

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2007 ～ 2008
 課題番号：19791318
 研究課題名 (和文) 表皮幹細胞移植による難治性潰瘍のティッシュエンジニアリングと新規治療ストラテジー
 研究課題名 (英文) Study of tissue engineering for refractory skin ulcer by grafting of cultured keratinocyte stem cells. - New strategy on ulcer therapy -
 研究代表者
 富岡 みゆき (TOMIOKA MIYUKI)
 聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員
 研究者番号：90398967

研究成果の概要：同種のヒト表皮幹細胞が、難治性皮膚潰瘍治療に応用された。患者 5 例に適用され、2 年を超えて治療に難渋してきた皮膚潰瘍患者に於いても、最短 4 日、長くても 40 日程度で完全上皮化またはほぼ上皮化が得られ、その有効性が確認された。一方ヒト表皮幹細胞が産生する増殖因子 IGF, VEGF, IL-6, TGF- β , EGF, bFGF, Leptin, TNF- α を同時測定した。その結果表皮幹細胞は、IL-6 除く全ての増殖因子が多量に産生されていることが解った。これらのことから、表皮幹細胞の有用性の一部が説明出来るものと思われた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医学・移植・再生医療・細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

血管内皮前駆細胞の発見以来、従来考えられてきた血管新生概念は変革を余儀無くされ、2 種類の血管再生機構を考える必要性が生じた。すなわち、従来型の既存血管からの枝分かれ (発芽) と、血管内皮前駆細胞からの発生である。自家骨髄幹細胞移植は当初、この CD34 陽性の血管内皮前駆細胞が移植部位周囲において増殖・分化し周囲組織の血管

発生を亢進する事で有効性を発現すると推察された。しかし現在では前記した機能も適用周囲で一部には関与していても、実際には移植された骨髄幹細胞が産生する各種のサイトカイン・増殖因子がカクテルとなり相乗的に作用する事で、周囲の血管内皮細胞の発芽を促進し血管新生を促す。あるいは移植周囲に存在する幹細胞の増殖を促す事で組織再生、臓器再生が行われると言った考え方が

一般的になりつつある。最近ではこれら知見を基礎とし、難治性皮膚潰瘍治療に対しても、骨髄幹細胞、脂肪幹細胞、末梢血幹細胞等の移植が試みられ、遺伝子治療と同等あるいはそれ以上の有効性が報告されている。ところで研究代表者は平成17-18年度にかけて、「血管内皮前駆細胞を用いた新規血管再生ティッシュエンジニアリングの試み」との課題名で若手研究(B)補助金を得るに至り、プロスタノイドでの刺激による血管内皮前駆細胞から産生される各種の液性因子の増強性について検討し、難治性皮膚潰瘍への応用の可能性について基礎的に検討してきた。ASOや褥瘡等に応用され初めている骨髄幹細胞移植は、切断、植皮など外科的な処置以外に治療手段がないと考えられてきた創傷部の保存的治療を可能としてきた。研究代表者らのこの2年間の研究においても、そのメカニズムとして、幹細胞が産生する各種の液性因子が重要な鍵を握り、これら細胞を事前にプロスタノイド等で刺激する事で、これらの液性因子産生を増強させるとより有効である事を明らかにしてきた。しかし、これらの研究結果を臨床面に応用する場合、骨髄液採取は必須であるが、全身状態の悪い患者等に骨髄採取をするにはある程度のリスクが伴い、全例に適用可能とは言えない。そこで、主に潰瘍の治癒にかかわる機序が幹細胞自身の分化増殖ではなく幹細胞が分泌する液性因子により難治性潰瘍治療に有効性を現しているならば、必ずしも骨髄幹細胞の必要はなく、「採取しやすい組織からの体性幹細胞を移植する事による潰瘍治療の可能性」を合わせて検討してきた。その結果、表皮幹細胞が骨髄幹細胞に劣らず VEGF 等を産生できる事を明らかにした。

