

令和 6 年 4 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08867

研究課題名(和文) 静脈性難治性皮膚潰瘍に対する自家細胞シート移植の成績と患者の細胞増殖能との関係

研究課題名(英文) Relationship analysis of autologous fibroblasts and autologous serum in treatment outcomes of autologous cell sheet transplantation

研究代表者

末廣 晃太郎 (SUEHIRO, Kotaro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10569312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：難治性皮膚患者由来の線維芽細胞を解析したところ、細胞増殖能の差はなかった。全ての患者由来線維芽細胞は、細胞表面抗原分子であるCD44、CD73、CD90を発現していた。臨床研究時に、高いVEGF分泌能を示した自己細胞シートを構成した線維芽細胞は、低いVEGF分泌能を示した自己細胞シートを構成した線維芽細胞と比べて、VEGF、コラーゲンI、コラーゲンIIIの発現レベルが高い結果を得た。患者由来の血清をサイトカインアレイで解析したところ、細胞の特性と関連する因子を特定することは出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞移植による再生医療において、患者由来の細胞を移植する自家細胞移植の課題は、患者の細胞が増殖しないことがあるというものである。また、自家細胞が増殖しても、質の高い細胞を得ることが出来ない為に、治療効果が限定的であるということも考えられている。今回の研究では、臨床研究時に高いVEGF分泌能を示した細胞シートを構成していた線維芽細胞は、VEGF、コラーゲンI、コラーゲンIIIのmRNA発現が高い結果となった。患者由来の血清をサイトカインアレイで解析したところ、今回の解析からは、患者から得られる細胞の質と関連する因子を特定するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：There was no difference in cell proliferation ability in fibroblasts obtained from patients with refractory skin ulcers. CD44, CD73 and CD90 were expressed in all autologous fibroblasts. Expression level of VEGF collagen I and collagen III mRNAs were higher in autologous fibroblasts which composed autologous cell sheets with high secretion ability of VEGF than with low secretion ability of VEGF in clinical research. Although autologous serum was carried out using cytokine, it was not possible to obtain factors related to cell characteristics.

研究分野：難治性皮膚潰瘍治療

キーワード：自家細胞 細胞シート 難治性皮膚潰瘍

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者が所属する研究室では、難治性皮膚潰瘍に対して、末梢血単核球と線維芽細胞を混合培養して作製した細胞混合シート移植の治療効果を動物モデルで検証し、2018年から再生医療等安全性確保法下での臨床研究として、皮膚潰瘍が発症して6ヵ月以上、通常の治療を実施しても治癒しない静脈性に起因する難治性皮膚潰瘍の患者6名に対して、細胞混合シート移植を開始した(研究名称:難治性皮膚潰瘍に対する培養ヒト自己細胞混合シートを用いた移植治療に関する臨床試験(第相試験)臨床研究実施計画番号:jRCTb060190034)。

線維芽細胞は、歯科口腔外科で、患者の口腔内組織を採取し、その組織から線維芽細胞を単離し、自己血清で3~4週間培養することで、細胞シート作製に必要な細胞数の確保を試みた。末梢血単核球は、アフレーシスにより、患者から採取した。そして、線維芽細胞と末梢血単核球を混合培養して、細胞混合シートを作製し、細胞混合シートが培養液中に分泌したVEGFを測定し、基準値以上のVEGF濃度を超えた細胞混合シートを患部に移植するプロトコルで臨床研究を実施した。

臨床研究に登録した6名の患者において、3名の患者(No1、No2、No3)には細胞混合シートを移植したが、残りの3名の患者(No4、No5、No6)への細胞混合シート移植は中止となった。

細胞混合シート移植が中止となった3名の理由は以下である。

患者1名(No4):口腔内組織から線維芽細胞が得られなかった為

患者2名(No5、No6):細胞混合シートが分泌するVEGF濃度が基準値未満であった

研究代表者が所属する研究室では、自家細胞移植による再生医療で課題とされている、患者の細胞が増殖しない症例に直面したことは、細胞が増殖しない理由、および、組織採取前に指標となるマーカーのようなものはないかと考えるきっかけとなった。

### 2. 研究の目的

本研究では、臨床研究時に患者から単離・培養し、細胞混合シート作製時に余り、凍結保存していた線維芽細胞、および、全ての患者の自己血清を解析することで、細胞混合シート移植の治療効果の高かった患者で特徴的な何らかのマーカー等を得ることを目的として研究を実施した。

