

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592290

研究課題名（和文） 局所免疫寛容を誘導する同種再構築皮膚の開発に関する基礎研究

研究課題名（英文） Basic research about the development of the allogeneic reconstituted skin equivalent which induces local immunotolerance

## 研究代表者

松本 佳隆 (MATSUMOTO YOSHITAKA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70452977

研究成果の概要（和文）：局所免疫寛容を誘導する同種再構築皮膚を開発するため近交系ラットを用いた基礎研究を行った。ラット皮膚から表皮細胞と線維芽細胞を得、表皮細胞の不死化株（AK-E7）を作製した。これらの細胞を用いて再構築皮膚を作製したところ正常表皮に近い構造を示した。IL-10 cDNAが遺伝子導入された線維芽細胞（AFB-IL10）の培養上清はリンパ球混合試験を抑制した。AK-E7とAFB-IL10で作製した再構築皮膚を自家移植モデルに移植したところ部分的に生着した。

研究成果の概要（英文）：Basic research was performed with inbred rat strain to develop the allogeneic reconstituted skin equivalent inducing local immunotolerance. Keratinocyte and fibroblast was derived from rat skin, and the keratinocyte was immortalized (AK-E7). The reconstituted skin equivalent, using AK-E7 with fibroblast, showed nearly normal histologic epidermal structure. The cultured supernatant of the fibroblast transfected with IL-10 cDNA (AFB-IL10) inhibited mixed lymphocyte reaction. As the reconstituted skin equivalent using AK-E7 and AFB-IL10 was grafted into autograft model, its partial take was recognized histologically.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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

重症広範囲熱傷患者の治療において、同種皮膚移植は救命手技として重要である。同種皮膚移植生着の効果は、広範な組織壊死により失われる体液を阻止し、新しく組織再生を促し、感染を防御することが言われている。しかし、移植免疫のため移植後通常1、2週

間で脱落し患者はまたも生命の危険にさらされる。この移植免疫をなんらかの方法で抑制し同種皮膚移植の生着を延長させることができるならば、その期間に自己の表皮細胞を培養し移植することで重症広範囲熱傷の患者の救命率は上がるものとする。

移植免疫を抑制する方法として全身的な

免疫抑制剤の投与が考えられるが、易感染性である重症熱傷患者には使用しにくい。そこで我々は、抗体を用いての免疫抑制を誘導できないかと考えラットの実験系にて抗 CD4 抗体投与にて免疫抑制効果を確認した (未発表)。しかし、抗体やサイトカインによる免疫抑制効果は代謝が早いため効果の持続性に限界があり期待される効果を得るには不十分であった。他の観点から、局所的な免疫寛容を誘導することはできないかと考え、ラット同種皮膚移植モデルを用いて免疫抑制剤であるタクロリムス (FK506) を軟膏として局所塗布し局所的免疫寛容を誘導できることを報告した (Fujita T, et al. Prolonged survival of rat skin allograft by treatment with FK506 ointment.

Transplantation. 1997; 64: 922-5.)。これら 2 つの観点より、細胞においてより自然であるサイトカインを使用し、局所的で全身状態に影響を与えない免疫寛容が誘導できないかと考えた。前述の抗 CD4 抗体の代わりとして、サイトカインで CD4 の natural ligand である IL-16 を用いて免疫抑制効果を細胞レベルで検討した。遺伝子導入により IL-16 を強制発現したヒト上皮細胞はリンパ球混合試験 (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR) の系において有為に免疫抑制効果を示した

(Fujita T, et al. Immunosuppressive effect on T cell activation by interleukin-16-cDNA-transfected human squamous cell line. Cellular Immunol. 2000; 202: 54-60.)。更に免疫抑制効果があるとされるサイトカイン、IL-10 についても、その併用効果を検討しヒトの上皮細胞を用いた MLR の系において更に効果的に免疫抑制効果を示した (Matsumoto Y, et al. Immunosuppressive Effect on T Cell Activation by IL-16- and IL-10-cDNA-Double-Transfected Human Squamous Cell Line. Burns 2009;32:383-389.)。

同種皮膚は健常ドナーより得られるが、需要は年々増加しているにも関わらず得られる皮膚の量は年々減少している。そのため、いつ、どの施設でも必要な量を使用できるような状態ではないことが問題となっている。

