。

### (2) 筋線維芽細胞によるアポトーシス評価系の作製

筋線維芽細胞を10%血清入りDMEMにて培養し、さらに同時に対照とする細胞（ヒト血管内皮前駆細胞、ヒト骨髄由来幹細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、口腔粘膜線維芽細胞）をそれぞれcell culture insert上で培養する。72時間後に筋線維芽細胞をTUNEL染色にてアポトーシスした同細胞を評価した。

### (3) ゲル培養を用いた収縮評価

生体により近似した環境下で筋線維芽細胞のアポトーシスを評価するために、コラーゲンゲル中で筋線維芽細胞を培養し、対照細胞（ヒト血管内皮前駆細胞、ヒト骨髄由来幹細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、口腔粘膜線維芽細胞）と共培養する。対照細胞群と共培養後のゲル収縮の割合について検討した。

### (4) 癒痕モデルを利用した細胞注入による拘縮改善評価

実際の創の治癒過程に対する移植細胞の影響について検討を行った。癒痕モデルとしては、ヌードマウス背部皮膚に皮膚パンチを用いて皮下組織に到達する皮膚欠損創を作成した。皮膚欠損部および周囲に培養筋線維芽細胞を注入した。創の治癒速度については、術後経時的に写真撮影を行い、画像解析ソフトウェアを用いて定量化し、評価した。

培養した対照細胞（ヒト血管内皮前駆細胞、ヒト骨髄由来幹細胞、ヒト口腔粘膜、皮膚由来線維芽細胞）を、上記のようなヌードマウス背部皮下に作成した癒痕部位に注入した。注入部位をあらかじめ墨汁にてマーキン

グしておくことで、正確に移植部位を同定することができる。移植後 1、2 週にて標本を作製し、移植した対象細胞が癒痕組織における筋線維芽細胞のアポトーシスに影響を与えているかどうか検討を行った。評価方法は細胞注入した癒痕部位を摘出し、抗  $\alpha$ -SMA 抗体にて筋線維芽細胞を染色した。また、TUNEL 染色法を行い、写真撮影後、NIH イメージを用いてアポトーシスを起こした筋線維芽細胞の細胞数を定量化し、評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 培養上清中の MMP-2/-9 量測定

MMP-2 は各細胞群で 4~5 ng/ml/well 分泌が認められたが、有意差は認めなかった。

MMP-9 はヒト骨髄由来幹細胞からの分泌はほとんど認められなかったものの、他の 3 種類の細胞は 1~10ng/ml/well の発現を認めた (図 1)。

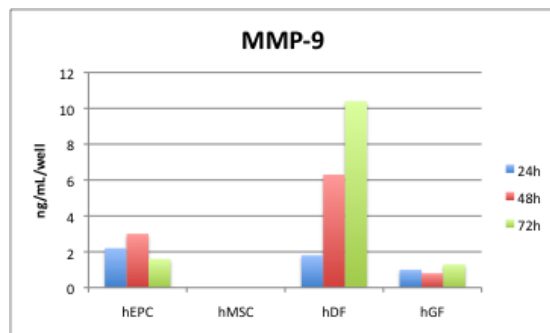


図 1 MMP-9 の分泌量

hEPC: ヒト血管内皮前駆細胞、hMSC: ヒト骨髄由来幹細胞、hDF: ヒト口腔粘膜、hGF 皮膚由来線維芽細胞

##### (2) 筋線維芽細胞によるアポトーシス評価系の作製

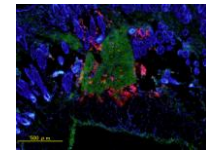
MRC-5 を 10% 血清入り DMEM にて培養したところ、RT-PCR にて desmin 陰性、 $\alpha$ -SMA および vimentin 陽性であり、筋線維芽細胞に分化していた。さらに同時に対照とする細胞 (ヒト血管内皮前駆細胞、ヒト骨髄由来幹細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、口腔粘膜線維芽細胞) をそれぞれカルチャーインサート上で培養し、共培養が可能であることを確認した。この条件下で TUNEL 染色を行ったが、各対照細胞で筋線維芽細胞のアポトーシスは認めなかった。

##### (3) ゲル培養を用いた収縮評価

コラーゲングル中で培養した筋線維芽細胞と対照細胞との共培養では、各群におけるコラーゲングル収縮に有意差を認めなかった。

##### (4) 癒痕モデルを利用した細胞注入による拘縮改善評価

ヌードマウスの皮膚欠損は 2 週間ほどで完全に上皮化した。2 週間後の標本では PKH26



にて標識化された筋線維芽細胞が確認可能であった

図 2 創作成 2 週間後の標本。赤が筋線維芽細胞

(図 2)。

完全に上皮化した後に、癒痕部に対照細胞を注入し、標本を作製した。全ての群で筋線維芽細胞は確認されたが、TUNEL 染色では陽性細胞が確認できず、いずれの群でも筋線維芽細胞のアポトーシスは認めなかった。

#### 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 1 件)

- ① Ebisawa K, Kato R, Sugimura T, Akimichi H, Katada T, Narita Y, Kagami H, Ueda M. The Expression Profile of Anti-aging Related Genes in Dermal and Gingival Fibroblast. Annals of Nutrition and Metabolism 51, p409, 2007, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ebsiawa K Cell therapy for facial anti-aging using cultured autologous gingival fibroblasts 2008 Annual Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asian Pacific Region 2008. 11. 7 Taipei
- ② 蛭沢克己、加藤竜司、杉村友隆、秋道宏美、堅田智久、成田裕司、各務秀明、上田実 線維芽細胞を用いた細胞療法における抗加齢因子の発現 第 7 回日本抗加齢医学会総会 2007. 7. 21 京都
- ③ 各務秀明、本田雅規、山田陽一、水野裕和、上田実 体性幹細胞の分化誘導と口腔組織再生への応用 第 61 回日本口腔科学会総会 2007. 4. 19 神戸

[図書] (計 3 件)

- ① 各務秀明 南山堂 再生医療と美容 2007 年 30-40
- ② 蛭沢克己 南山堂 再生医療と美容 2007 年 43-52
- ③ 加藤竜司、蛭沢克己、各務秀明 クイんテ

ッセンス出版社 インプラントと再生医療  
2007年 170-180

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：皮膚組織改善材およびその製造方法  
発明者：蛭沢克己、加藤竜司、各務秀明、上田実  
権利者：名古屋大学  
種類：特許  
番号：特許出願2008-528689  
出願年月日：2008.6.28  
国内外の別：国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

西口 浩明 (NISHIGUCHI HIROAKI)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00335043

(2)研究分担者

蛭沢 克己 (EBISAWA KATSUMI)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20397459

各務 秀明 (KAGAMI HIDEAKI)  
東京大学・医科学研究所・客員准教授  
研究者番号：80242866