### 3. 研究の方法

本研究は、再生医療等安全性確保法下での臨床研究(研究名称:難治性皮膚潰瘍に対する培養ヒト自己細胞混合シートを用いた移植治療に関する臨床試験(第相試験)臨床研究実施計画番号:jRCTb060190034)として実施した時に、凍結保存していた患者由来の線維芽細胞および患者由来の自己血清を使用した。この臨床研究時に、患者に対して、余剰となった線維芽細胞および自己血清は、2次利用する可能性があることを説明し、同意を得ていた。患者由来線維芽細胞および自己血清を2次利用するために、臨床研究(研究名称:細胞混合シート研究で得た患者の血清および細胞の機能解析、管理番号:2021-005)を立ち上げて、本研究を実施した。

#### (1) 線維芽細胞の増殖能の比較

臨床研究時に線維芽細胞はP2で凍結保存していた為、解凍して直後に細胞生存率を測定し、10 cm dishに線維芽細胞を播種して培養を行った。数日培養後、10 cm dishから線維芽細胞P3を剥離後、細胞生存率を測定し、倍加時間を計算した。

#### (2) 線維芽細胞の細胞表面抗原解析

CD44、CD73、CD99、CD105、CD166、CD34、CD45の発現をフローサイトメトリーで解析した。

臨床研究時に細胞混合シートを移植した患者3名の線維芽細胞3株の中で、1株(No3)は細胞増殖が遅くなった為、本解析からは除外した。そのため、本解析には、臨床研究時に細胞混合シートを移植した患者2名の線維芽細胞2株(No1とNo2)および、細胞混合シート移植が中止となった患者2名(No5とNo6)の線維芽細胞2株を使用して細胞表面抗原解析を行った。

#### (3) 線維芽細胞におけるVEGF、Collagen I、Collagen IIIのqPCR解析

線維芽細胞4株(No1、No2、No5、No6)からtotal RNAを抽出し、cDNAを作製後、qPCRで、VEGF、Collagen I、Collagen IIIおよびACTBの発現レベルを解析した。インターナルコントロールであるACTBを1にしたときの各遺伝子の値をグラフ化した。

#### (4) 自己血清のサイトカインアレイ解析

患者6名の自己血清を使用して、サイトカインアレイを実施した(R&D社)。

#### 4. 研究成果

##### (1) 線維芽細胞の増殖能の比較

臨床研究時に、細胞混合シートを移植出来た患者、および、移植を中止した患者の線維芽細胞の倍加時間には特徴はなかった。

今回測定した線維芽細胞の倍加時間は、51 時間～98 時間であった。

##### (2) 線維芽細胞の細胞表面抗原解析

表 1 は、線維芽細胞 4 株に対して実施した細胞表面抗原解析の結果を示した。CD44、CD73、CD90 は、線維芽細胞株 4 株における陽性率は 99%以上であった。線維芽細胞 4 株における CD105 の陽性率は、27～48%であった。線維芽細胞 4 株における CD166 の陽性率は、62～86%であった。線維芽細胞 4 株において、CD34 および CD45 が陽性の細胞は観察されなかった。

今回解析した細胞表面抗原の中から、臨床研究時に細胞混合シートを移植した患者 2 名 (No1 と No2) および、細胞混合シート移植が中止となった患者 2 名 (No5 と No6) の線維芽細胞に特徴的な細胞表面抗原分子は得られなかった。

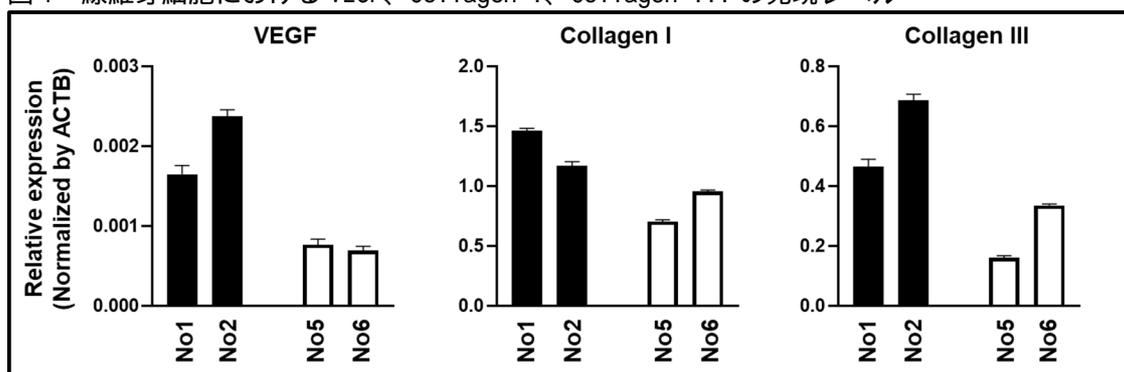
表 1 細胞表面抗原解析の結果

	No1	No2	No5	No6
CD44	99.1	99.6	99.5	99.3
CD73	99.2	99.5	99.5	99.3
CD90	99.2	99.7	99.6	99.4
CD105	35.4	48.1	27.8	31.9
CD166	77.3	62.3	82.7	86.2
CD34	0	0	0	0
CD45	0	0	0	0