## 2. 研究の目的

最近、幹細胞研究と共に組織工学の技術が進歩し臨床応用への展開が期待されている。特に皮膚の分野では以前より臨床応用され、同種線維芽細胞含人工真皮や自家培養表皮は企業レベルで展開されつつある。この流れから、同種皮膚より得た線維芽細胞および表

皮細胞を大量培養し適切な鋳型に埋入し同種再構築皮膚 (allogeneic reconstituted skin equivalent) を作製することで、同種皮膚の安定した供給が得られ、どの施設でも通常の救命手技として同種皮膚移植が行うことができる。また、我々の基礎研究と合わせて考え、免疫抑制効果のあるサイトカインの cDNA を遺伝子導入し強制発現した皮膚の培養細胞で同種皮膚を再構築できるならば、患者の全身的な免疫能を下げることなく同種皮膚移植の生着を延長でき、結果として重症熱傷患者の救命率を上昇させるものと考ええる。我々の最終的な目的は、局所免疫寛容を誘導する同種再構築皮膚 (immunomodulated allogeneic reconstituted skin equivalent) を開発し一般臨床化することで、現在実際に同種皮膚移植に関し様々な点で問題となっていることを根本から解決することである。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット表皮細胞の不死化株の作製

① ラット皮膚細胞の初代、継代培養  
ラット表皮細胞培養液 (CnT-03, CELLnTEC) を用いて ACI ラットの初代、継代培養を行った。ACI ラット背部皮膚を採取しディスペーゼ処理を行い表皮と真皮を分離後、表皮のみ回収した。次に TrypLE (12605, GIBCO) で処理し表皮細胞を単離しそれを回収後、CnT-03 を用いて初代培養を行った (AK)。90% confluent になった状態で TrypLE で培養フラスコから剥がし、半分量をストックする方法 (population doubling) で継代培養を行った。ラット線維芽細胞は前述のディスペーゼ処理後の真皮成分を細切し、explant culture method にて 10% FCS (10437, GIBCO) 加 DMEM (D6429, SIGMA) を用いて培養した (AFB)。

### ② HPV16E7 cDNA の作製およびラット表皮細胞への遺伝子導入

子宮頸癌細胞株である Caski から mRNA を採取し、HPV16E7 に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い HPV16E7 cDNA を得た。これを発現ベクターである pMXs-puro に組み込み培養したラット表皮細胞 (AK) へ FuGene6 Transfection Reagent (11-815-091-001, Roche) を用いて遺伝子導入した (AK-E7)。遺伝子導入の確認には遺伝子導入細胞の mRNA を採取し先程の HPV16E7 の特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。

### ③ HPV16E7 遺伝子導入細胞の腫瘍形成能 (tumorigenicity)

HPV16E7 を遺伝子導入した表皮細胞 (AK-E7)

を  $1 \times 10^6$  個ずつ免疫不全マウス(ヌードマウス)の背部左側皮下に注射した。反対側に Caski を同数皮下注射し、2ヶ月後背部皮下に腫瘤が形成されるか観察した。

#### (2)免疫抑制性サイトカインの検討

①IL-10 と TGF- $\beta$ 1 の MLR における効果  
ACI、LEW ラットより末梢血を採取し、白血球分離用液 Lympholyte-Rat (CL5045, CEDARLANE) を用いてリンパ球を回収した。ACI ラットから得られたリンパ球をマイトマイシン C で処理し増殖できないようにした (Stimulator)。また LEW ラットから得られたリンパ球はマグネットビーズ (CD45R rat, 130-090-495, Myltenyi Biotec) を用いて B cell を除去し T cell rich の状態にした (Responder)。Responder を 96 穴プレートに  $1 \times 10^5$  個/well ずつ入れ、3 well を一組として各物質 (Bovine serum albumin (BSA)、FK506 (Prograf injection 5 mg, astellas)、Recombinant rat IL-10 (522-RL-005, R&D Systems)、作製 rat TGF- $\beta$ 1) を 1 時間反応させた。その後同数の stimulator を加え、4 日間インキュベーター内で培養した。リンパ球の数を WST-1 assay を用いて計測した。

#### ②IL-10 と TGF- $\beta$ 1 の表皮細胞、線維芽細胞に対する増殖への影響

ラット表皮細胞不死化株 (AK-E7) と線維芽細胞 (AFB) をそれぞれ 20% コンフルエントとなるように 96 well plate (flat bottom) に蒔き、培養液中にそれぞれ agent (BSA, TGF- $\beta$ 1, IL-10) を加え 37°C、5%CO<sub>2</sub> でインキュベーター内にて培養した。培養後 0, 3, 7 日目に WST-1 assay を行い、生細胞を計測した。

