

平成 22 年 4 月 23 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791308

研究課題名（和文） 骨髄間葉系細胞培養シートによる難治性皮膚潰瘍治療法の開発

研究課題名（英文） Development of the treatment for intractable skin ulcer using monolayered mesenchymal cell sheets

研究代表者

陶山 淑子 (SUYAMA YOSHIKO)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90448192

研究成果の概要（和文）：難治性皮膚潰瘍は、血行障害が原因のひとつであり、临床上、高齢者が対象である。そこで、高齢ラット、若年ラットそれぞれから、血管新生作用をもつ間葉系細胞培養シートを作成し、ラットの創へ貼付してその治療効果を比較した。高齢ラット由来細胞は、若年由来細胞より創縮小率、創部血流ともに劣るが、シートを貼付しない創より良好であった。高齢者の細胞も潰瘍治療法として利用できる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Intractable skin ulcers are often caused by ischemia, and in the practice, most patients are elderly people. Therefore, we made monolayered mesenchymal cell sheets with the ability of angiogenesis, derived from subcutaneous adipose tissue of young and aged rats. And young rats with wounds were divided two groups, grafted young cell sheet (group Y) and grafted aged one (group A). We evaluated the effect of treatment as wound area and wound blood flow. Group A was inferior to group Y, but was better than wounds without cell sheet grafting. This finding suggests that it is possible to use cells derived from elderly people as treatment, but the improvement is necessary to reach young cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：形成外科学

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：①再生医学、②間葉系細胞、③細胞培養シート、④難治性皮膚潰瘍

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、末梢動脈疾患による潰瘍、褥瘡は、治りにくい傷の代表として良く知られている。治りにくい傷の多くは血行が乏しく、様々な治療を行っても治療効果が薄い。そこで、われわれは、創部の血行を直接的に改善する治療法として、骨髄および皮下脂肪組織から得た間葉系細胞培養シートを作成し、創部に貼布することを考えた。間葉系細胞培養シートは、数多くの間葉系細胞がシート化されたもので、生体から作成される創傷被覆材となり得る。われわれは、間葉系細胞培養シートを創部に貼布することにより、難治な傷を治すための新しい方法を確立することを目的とした。この方法は、臨床応用が可能な新しい再生医学的アプローチである。

2. 研究の目的

間葉系細胞は、自己の分化能と分泌するサイトカインから、血管新生作用があるとされている。また、この血管新生作用を応用して、骨髄由来間葉系細胞あるいは末梢血単核球の局注療法は末梢動脈疾患患者に対して既に臨床導入されている。われわれは、間葉系細胞自体あるいは分泌されるサイトカインを難治性潰瘍に大量かつ持続的に作用させることで、創傷面の毛細血管網の再生を促進し、良好な肉芽組織が増生されることを期待している。そして、実際の临床上、治療対象者の多くは高齢者である。高齢動物において、間葉系細胞培養シートを作成し、その治療効果が、若年動物のものとは比べて減弱するか否かを明らかにする。高齢動物で本治療が可能であれば、高齢者での創部環境の改善、植皮術などの外科手術結果の向上、あるいは従来 of 軟膏処置より短期間に治療を終わらせることが期待できる。

3. 研究の方法

当初、骨髄由来間葉系細胞を用いる予定であったが、临床上、より採取が容易な皮下脂肪組織を用いて間葉系細胞培養シートを作成した。

(1) 皮下脂肪組織由来間葉系細胞培養シートの作成

若年ルイスラット(オス、8週齢)の皮下脂肪組織を採取し、間葉系細胞を分離、培養する。さらにフィブロネクチンコーティンググレイッシュで培養し、温度応答性培養皿で2週間培養した後、細胞がコンフルエントに達した後、温度応答性培養皿を30度以下に冷却することで皮下脂肪組織由来間葉系細胞培養シートを作成した。同様の方法で、高齢ラット(オス、48週齢)の皮下脂肪組織から細胞培養シートを作成した。

(2) 培養液中サイトカインの測定

若年ラット由来、高齢ラット由来細胞シートの移植直前の培養液を採取し、ELISA法にてvascular endothelial growth factor (VEGF)、hepatocyte growth factor (HGF)分泌量を測定した。

(3) ラット潰瘍モデルへの細胞培養シートの移植

全身麻酔下にルイスラット(オス n=19)の背部両側に直径2cmの円形の皮膚全層欠損を作成し、潰瘍モデルラットを作成した(図1左)。一侧はシートを貼付しないコントロールとし、対側に若年ラット由来細胞培養シート移植するY群(n=8)、高齢ラット由来細胞培養シートを貼付するA群(n=11)とした。細胞培養シート移植後の創部には、人工真皮(テルダーミス®)を貼付した(図1右)。

図1



(4) 潰瘍面積の計測

Y、A群共に0日、7日目、14日目の潰瘍を、デジタルカメラ(Nikon D100, Japan)でメジャーを設置して撮影した。撮影した画像は、画像処理ソフトウェア(Image J 1.39t)で潰瘍面積を計測し、潰瘍面積比(%) = 潰瘍面積/初回潰瘍面積×100を算出した。

(5) 潰瘍面の血流評価

レーザードップラ血流計(Laser Doppler Perfusion Imager System, PeriScan, Sweden)を用いて14日目に潰瘍表面の血流評価を行った。潰瘍部内をコントロール側、シート移植側それぞれ3箇所無作為に選択し、血流比を平均した。

4. 研究成果

(1) 培養液中 VEGF、HGF 測定

若年ラット由来細胞培養液(Y)、高齢ラット由来細胞培養液(A)についての VEGF(図2)、HGF(図3)濃度を示す。若年ラットと高齢ラット由来細胞では、HGF において有意差を認め、高齢化により、HGF 分泌が低下することが示唆された。

図 2

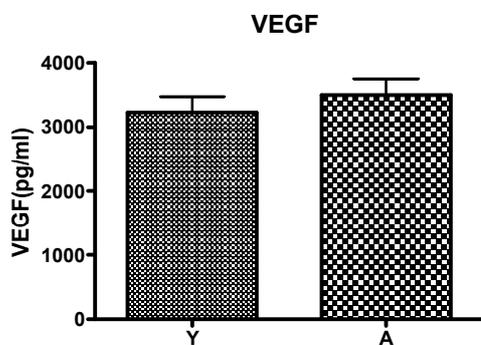
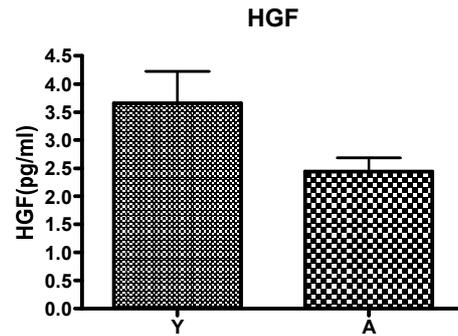


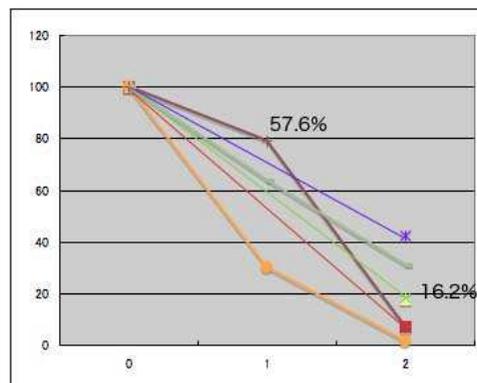
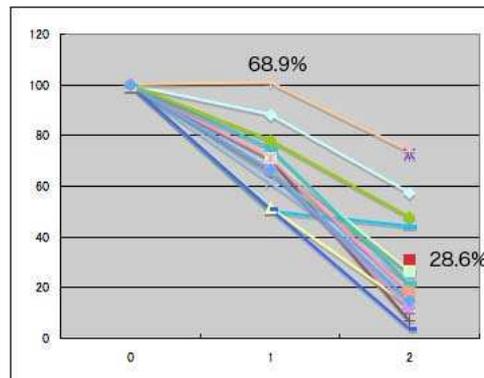
図 3

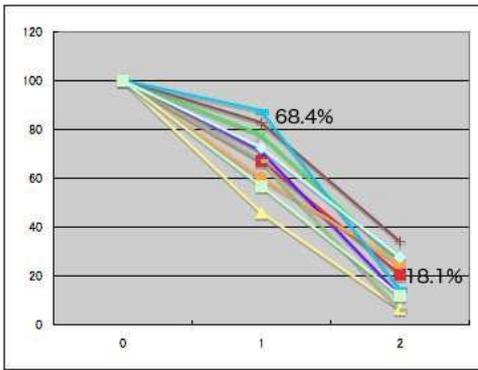


(2) 潰瘍面積の変化

0 日の潰瘍面積を 100%とした潰瘍面積比の平均は、7日目：コントロール側 68.9%、Y群シート貼付側 57.6%、A群シート貼付側 68.4%、14日目：コントロール側 28.6%、Y群シート貼付側 16.2%、A群 18.1%であった(図4(上：コントロール、中：Y群、下：A群 X軸：週数、Y軸:%))。

図 4





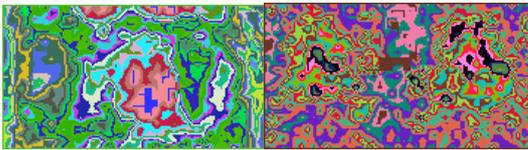
(3) 潰瘍部血流測定

14日目の血流測定において、コントロール側(右)に対し、シート貼付側(左)は、14日目にY群平均131%、A群平均121%の血流増加を認めた。(図5 Y群、図6 A群 左：潰瘍部写真 右：レーザードップラ血流計画像)

図5



図6



高齢ラット由来皮下脂肪組織由来細胞でも、培養シートは作成可能であった。皮下脂肪組織由来細胞を用いた潰瘍治療の研究あるいはその他細胞を用いた細胞培養シートを利用した研究は報告されているが、若年細胞由来のものがほとんどである。しかし、実際の臨床において、治療を要するのは高齢者が多くを占めている。臨床応用の際に、高齢者自身の細胞から作成した細胞培養シートを利用できる可能性が示唆される。

高齢細胞では、若年細胞より機能が低下するとされる。本研究において、創部の血流と

面積を比較し、若年、高齢ラット由来細胞シートを貼付したいずれの場合も、コントロール側と比較して、潰瘍部の血流改善を認め、潰瘍縮小に寄与することがわかった。しかし、高齢ラット由来細胞は、若年ラット由来細胞よりも効果が遅く、治療効果が低下する。高齢細胞では、HGFの分泌が若年に比較し低下していた。このことから、高齢ラット由来細胞を、若年ラット由来細胞培養シートと同等の治療効果を得るには、HGFの分泌量を増加させることが有効と考えられた。高齢ラット由来細胞を、HGFおよび本研究で測定していない他の因子の若年ラット由来細胞に近い効果あるいはそれ以上の効果を得るために、今後、移植シート枚数を増加させる、シートを重層化する、細胞培養方法などの検討を行い、実験を行う予定である。これにより、高齢者を対象とした臨床応用へより近づくもの考えられる。

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)

陶山 淑子、皮下脂肪組織由来間葉系細胞培養シートを用いた難治性潰瘍治療法の開発、第6回山陰形成外科懇話会(発表確定)、2010年5月23日、松江市立病院(松江市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

陶山 淑子 (SUYAMA YOSHIKO)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90448192

研究協力者

中山 敏 (NAKAYAMA BIN)

鳥取大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50271565

北野 博也(KITANO HIROYA)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：20153108

山本 康孝(YAMAMOTO YASUTAKA)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20362882

久留 一郎(HISATOME ICHIRO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60211504