##### (3) 線維芽細胞における VEGF、Collagen I、Collagen III の qPCR 解析

図 1 は、臨床研究時に細胞混合シートを移植した患者 2 名の線維芽細胞 2 株 (No1 と No2、黒色バー) および、細胞混合シート移植が中止となった患者 2 名の線維芽細胞 2 株 (No5 と No6、白色バー) における VEGF、Collagen I、Collagen III の mRNA の発現レベルを解析した結果を示した。これらの結果は、臨床研究時に細胞混合シートを移植した患者 2 名の線維芽細胞 2 株は、細胞混合シート移植が中止となった患者 2 名の線維芽細胞 2 株よりも、VEGF、Collagen I、Collagen III の発現レベルが高い結果であったことから、患者由来の細胞には、質としてのバラツキがあり、そのバラツキが移植細胞の品質に影響を与えることを示唆する結果であると考えられた。

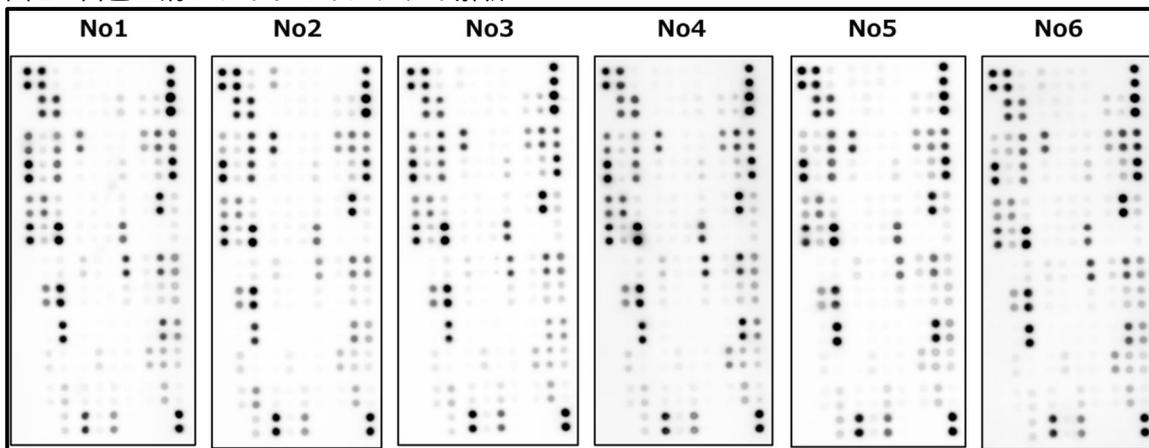
図 1 線維芽細胞における VEGF、Collagen I、Collagen III の発現レベル



##### (4) 自己血清のサイトカインアレイ解析

図 2 は、実施したサイトカインアレイのメンブレンを解析した結果を示した。反応の濃淡を数値化して解析したが、臨床研究時に細胞混合シートを移植した患者 3 名 (No1、No2、No3) の自己血清、および、細胞混合シート移植が中止となった患者 3 名 (No4、No5、No6) の自己血清に含まれる因子において、違いを示す因子は特定することが出来なかった。