#### ③IL-10 cDNA の作製およびラット皮膚由来細胞への遺伝子導入

rat の脾臓からリンパ球を分離し PHA で増殖刺激を与えてから mRNA を抽出した。Rat IL-10 に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い IL-10 cDNA を得た。これを発現ベクターである pcDNA3.1neo に組み込み、ラット表皮細胞不死化株 (AK-E7) とラット線維芽細胞 (AFB) へ FuGene6 Transfection Reagent を用いて遺伝子導入した。今後の研究のコントロールとするため発現ベクターのみを遺伝子導入した細胞も作製した。

#### ④IL-10 遺伝子導入細胞からの IL-10 産生とその効果

遺伝子導入細胞から培養上清を採取し、rat IL-10 ELISA kit (R1000, R&D Systems) を用いて、培養上清中に含まれる IL-10 の濃度を測定した。これら培養上清を用いて MLR を行った。

#### (3)再構築皮膚の作製と移植

##### ①再構築皮膚の作製

I 型コラーゲン溶液を 8 mL、10×MEM 溶液を 1 mL、FCS を 1 mL、1M HEPES 溶液を 0.4 mL、1M NaHCO<sub>3</sub> 溶液を 0.4 mL の割合で混ぜ、ラット線維芽細胞 (AFB) を  $1 \times 10^5$  個/ml となるよう上記混合液に混ぜた。細胞含有溶液を 60mm 培養皿に 10 mL 流し込み、これをインキュベーター内 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) で 2 時間培養しゲル化させた。100mm 培養皿に 10%FCS 加 DMEM を 10 mL 注いでおき、先程作製した細胞含有ゲルを入れた。37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養し 3、4 日毎に培養液を交換した。AFB 三次元培養後 1 週目に、CnT-03 と 10%FCS 加 DMEM を等量混和した培養液に変更し 2 時間培養後、CnT-03 のみの培養液に変更更に 2 時間培養した。AFB 三次元培養ゲルの上にラット表皮細胞不死化株 (AK-E7)  $1 \times 10^6$  個の細胞懸濁液を注ぎ共培養を行った。共培養開始から 2 日目に AK-E7 を分化させるため、培養液は CnT-03 と 10%FCS 加 DMEM を等量混和した培養液に変更しアスコルビン酸 (最終濃度 50 $\mu$ g/ml) を加え、空気暴露による表皮細胞の角化誘導を行った。共培養開始から 7 日目にゲルを回収し組織学的検索を行った。

##### ②再構築皮膚の自家移植モデルへの移植

上記①の方法にて再構築皮膚を作製した。ACI ラットに麻酔をかけ、背部皮膚を矩形状に皮切し肉様膜下に剥離し挙上した。筋膜上に再構築皮膚を乗せ、シリコンシートをかぶせて 5-0 ナイロンにてシリコンと筋層を縫合した (Fig. 1)。挙上していた皮膚をかぶせ、5-0 ナイロンにて皮膚同士を縫合し閉創した。一週間後、同じ部位を皮切し移植した再構築皮膚の観察および生検を行った。

