

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861708

研究課題名(和文)血管形成能を有する複合型培養皮膚の開発

研究課題名(英文)Development of cultured composite skin with a vessel forming ability

研究代表者

今川 孝太郎 (Imagawa, Kotaro)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：50366001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血単核球中の血管内皮前駆細胞の質と量を向上させる無血清生体外培養増幅法で得られた細胞(QQc細胞)と表皮角化細胞、真皮線維芽細胞をそれぞれ共培養し48時間後の細胞数を検討した。結果、QQc細胞は各細胞の増殖効率を上昇させた。QQc細胞を複合型培養皮膚に組ことで生着の向上に寄与する可能性が示唆された。現在QQ細胞を組み込んだ複合型培養皮膚の組織実験を施行中である。

研究成果の概要(英文)：Keratinocytes and fibroblasts were respectively co-cultured with endothelial progenitor cells obtained by a serum-free quality and quantity control culture (QQc). We compared the number of cells of keratinocytes and fibroblasts in co-cultured with the number of their in mono-cultured after 48hours. As a result, for keratinocytes, the increase in cell number of approximately 29% (n = 1) was found in co-culture. For fibroblasts, the increase in cell number of approximately 11% (n = 3) was found in co-culture. It is reasonable to suppose that QQc cells have a proliferative effect on each cells.

研究分野：形成外科学

キーワード：表皮角化細胞 真皮線維芽細胞 培養皮膚 血管内皮前駆細胞

## 1. 研究開始当初の背景

当該施設では培養真皮線維芽細胞をフィブリンゲルに埋め込み、その上に培養表皮角化細胞を重層化させた複合型培養皮膚を作成し臨床においてその生着を確認している<sup>1)</sup>。しかし、培養皮膚は既存の自家植皮術に比べ感染に弱く生着率は劣り、かつ生着後の脆弱性も観察されている。これを改善するためには移植早期の血管新生が重要と考え複合型培養皮膚に血管内皮前駆細胞を組み込むことで生着率や生着後の質を改善することが可能ではないかと考えた。血管内皮前駆細胞は当該施設の浅原らが成人末梢血中にも存在することを証明し<sup>2)</sup>、血管内皮前駆細胞移植は難治性糖尿病性潰瘍などの血管再生療法として安全性と有効性が確認されている<sup>3)</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究では血管内皮前駆細胞を組み込んだ複合型培養皮膚を作成し、マウス皮膚欠損層に移植することで組織学的に比較検討することである。血管内皮前駆細胞は末梢血単核球中に含まれるが、十分量の細胞数を得るためには大量の末梢血を採取する必要があった。この問題を解決するため、当該施設で開発した無血清生体外培養増幅法で得られた末梢血単核球 (serum-free quality and quantity control culture: QQc 細胞) を代用することに変更した。この培養法は血管再生能を有する血管内皮前駆細胞の量を増幅するのみならず、抗炎症作用を有する M2 マクロファージ、制御性 T 細胞も増加させることが証明<sup>4)</sup>され、ラット心筋梗塞モデルへの移植実験により有効性が証明<sup>5)</sup>されている。しかし、この QQc 細胞群が表皮角化細胞、真皮線維芽細胞へどのような作用を有するかの検討はなされていない。そこで予備実験として QQc 細胞と共培養することでどのような影響があるかについて検討した。

## 3. 研究方法

### (1) ヒト表皮角化細胞と QQc 細胞の共培養の方法と単培養との比較

培地には DKSFM を使用し、6 well プレートにヒト角化細胞  $7.5 \times 10^5$  を培地 1000  $\mu\text{L}$  に懸濁し播種した。その後、ポアサイズ 0.4  $\mu\text{L}$  の透過性メンブレンであるセルカルチャーインサートを挿入し、セルカルチャーインサート上に、QQc 細胞を  $7.5 \times 10^5$  を培地 1000  $\mu\text{L}$  に懸濁後播種した。コントロールはセルカルチャーインサート上に培地 1000  $\mu\text{L}$  を添加した。5%CO<sub>2</sub>, 37 のインキュベータで 48 時間培養した。その後、細胞を回収し、細胞数をカウントした。

### (2) ヒト真皮線維芽細胞と QQc 細胞の共培養の方法と単培養との比較

培地には 10%FBS-MEM を使用し、6 well プレートにヒト線維芽細胞  $2.0 \times 10^5$  を培地 1000  $\mu\text{L}$  に懸濁し播種した。その後、ポアサイズ 0.4  $\mu\text{L}$  の透過性メンブレンであるセルカルチャーインサートを挿入し、セルカルチャーインサート上に、QQc 細胞を  $2.0 \times 10^5$  を培地 1000  $\mu\text{L}$  に懸濁後播種した。コントロールはセルカルチャーインサート上に培地 1000  $\mu\text{L}$  を添加した。5%CO<sub>2</sub>, 37 のインキュベータで 48 時間培養した。その後、細胞を回収し、細胞数をカウントした。

## 4. 研究成果

### (1) 角化細胞と QQc 細胞の共培養の結果

単培養後の角化細胞数は  $8.75 \times 10^4$ 、共培養後の角化細胞数は  $1.13 \times 10^5$  であり、共培養において角化細胞の増加が多く認められた。

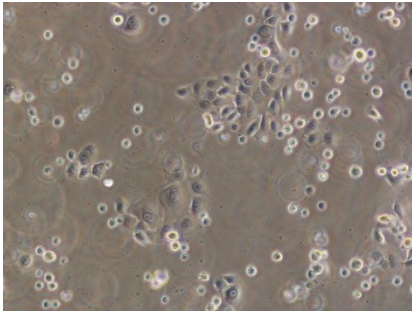


図1 . 単培養 48時間後

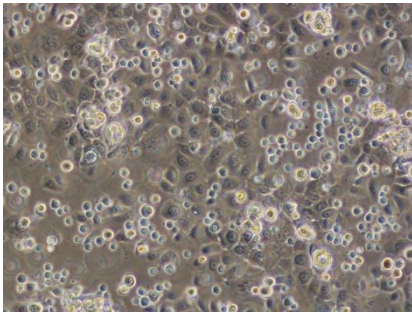


図2 . 共培養 48時間後

(2) 真皮線維芽細胞と QQc 細胞の共培養の結果

3 検体で検討した。培養後の真皮線維芽細胞数は単培養で  $6.55 \times 10^4$ 、 $3.90 \times 10^4$ 、 $3.15 \times 10^4$  に対し、共培養でそれぞれ  $7.90 \times 10^4$ 、 $4.15 \times 10^4$ 、 $3.35 \times 10^4$  とすべてにおいて増加を認めた。平均で 1.11 倍の増加を認めた。

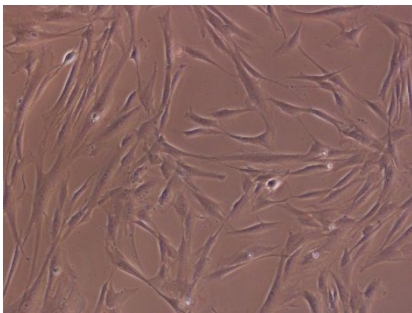


図3 . 単培養 48時間後

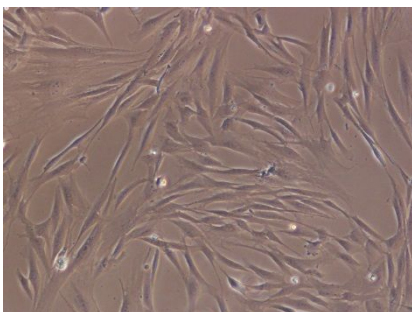


図4 . 共培養 48時間後

(3) 実験結果からは QQc 細胞を含む細胞

群の共培養は表皮角化細胞と真皮線維芽細胞の単培養に比較し細胞数の増加が確認された。この結果より QQc 細胞群は表皮や真皮に対して細胞の増殖能を活性化させることが示唆され、QQc 細胞を組み込んだ複合型培養皮膚は QQc 細胞を含まない培養皮膚に比べて生着の向上に寄与する可能性があると考えられた。また、QQc 細胞が共培養により表皮角化細胞・真皮線維芽細胞の増殖を活性化したことから、各細胞の培養段階から併用することで、培養期間の短縮や播種する細胞数の削減などに繋がる可能性が考えられた。当初の計画である QQc 細胞を含むハイブリッド型培養皮膚の移植実験、組織学的検討は現在施行中である。また今後は真皮線維芽細胞、表皮角化細胞、QQc 細胞の 3 種類の細胞の共培養を行う予定である。

#### 引用文献

猪口貞樹、自家複合型培養皮膚移植、医学の歩み、Vol200 N03、2002

Asahara T et al, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science, 275, 1997

Tanaka R et al, Autologous G-CSF mobilized peripheral blood CD34 + cell therapy for diabetic patients with chronic nonhealing ulcer. Cell transplantation, Vol23, 2014

Masuda H et al, Vasculogenic conditioning of peripheral blood mononuclear cells promotes endothelial progenitor cell expansion and phenotype transition of anti-inflammatory macrophage and T lymphocyte to cells with regenerative potential. JAHA, 113, 2014

Masuda H et al, Development of serum-free quality and quantity control culture of colony-forming

endothelial progenitor cell for  
vasculogenesis. Stem cells  
translational medicine, 1, 2012

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

今川 孝太郎 (IMAGAWA Kotaro)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：50366001