図2 自己血清のサイトカインアレイ解析



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suehiro Kotaro, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Nagase Takashi, Takeuchi Yuriko, Mizoguchi Takahiro, Ike Soichi, Suzuki Ryo, Hamano Kimikazu	4. 巻 37
2. 論文標題 Effects of leg compression and calf muscle contraction by active ankle motion on venous hemodynamics in sitting individuals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phlebology: The Journal of Venous Disease	6. 最初と最後の頁 361 ~ 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/02683555221077741	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 -
1. 著者名 Soichi Ike, Koji Ueno, Masashi Yanagihara, Takahiro Mizoguchi, Takasuke Harada, Kotaro Suehiro, Hiroshi Kurazumi, Ryo Suzuki, Tomoko Kondo, Tomoaki Murata, Bungo Shirasawa, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano	4. 巻 14
2. 論文標題 Cryopreserved allogenic fibroblast sheets: development of a promising treatment for refractory skin ulcers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 3879-3892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Suehiro Kotaro, Mizumoto Yukie, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Nagase Takashi, Takeuchi Yuriko, Mizoguchi Takahiro, Suzuki Ryo, Kurazumi Hiroshi, Hamano Kimikazu	4. 巻 20
2. 論文標題 Hardness Sensed by Skin Palpation in Legs with Lymphedema Is Predominantly Correlated with Dermal Thickening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lymphatic Research and Biology	6. 最初と最後の頁 368 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/lrb.2020.0133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito Toshiro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Matsunaga Kazumasa, Tsubone Sarii, Lv Bochao, Kobayashi Sei, Nagase Takashi, Mizoguchi Takahiro, Samura Makoto, Suehiro Kotaro, Harada Takasuke, Morikage Noriyasu, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Perivascular Adipose Tissue Is a Major Source of Nitric Oxide in Saphenous Vein Grafts Harvested via the No Touch Technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e020637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.120.020637	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 -

1. 著者名 Suehiro Kotaro, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Nagase Takashi, Takeuchi Yuriko, Mizoguchi Takahiro, Nakamura Kaori, Hamano Kimikazu	4. 巻 71
2. 論文標題 Extracellular Fluid Content in the Legs of Patients with Chronic Venous Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Surgery	6. 最初と最後の頁 215 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.avsg.2020.07.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizoguchi Takahiro, Morikage Noriyasu, Takeuchi Yuriko, Nagase Takashi, Samura Makoto, Harada Takasuke, Suehiro Kotaro, Hamano Kimikazu	4. 巻 71
2. 論文標題 Treatment Results of Endovascular Aneurysm Repair Using the Parallel Stent-Graft Double D Technique for Distal Saccular Abdominal Aortic Aneurysms and Common Iliac Aneurysms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Surgery	6. 最初と最後の頁 392 ~ 401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.avsg.2020.07.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suehiro Kotaro, Fujita Motoki, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Suzuki Ryo, Kurazumi Hiroshi, Tsuruta Ryosuke, Hamano Kimikazu	4. 巻 14
2. 論文標題 Hyperbaric Oxygen Therapy Is an Effective Adjunctive Therapy to Manage Treatment-Resistant Venous Leg Ulcers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Diseases	6. 最初と最後の頁 273 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3400/avd.cr.21-00030	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 -

1. 著者名 Mizoguchi T, Suehiro K, Ueno K, Ike S, Nagase T, Samura M, Harada T, Kurazumi H, Suzuki R, Harada K, Takami T, Morikage N, Hamano K	4. 巻 13
2. 論文標題 A pilot study using cell-mixed sheets of autologous fibroblast cells and peripheral blood mononuclear cells to treat refractory cutaneous ulcers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 9495 ~ 9504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 末廣晃太郎、池創一、溝口高弘、竹内由利子、原田剛佑、森景則保、濱野公一
2. 発表標題 座位における下肢圧迫と足関節運動が静脈血行動態に与える影響
3. 学会等名 第42回日本静脈学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末廣晃太郎
2. 発表標題 リンパ浮腫と静脈疾患
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会・第3回リンパ外科研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末廣晃太郎、溝口高弘、永瀬隆、竹内由利子、佐村誠、原田剛佑、森景則保、濱野公一
2. 発表標題 下肢機能低下はリンパ浮腫肢の浮腫量を増加させうる
3. 学会等名 第49回日本血管外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末廣晃太郎、溝口高弘、永瀬隆、竹内由利子、佐村誠、原田剛佑、森景則保、濱野公一
2. 発表標題 下肢リンパ浮腫の皮膚の硬さは真皮の増厚に影響される
3. 学会等名 第45回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末廣晃太郎、溝口高弘、永瀬隆、竹内由利子、佐村誠、原田剛佑、森景則保、濱野公一
2. 発表標題 チューブ包帯は弾性ストッキングの代用になりうるか
3. 学会等名 第41回日本静脈学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末廣晃太郎、池創一、溝口高弘、永瀬隆、竹内由利子、佐村誠、原田剛佑、森景則保、濱野公一
2. 発表標題 非常に難治性の静脈鬱滞性潰瘍に対する高気圧酸素療法の効果
3. 学会等名 第62回日本脈管学会総会
4. 発表年 2021年

〔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)	
研究分担者	濱野 公一 (HAMANO Kimikazu) (60263787)	山口大学・大学院医学系研究科・教授  (15501)	
研究分担者	溝口 高弘 (MIZOGUCHI Takahiro) (90844796)	山口大学・医学部附属病院・助教  (15501)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------