Fig. 1

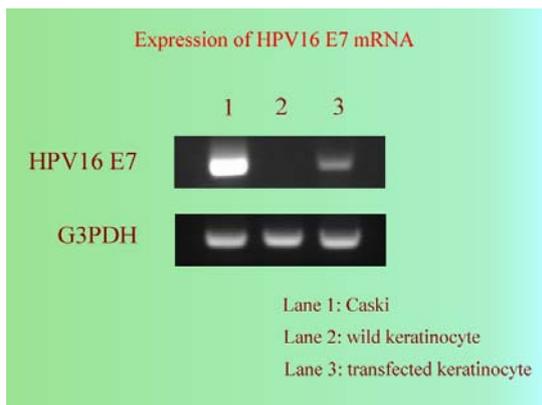


#### 4. 研究成果

同種移植モデル実験として近交系ラット系の組 (ACI rat と LEW rat) を用いた。これら系同士の移植時の免疫応答は、ヒトの同

種移植における反応と同程度と言われている。ACI rat から皮膚を採取し、皮膚を構成する主な2種類の細胞である表皮細胞と線維芽細胞の初代培養を行った。線維芽細胞 (AFB) は explant culture method にて初代培養に成功し、50 継代以上の培養を行えることを確かめた。表皮細胞 (AK) については初代培養には成功するが 10 継代程度しか培養ができなかったため、不死化株を作製することを計画した。ラットの細胞を不死化させるには HPV16E7 cDNA を遺伝子導入することが知られている (Yamashita T, et al. Both of the N-Terminal and C-Terminal Regions of Human Papillomavirus Type 16 E7 are Essential for Immortalization of Primary Rat Cells. JID SYMPOSIUM PROCEEDINGS. 2001; 6(1): 69-75.)。HPV16E7 を発現している子宮頸癌株 Caski より cDNA を得て発現ベクターに組み込み、これを AK に遺伝子導入し、その発現を RT-PCR で確認した (Fig. 2A)。

Fig. 2A

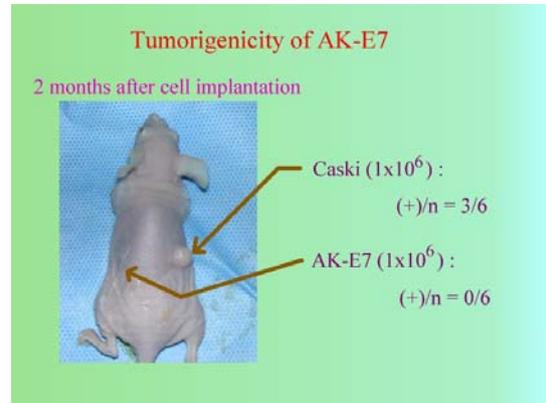


HPV16E7 が遺伝子導入された場合の細胞における影響は、理論的には増殖能が上昇する。実際に population doubling の方法で継代培養をしていくと、Wild の表皮細胞を用いて継代を行うには 5~7 日程度日数がかかるが、この遺伝子導入された細胞は 3~4 日程で継代できた。また、wild type では 10 数継代しか培養できなかったが、少なくとも 30 継代までは培養できることを確認した。この遺伝子導入表皮細胞を AK-E7 と名づけた。

HPV16E7 の遺伝子導入における問題点として癌化との関連が挙げられる。そこで Caski を陽性コントロールとして AK-E7 の腫瘍形成能を調べてみることにした。Caski と AK-E7 をヌードマウス背部へ皮下注射し、腫瘍を形成するかみてみたところ (Fig. 2B)、細胞 Caski を注射した側は腫瘍形成することもあ

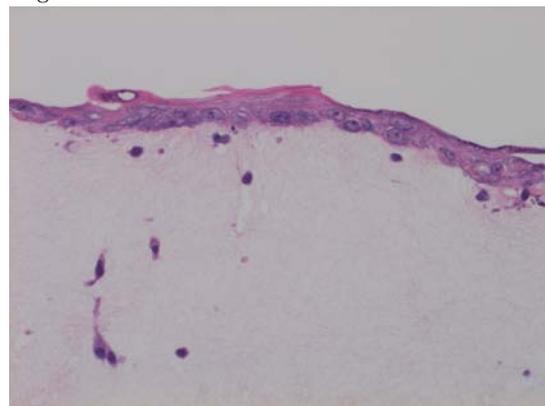
ったが (n=3/6)、AK-E7 を注射した側は腫瘍形成を認めなかった (n=0/6)。AK-E7 は腫瘍形成能を示さなかったことから、癌化による不死化ではないものと考えた。

Fig. 2B



次に AK-E7 を用いて再構築皮膚の作製を計画した。通常の培養表皮細胞は分化を誘導した場合、正常皮膚と同様な分化を示すが、AK-E7 が通常の分化を示すか二層性人工皮膚を作製して確かめることとした。二層性 (表皮と真皮) を作製する理由の一つとして、一層性 (表皮細胞のみ) が基底膜を欠如しており外力に対して脆弱であることが臨床的に問題点として挙げられているからである。臨床的使用に耐えうるものを作製することが目的のため、二層性培養皮膚の作製を選んだ。AK-E7 と AFB の共培養後 1 週間目に再構築皮膚を回収し組織標本としたところ、AK-E7 は重層化し角化も認められた (Fig. 3)。正常皮膚として機能する可能性が示唆された。