2. 研究の目的

IL-6やFGFを始めとして創傷治癒過程に各種のサイトカインや増殖因子が関与している事は古くから知られている。当初移植された幹細胞は、移植部位で合目的に分化増殖すると考えられてきたが、この点には疑問の余地があり、議論が分かれるところである。研究代表者はこの問題について検討を加え、損傷周囲組織の線維芽細胞や表皮細胞が創傷治癒段階の極初期に産生される炎症性エイコサノイドが AUTOCRINE, PARACRINE 的に創傷治癒促進液性因子を放出して、治癒に関与する事を明らかにしてきた(井上ら:2002、2003、松井ら:2002、高橋ら:2004)。しかしながら、これらの生理活性物質と実際の血管新生との関係は、現在の皮膚植埋型の動物モデルでは研究が不可能である。研究代表者はかねてよりマウス耳介に一本の動静脈を茎とする皮弁を作成し、血管作動物質の変動を詳細に検討してきており、その際耳介栄養血管の変化、側副血行路の開通などについて画像解析を含めて検討してきた(井上ら:1996、2002、2003、2004)。本モデルは従来同時分析が不可能であった血行、血管新生、新生に関わる表皮幹細胞の動態の同時解析が可能であり、本研究方法により表皮幹細胞移植による血管再生メカニズムの解明が容易になることが期待されている。又、この事が明らかになれば、現在骨髄採取を必要とした難治性潰瘍治療が、自家または他家の切手大の皮膚の採取、表皮幹細胞大量培養、培養表皮幹細胞移植、と言うプロセスで可能となり、患者負担が格段に減少でき、一つの安価で確実なオプションが加わり治療の選択肢が広がる。この事は、患者 QOL と ADL の飛躍的な向上が期待できる。これ迄述べてきた研究成果より考察出来る事として、阻血部位の壊死や皮膚潰瘍の遷延化は、患部への循環動態に依存し、その際に周囲細血管の循環抵抗が少なくかつ

組織の栄養要求を満たせられる血行が維持できれば皮弁の救済と潰瘍部の良好な肉芽増生が望める。従来はこの目的を達成するため自己の血管発生を期待し骨髄幹細胞移植、脂肪幹細胞移植、FGF、HGF等の遺伝子治療が試みられてきた。しかしこのときに、骨髄を採取すると言う患者負担とリスク、脂肪採取に伴うある程度大きな外科的侵襲が必須であった。本研究においては、自家表皮幹細胞移植をする場合には切手大程度の皮膚の薄削は必要であるが、侵襲は極めて軽微である。また他家の皮膚の場合侵襲は無い。いずれにしても得られた皮膚から培養した表皮幹細胞を大量に貯蔵しておき、阻血部位や潰瘍部位に移植すると言う、全く新たな試みである。この表皮幹細胞を移植する技術が臨床用に確立されれば、その後の潰瘍療に革命的な変革が可能と思われる。

今回このヒト培養表皮幹細胞の創傷治癒に及ぼす影響について臨床研究を行うとともに、その幹細胞の産生する液性因子について検討を加え、その作用機序を考察した。

3. 研究の方法

(1) 臨床研究：

手術不適応または拒否症例で従来の皮膚潰瘍治療に対し抵抗した患者を選択し、本学生命倫理委員会承認のもと、同意を得た後に臨床研究を行った。すなわち、難治性皮膚潰瘍部位に、ヒト同種培養表皮幹細胞 (1×10^7 個/site) を移植した。その後非固着性ガーゼ、ガーゼ被覆を行い、概ね7日1回の頻度で、4回本治療を反復した。4回目の治療後すなわち治療開始5週間後に於ける潰瘍部位の状況を写真撮影した。潰瘍治療の評価は、治療前と5週間後の画像を解析する事で、その面積の縮小を指標にした。

(2) 作用機序の研究：

本学生命倫理委員会承認の下、患者から研究用として承諾された余剰組織を用いた。すなわち、得られた皮膚を除菌後に細切し、常法に従って酵素消化後に表皮細胞遊離液を得た。得られた表皮細胞遊離液を著者等の方法に従って、表皮幹細胞のみを選択培養した。表皮幹細胞がコンフルエントに到達後、測定用培地に交換し、24時間さらに培養した。24時間後に培地を無菌的に採取し、表皮幹細胞が培地中に産生放出した各種創傷治癒促進因子、血管新生因子の蛋白発現をEIA法によって測定した。

