

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592110

研究課題名（和文）色素性皮膚疾患の胚性医療学的インターベンション

研究課題名（英文）Regenerative medical intervention of pigmented dermatosis.

## 研究代表者

熊谷 憲夫（KUMAGAI NORIO）

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：30103477

## 研究成果の概要（和文）：

培養表皮を用いて、外表皮色調異常患者の低侵襲で有効な治療法の確立を試みた。同意を得られた外表皮色調異常患者から、患部周囲正常部位とカラーマッチする部位の皮膚を採取した。醜形部位を薄削後に、培養された表皮シートを移植した。培養表皮は、ほぼ100%生着し、カラーマッチも良好であった。本技術は、既に先天性色素沈着（巨大母斑症）の患者に応用され、有用性が確認されている。同時に顔面の白斑患者に応用されている。

## 研究成果の概要（英文）：

We attempted to develop the effective and low invasive therapy on giant nevi or de-pigmentation patients. The skin of the patients obtained IC was collected from the same skin color area surrounding grafted region. After peeling of pigment anomaly area, the cultured keratinocytes sheets were grafted on the region. The grafted keratinocytes sheet took alive almost all as well as was color match. The operation technique has been routinely applied to a systemic giant nevi and a facial de-pigmentation patient.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：組織培養・移植学

## 1. 研究開始当初の背景

著者は、すでに切手大の皮膚から表皮細胞を

培養し、3000 cm<sup>2</sup>程度の培養表皮幹細胞シートを作成し、皮膚欠損部位に移植するという

臨床応用を 550 例以上手掛け 20 年が経過し安定した結果を得ている。しかしながら、真皮組織の欠損部への培養皮膚の応用は必ずしも安定した結果が得られずかつ、術後患者の満足度も低い。これは、移植母床に真皮成分が欠損している事に由来すると思われる。筆者は、この問題を解決する目的で真皮を含む皮膚の再構築を試み、フィブリンジェルを支持体とした線維芽細胞の立体培養をすでに試み、平成 12～平成 18 年に至る迄厚生労働省ミレニアムプロジェクト及び当該研究費を助成されるに至っている。この研究過程において生分解性架橋内（特許出願中）にフィブリンを含有させた擬似真皮を作成し線維芽細胞と表皮細胞を混合立体培養し、再生皮膚を再構築しその有用性を示してきたが、特に平成 18 年度においては表皮幹細胞を培養過程で特異的にセレクションする事で、線維芽細胞を用いない皮膚潰瘍治療の可能性が示された。これら技術の確立に伴って、近年巨大母斑、色素脱失患者の醜形治療への期待が高まり、色素細胞含有培養表皮幹細胞シートによる治療を要望される患者が増えてきた。その理由に、治療に従来は広範囲な植皮などを余儀なくされ、侵襲性が大きい事、レーザー、光治療などでは皮膚癌誘発リスクが回避できないことなどがあげられる一方で、培養表皮移植術は低侵襲ですむこと、治療期間も短期ですむことなどがある。これまでに数十例の患者に本技術を応用してきたが、その結果はきわめて良好であり、患者の満足度も高い。そこで平成 20 年度より、表皮幹細胞の可塑性に関わるこのメカニズムの確実な解明と、カラーマッチ方法の確立を行なう。これら臨床応用結果についての長期フォローを行い、安全性と有用性を立証する。

## 2. 研究の目的

外表皮奇型・醜形などの治療には、その範囲がホクロ程度であれば、簡単な縫縮術で治療が可能である。しかし巨大母斑、広範囲色素脱失の場合には植皮が不可欠であり、その際の健常部位への侵襲が高いこと、患者の QOL を下げる事が大きな欠点である。又、レーザー治療なども考案されているが、広範囲には適応しにくい事、現状では極めて高価であるにも関わらず、その効果は一定しない事から、普及には程遠い現状にある。本研究はこの外表皮の色調異常に伴う醜形治療に本講座が日本で始めて臨床応用した培養表皮を用いて、低侵襲で効率的で有効な治療法を確立する事にある。

## 3. 研究の方法

下記(1)(2)(3)の実験によって作成した再生皮膚をヌードマウスへ適用し、その有用性を確認する。

研究方法は、下記に示すように 3 つの段階に別れるが、いずれも聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会承認（第 393 号、第 578 号、第 1004 号）済みである。

### (1) ヒト表皮幹細胞の培養

麻酔下無菌的に得られた剃毛後の正常皮膚(15/1000 ミクロン)を、2mm 角に細切し抗生物質(ペニシリン、カナマイシン、アンホテリシン B)含有 PBS 中で 2 回除菌する。その後、0.25%トリプシン含有 DME 培地(又は F-12 培地)中で、酵素消化する。その後、この皮膚を 10ng/ml コレラトキシン含有 20% FBS 加 DME 培地中で 1 時間、室温で攪拌し、分離細胞を得る。この細胞浮遊液を、 $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> になる様調節し、20%FBS 加、10mg/ml コレラトキシン含有 DME 培地を用いて、37°C で 5%CO<sub>2</sub> 条件下 48 時間培養し、表

皮幹細胞の接着を確認後、無血清 Epi-life (クラボウ製)に交換し2日に一度同培地を交換し、コンフルエント迄培養する。初代~2代目の細胞がコンフルエントになった後、トリプシンを用いて表皮幹細胞の分離細胞を得る。

#### (2) ヒト表皮幹細胞シートの作成

コンフルエントに到達した細胞 10%FBS 含有 DME/F-12 培地を添加して表皮細胞の分化誘導を 48~72 時間行い、培養表皮シートを作成する。

#### (3) ヒト表皮細胞シートの移植

聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会承認のもと、同意を得られた外表皮色調異常患者から、患部とカラーマッチする部位の皮膚を採取した。その後方法(1)(2)に従って得られた培養表皮シートを、醜形部位を薄削後に移植した。

#### 4. 研究成果

本研究はこの外表皮の色調異常に伴う醜形治療に本講座が日本で初めて臨床応用した培養表皮を用いて、低侵襲で効率的で有効な治療法を確立する事を目的とした。生命倫理委員会の承認の下に同意書を得られた患者より、麻酔下無菌的に得られた剃毛後の正常皮膚(15/1000 ミクロン)を、2mm 角に細切り抗生物質(ペニシリン、カナマイシン、アンホテリシン B)含有 PBS 中で2回除菌した。その後、0.25%トリプシン含有 DME 培地(又は F-12 培地)中で、酵素消化した。その後、この皮膚を10ng/ml コレラトキシン含有20% FBS 加 DME 培地中で1時間、室温で攪拌し、分離細胞を得た。この細胞浮遊液を、 $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>になる様調節し、20%FBS 加、10mg/ml コレラトキシン含有 DME 培地を用いて、37°C で5%CO<sub>2</sub> 条件下 48 時間培養し、表皮幹細胞の接着を確認後、無血清 Epilife(ク

ラボウ製)に交換し2日に一度同培地を交換し、コンフルエント迄培養した。培養細胞がコンフルエントに到達後、分化誘導を行い培養表皮シートを作製した。このシートを薄削した患部に移植し、適宜ドレッシングを行った。

培養表皮は、ほぼ 100%生着し、カラーマッチも良好であった。色素脱失患者に於いては、培養表皮の継代を少なくする方向で、巨大母斑患者に於いては培養表皮の継代を増やす方向で、シート作成を行うことで、色素調整が可能であった。しかしながら、真皮深層に至るまで薄削すると培養表皮の生着とカラーマッチが困難であった。

本技術は、既に先天性色素沈着(巨大母斑症)の患者に応用され、有用性が確認されている。同時に顔面の白斑患者に応用されている。培養表皮による白斑治療後の、皮膚色の不一致は PABA 療法で対応できた。

#### 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 4 件)

##### 1. 松崎恭一、熊谷憲夫

膠原病に伴う皮膚潰瘍の治療  
PEPARS 39: 83-95, 2010 査読有

##### 2. 井上 肇、熊谷憲夫

上皮幹細胞を用いた新規治療戦略-難治性皮膚潰瘍治療とあらたな展開-  
医学のあゆみ 別冊  
231(11):1091-1095, 2009 査読有

##### 3. 松崎恭一、松永由紀子、門谷久仁子、川上民裕、井上肇、熊谷憲夫

紫外線照射による転写因子 basonuclin の局

在の変化

日本形成外科学会誌

29(12):733-738, 2009 査読有

4. 熊谷憲夫、大島秀男、松崎恭一、井上 肇  
自家培養表皮移植による巨大色素性母斑の  
治療 Peppers. 2008:24:28-36 査読有

[学会発表] (計 4 件)

篠田令奈

1. 篠田令奈

PRP を用いた培養表皮作成法

第 1 回 PRP 療法研究会 2009 年 11 月 15 日  
大阪

2. 多血小板血漿を用いた新規培養表皮作  
成法

第 18 回日本形成外科学会 基礎学術集会  
2009 年 10 月 1 日 東京

3. 岩本承豪

培養表皮細胞からの各種増殖因子産生と  
HSP 誘導に及ぼす胃粘膜保護薬の影響

第 18 回日本形成外科学会 基礎学術集会  
2009 年 10 月 1 日 東京

4. 熊谷憲夫

皮膚再生医療による創傷治療

第 3 4 回日本熱傷学会総会

2008 年 6 月 28 日 横浜

[図書] (計 1 件)

1. 熊谷憲夫、井上 肇

培養表皮による創傷治療 創傷外科に置け  
る新しいアプローチ

(形成外科増刊号) S255-S261 2008 年 10 月  
克誠堂出版(株)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 憲夫 (KUMAGAI NORIO )

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：30103477

(2) 研究分担者

井上 肇 (INOUE HAJIME )

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60193603

(3) 連携研究者

なし