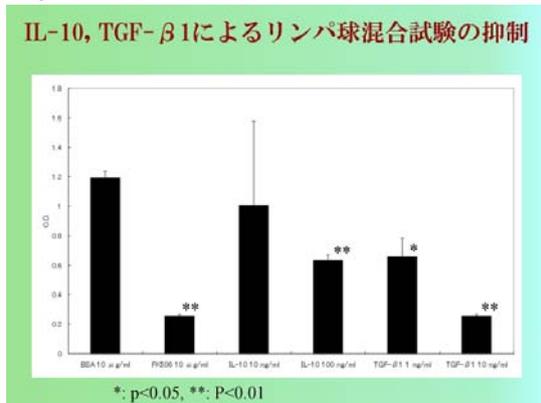
Fig. 3



次にこの再構築皮膚へ免疫寛容を促す機序を組み込む計画をした。以前の論文でサイトカイン IL-16、IL-10 の免疫抑制能を示したが、IL-16 はヒトの系における MLR 上 IL-10 程の免疫抑制効果は示さなかったことと、ラットの系では有為差を持っては MLR を抑制し

なかった（未発表）ことから、今回は対象から外した。最近の同種肝移植に関する論文で TGF- $\beta$ 1 が強い移植免疫抑制性サイトカインとして脚光を浴びているため、これを対象に加えて IL-10 と TGF- $\beta$ 1 の免疫抑制能に関して、ラットの系で MLR を用いて評価した。Fig. 4 に示すように、IL-10 及び TGF- $\beta$ 1 は投与量依存性に rat MLR を抑制した。

Fig. 4



サイトカインは細胞別に様々な効果を発現することがあり、培養細胞の増殖へ影響を及ぼすこともある。そこで、表皮細胞と線維芽細胞に対する IL-10 と TGF- $\beta$ 1 の細胞増殖における反応を調べた。WST-1 assay にて表皮細胞と線維芽細胞の増殖曲線を作製し、サイトカインの種類・有無でこの曲線が変化するか評価した (Fig. 5)。

Fig. 5A

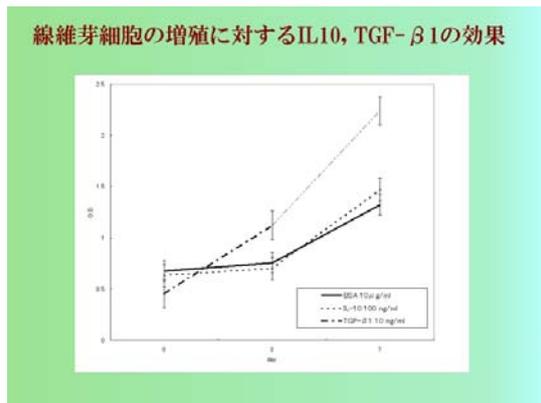
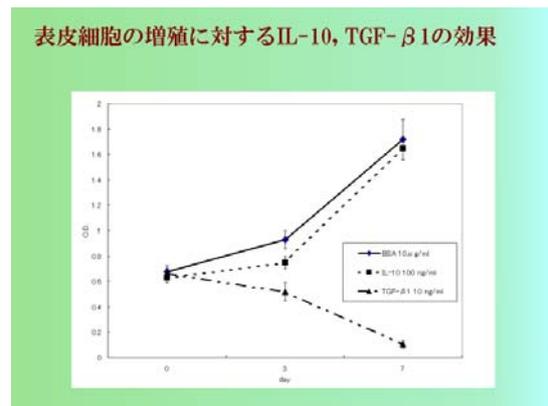


Fig. 5B



IL-10 はいずれの細胞に対しても明らかな増殖抑制は示さなかった (Fig. 5)。しかし、TGF- $\beta$ 1 は線維芽細胞に対しては増殖抑制効果を示さないが (Fig. 5A)、表皮細胞に対しては著明な増殖抑制効果を示した (Fig. 5B)。したがって、IL-10 は表皮細胞、線維芽細胞いずれにも遺伝子導入細胞が作製できる可能性があるが、TGF- $\beta$ 1 は表皮細胞には遺伝子導入できない可能性が高いと推察した。また、再構築皮膚を作製する際に、TGF- $\beta$ 1 を分泌する線維芽細胞で真皮部分を作製すると上層（表皮部分）の表皮細胞がうまく増殖分化できない可能性も示唆された。そこで、IL-10 のみを分泌する表皮細胞と線維芽細胞を作製することとした。