4. 研究成果

再生医療技術を用いて難治性皮膚潰瘍治療を試みる場合、大きく2種類の細胞が利用されている。そのひとつは骨髄間質細胞であり、もう一つは脂肪組織幹細胞である。いずれの場合も、その有効性が知られているが、前者は骨髄穿刺という比較的大きい侵襲を必要とし、脂肪組織採取においても患者本人の外科的侵襲を避けて通ることができない。そこで、平成19年度は同種表皮幹細胞利用による難治性皮膚潰瘍治療に及ぼす効果を検討した。標準的皮膚潰瘍治療に不応で外科処置不同意の難治性皮膚潰瘍患者にIC取得後、あらかじめ培養してある同種表皮幹細胞治療を潰瘍創部に対して適用した。その結果、2年以上治療に難渋していた皮膚潰瘍が40日程度で、半年以上治療に抵抗した熱傷潰瘍が約7日間で完全上皮化し、その有用性が示された。表皮幹細胞は採取と培養が比較的容易であるが、本研究の場合自家表皮幹細胞を用いるのではなくあらかじめ病原微生物などの感染の無い安全な同種表皮幹細胞を用いることで、患者の外科侵襲を伴わないことが特徴である。本技術を既にのべ5例の患者に適用しているがいずれも副作用を認め

ず、全例創部面積の縮小ならびに完全上皮化が得られた。本治療法を適用すると、早期の肉芽増生と辺縁部からの表皮の伸展が認められた。特に肉芽増生については血管新生を伴った良好な肉芽が得られ、これは表皮幹細胞の産生する血管新生因子が創部周囲に作用し、潰瘍面に存在する自己の幹細胞を刺激することで、創傷治癒を促進しているものと推察された。

表皮角化細胞は身体内部を外界の侵襲から保護する為に、旺盛な細胞分裂能を保持し角質層を形成することで、バリアとしての機能を維持している。表皮は外界からの機械的刺激の防御のための角質層形成以外にも、生物学的、化学的刺激から生体を守るためにIL-1などの炎症性サイトカインで大量のプロスタノイド、特にPGE₂を産生する。しかし、その役割は不明な点が多く、特にVEGFを始めとする増殖因子産生の役割や機能については明確でない。これ迄の研究で、表皮幹細胞が創傷治癒の促進に作用し、これ迄数ヶ月から数年治療に難渋してきた難治性潰瘍等へ応用すると早ければ数日遅くとも40日程度で瘢痕治癒することが認められ、その有用性が線維芽細胞を含んだ皮膚代替物よりも効率的であることも判明してきている。そこで、最終年度はヒト表皮幹細胞が産生する増殖因子を同様に皮膚構成細胞である線維芽細胞と比較することで、潰瘍治療に対する有効性作用機序を検討した。

ICを得た患者皮膚から、表皮幹細胞を培養し凍結保存した。この表皮幹細胞を常法に従

って解凍して培養した。得られた細胞がコンフルエントになった段階で、24時間中に放出される、IGF, VEGF, IL-6, TGF- β , EGF, bFGF, Leptin, TNF- α を同時測定した。

その結果表皮幹細胞は、IL-6除く全ての増殖因子が、線維芽細胞より多量に産生されていることが解った。同時に炎症性の刺激によって、表皮幹細胞からのこれら因子の産生の増強が、認められつつあり、現在検討中である。これらのことから、表皮幹細胞の有用性の一部が説明出来るものと思われた。

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)

[学会発表] (計 1 件)

富岡 みゆき
同種多血小板血漿を用いた細胞培養の試み
第一回日本創傷外科学会総会・学術集会
平成21年1月16日～17日 東京

[その他]

ホームページ等
<http://www.marianna-u.ac.jp/PRS/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富岡 みゆき (TOMIOKA MIYUKI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員
研究者番号：90398967

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし