

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18420

研究課題名（和文）皮膚付属器含有皮膚細胞混濁液による皮膚潰瘍治療システム構築

研究課題名（英文）Construction of skin ulcer treatment system using skin cell suspension containing skin appendages

研究代表者

藤原 綾乃（fujihara, ayano）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：80815952

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）：マウス皮膚から効率よく細胞混濁液を作成する方法はcollagenase 1を使用し、37度で1時間インキュベートすることであった。自作のchamberを使用し、マウス背部に皮膚潰瘍を作成し、細胞混濁液を移植することで皮膚再構築モデルの作成を行った。胎生マウスから作成した皮膚細胞混濁液を移植することで脂腺、毛包等の皮膚付属器を含めた皮膚再構築が可能であったのに対し、成体マウスから作成した皮膚細胞混濁液では皮膚付属器の再構築は起こらなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞培養を行い、人工皮膚再構築や毛包の再生を行う研究は数多く行われている。細胞培養を行わず皮膚再構築が可能となれば臨床応用の近道となる。今回collagenase 1を使用しマウス皮膚から作成した皮膚細胞混濁液を潰瘍に移植することで皮膚再構築が可能であった。さらに胎生マウスと成体マウスの皮膚細胞混濁液には何らかの違いがあり、それによって皮膚再構築に違いが生じることが分かった。今後この違いについて研究を進め、解明することが出来れば皮膚付属器を含めた皮膚再構築が可能となり、傷あとをなくす治療ができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The most efficient way to create cell suspension from mouse skin is to use collagenase 1 and incubate at 37 °C for 1 hour. We created a skin reconstruction model using a chamber of our own design. We transplanted the cell suspension to skin ulcers on the backs of mice with the chamber. The transplantation of skin cell suspension from embryonic mice enabled skin reconstruction including skin appendages such as sebaceous glands and hair follicles, whereas the transplantation of skin cell suspension from adult mice did not cause skin appendage reconstruction.

研究分野：形成外科学

キーワード：創傷治癒 皮膚細胞混濁液 皮膚再構築 皮膚潰瘍

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

現在、熱傷などの皮膚潰瘍の治療法には植皮術や皮弁形成術などの方法があるが、いずれの方法も瘢痕（傷あと）が残ってしまう。傷跡のない皮膚の再生には表皮及び真皮の再生に加え、毛包や汗腺など皮膚付属器の再生も重要であると考ええる。

表皮及び真皮浅層の細胞を酵素分解した自己皮膚細胞混濁液を潰瘍部に噴霧するシステム（RECELL System：図1）が開発され臨床応用されている。このシステムはドナーの皮膚面積を小さくし、より広い範囲の潰瘍を治療するのに有効であるが毛包や汗腺などの皮膚付属器までは含まれない。そこで皮膚付属器を含めた自己皮膚細胞混濁液を作成し、潰瘍に移植することで皮膚再構築が可能となれば瘢痕なく皮膚を再生できると考えた。

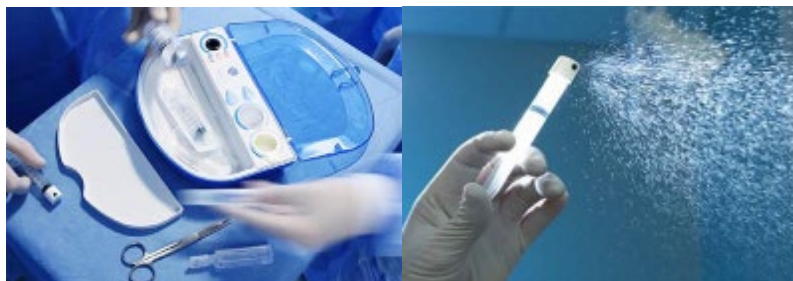


図1：RECELL System

（INDEE Medical 社【AVITA medical 社と提携】ホームページより）

細胞培養を経た人工皮膚再構築や、毛包再生などの研究は盛んにおこなわれているが、臨床応用までの道のりは遠いと言わざるを得ない。そこで本研究では表皮、真皮に加え皮膚付属器を含めた細胞混濁液を作成し移植することで、皮膚付属器を含めた真皮及び表皮の再構築を目指すものである。

### 2. 研究の目的

皮膚から皮膚細胞混濁液を作成し皮膚再構築を行うにあたり、マウスによる動物モデルを確立する。皮膚細胞混濁液の作成方法を、既存の報告を参考に比較検討し、最適方法を探索する。また移植方法についても同様に数種類より比較検討する。その中で皮膚再構築に必要な要素を見つけ出し、ヒトにおける皮膚細胞混濁液による皮膚再構築を目指す。

### 3. 研究の方法

皮膚細胞混濁液の作成方法を、過去の報告から数種類行い比較検討した。過去の文献では、ホモジナイザーのみとする方法や酵素を使用する報告があった。使用する酵素として collagenase、trypsin、dispase やその他各社の製品を使用するなど様々であり酵素反応の時間も4度で overnight するものから 37℃で30分など様々な報告があったため、それらを比較検討した。方法は3種類の酵素を使用して検討した。使用する酵素は Collagenase I (0.1% Collagenase I + 2% BSA)、trypsin-EDTA、STEMxyme（Worthington Biochemical 社製：コラゲナーゼと天然プロテアーゼのミックス）とした。8週齢の C57BL/6J マウス（オス）の背部皮膚を脱毛後 200 mg 採取し剪刀にて homogenise し酵素反応させた。臨床応用を見越して、37℃でインキュベートする方法とした。攪拌しながらインキュベートし30分～120分反応させて回収できた細胞数を比較した。

次に移植モデルの検討を行った。現在毛包の再構築を行う研究は主に chamber、flap、patch 法の3つの方法で行われている（Yanhua L, et al. 2011）。それぞれの移植方法を行い最も適している移植モデルを検討した。

上記の方法による皮膚細胞混濁液による皮膚再構築モデルにおいて、皮膚再構築に必用な条件を検討するため、皮膚を採取するマウスを、胎生14日～8週齢と比較した。C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウスから皮膚採取し、皮膚細胞混濁液を作成した。C57BL/6J マウス（8週齢、オス）の両側背部に 8mm デルマパンチで皮膚潰瘍を作成した。そこに3D プリンターにて自作した chamber を縫着し、2日後潰瘍に皮膚細胞混濁液を移植した。そのまま4週後に回収し組織学的検証を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 皮膚細胞混濁液作成方法の検討

まず Collagenase I と trypsin-EDTA の比較を図 2 に示す。

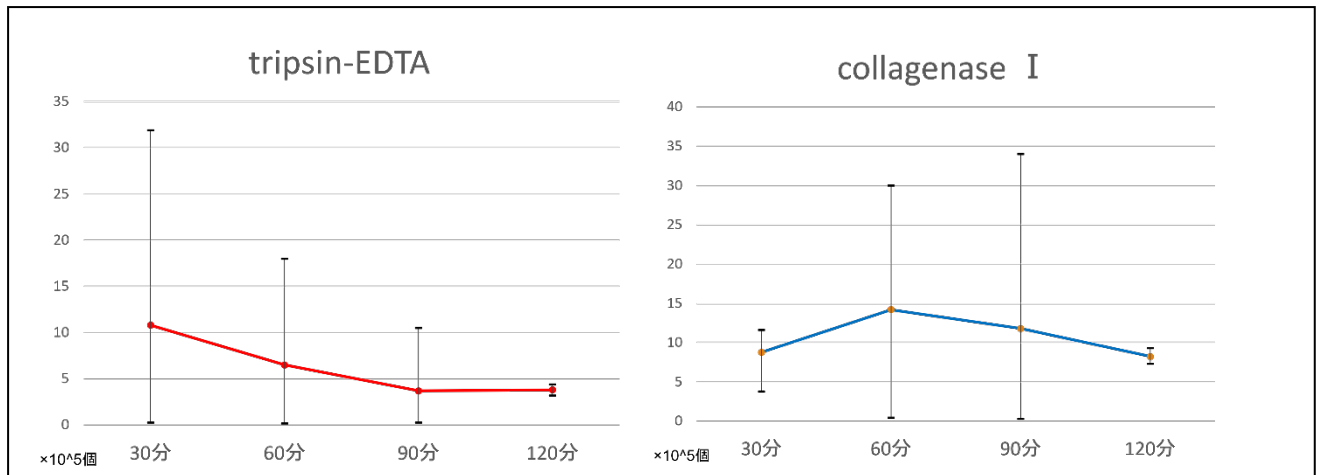


図 2：酵素による皮膚細胞混濁液中の細胞数

多少のばらつきを認めるものの、どちらの酵素を使用しても 60 分をピークに反応時間を長くすると細胞回収効率が低下した。また trypsin-EDTA は Collagenase I と比べると、時間経過による回収率低下が著しく、過去の報告によると細胞表面蛋白に影響する可能性がある (Charles J. Benck et al. 2016)。このことより、Collagenase I を使用し、37 度で 60 分酵素反応させる方法を採用した。さらに追加実験として STEMxyme (Worthington Biochemical 社製：コラゲナーゼと天然プロテアーゼのミックス) を使用した実験も行った。60 分で  $5.19 \times 10^6$  個と回収率は高かった。しかし製品として人体に使用する想定がなされていないこと、高価であることより今回は Collagenase I を採用することとした。

##### (2) 皮膚細胞混濁液移植モデルの検討

移植モデルとして chamber、flap、patch 法に加え、腎被膜下移植法について行い検討した。Flap 法、patch 法は人体の瘢痕部の状況を再現しているとは言い難く、腎被膜下移植法に関しては細胞の生着率も悪く、適していなかった。chamber 法を採用するにあたり、3D プリンターを使用し自作の chamber を作成しマウスの背部に取り付けることで移植モデルとした。chamber を装着後 2 日に皮膚細胞混濁液を移植し、chamber を装着したまま 4 週経過したのち回収するモデルとした。

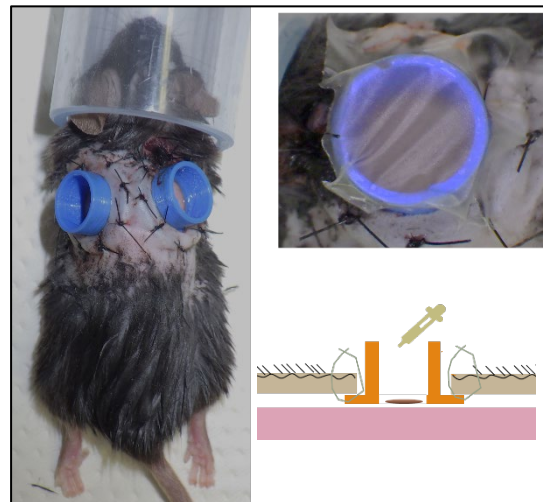


図 3：自作の chamber を使用したモデル

##### (3) 皮膚細胞混濁液による皮膚再構築の検討

移植モデルは上記のものを使用し、採取する皮膚を胎生 14 日から 8 週齢まで比較した。胎児マウスの皮膚から採取した皮膚細胞混濁液のほうが圧倒的に細胞回収率が高かったため、条件をそろえるため  $5 \times 10^6$  個～ $5 \times 10^7$  個となるようにした。移植した細胞が分かるように C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウスから皮膚細胞混濁液を作成した。4 週経過後の状態と、HE 染色、GFP 抗体による免疫染色の結果を図 4 に示す。

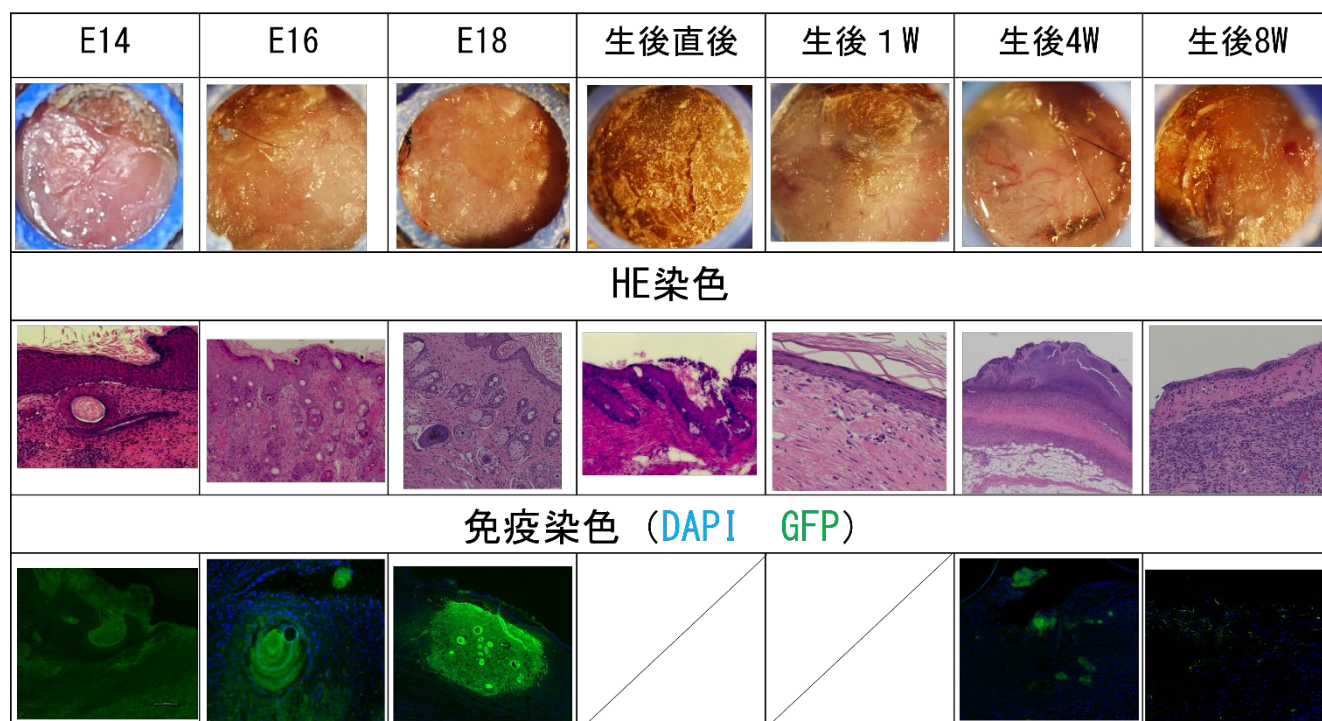


図 4：皮膚細胞混濁液による皮膚再構築

肉眼的には皮膚が再構築しているように見えるが、生後以降の皮膚細胞混濁液では痂皮が多く付着している印象を得られた。GFP 抗体を使用した免疫染色において、GFP 陽性細胞を認め、皮膚細胞混濁液の細胞が生着していることが確認できた。

HE 染色の結果を確認すると驚くべきことに胎児マウス～生後直後のマウスから採取した皮膚細胞混濁液では脂腺、毛包などの皮膚付属器も含めた皮膚が再構築されているのに対し、1 週齢～8 週齢のマウスを使用した皮膚細胞混濁液では上皮化は認めるものの、皮膚付属器の再構築は認められなかった。このことより細胞数ではない原因があり、皮膚再構築が起こらないことが示唆された。その原因が解明できれば、ヒトにおける付属器を含めた皮膚再構築が行える可能性が高いと考えられる。

今回の結果より、細胞培養を経ないで皮膚から細胞混濁液を作成し移植することで皮膚再構築を行うことに成功した。一方、成体の皮膚からは上皮の再構築は行えたが付属器を含めた皮膚再構築は難しいことが判明した。今後の研究により、胎児皮膚細胞混濁液と成体皮膚細胞混濁液の細胞種の違いやタンパク、シグナル伝達の違いなどが解明できればヒトにおいても皮膚付属器を含めた皮膚再構築が可能となると考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|