IL-10 を発現するベクターは、表皮細胞に既に pMXs-puro を遺伝子導入しているため Geneticin 耐性遺伝子を含むベクターとした。pcDNA3.8-neo を発現ベクターとして使用し、rat IL-10 cDNA をインサートとして組み込んだ。表皮細胞 (AK-E7) と線維芽細胞 (AFB) どちらにも遺伝子導入を試みた。表皮細胞は Geneticin に対する感受性が強いいためか、AK-E7 には遺伝子導入されなかった。耐性遺伝子を変更し再度試みる予定である。線維芽細胞には遺伝子導入され (AFB-IL10 と名づける)、培養上清中の rat IL-10 の分泌量は rat IL-10 ELISA kit を用いて測定すると約 1 ng/mL あった。インサートがない pcDNA3.8neo ベクターのみを AFB へ遺伝子導入した細胞 (AFB-pcDNA と名づける) からは rat IL-10 の分泌を認めなかった。これらの細胞を用いて今後の免疫抑制試験の検討を進めることとした。まずは、両方の培養上清を用いて MLR を行った。

Fig. 6

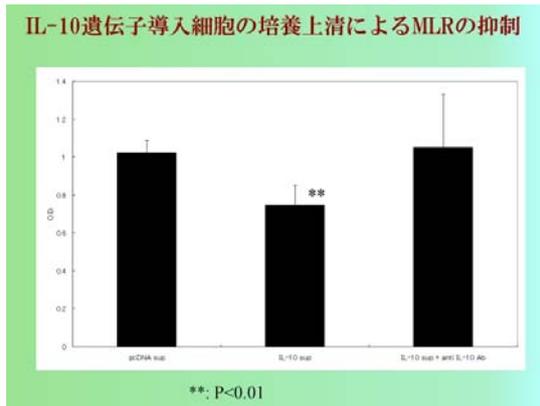


Fig. 6に示すとおり AFB-IL10 の培養上清を加えた群は AFB-pcDNA の培養上清を加えた群と比較し有意に MLR を抑制した。また、AFB-IL-10 の培養上清に抗 IL-10 抗体を加えて中和させると、この MLR の抑制が解除された。ゆえに、この MLR の抑制は AFB-IL10 から産生される IL-10 による作用と考えられた。

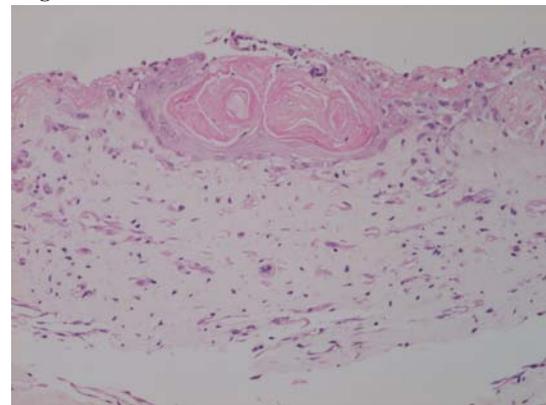
この AFB-IL10 と上述した AK-E7 を組み合わせて二層性培養皮膚を作成し、ラット自家移植モデルへ移植し生着するか組織学的に検討した。AK-E7 と AFB-IL10 を用いて再構築皮膚を作製し、これを ACI ラット皮下へ埋入し周囲と癒着しないようシリコン膜で被覆後、皮膚縫合を行った。この再構築皮膚は鋳型にコラーゲンゲルを用いているので固定性に乏しく、また乾燥および感染にも弱いと考えられたので皮下埋入の形態を試みた。移植後 1 週間目に背部皮下を観察し (Fig. 7A)、移植片が残存していたのでこれを採取し組織学的 (HE 染色) に検討した (Fig. 7B)。自家移植モデルにおいて Fig. 7B に示すように表皮細胞および角化が認められたが、炎症細胞浸潤に伴う肉芽化と炎症所見が著明であった。これはシリコン膜に対する生体の異物反応と考えられた。一部ではあったが再構築皮膚は残存、生着したと考えられた。

今後はこの再構築皮膚作製における組織工学の手法及び、移植技術をより一層検討する必要があると思われる。同種移植の検討は、自家移植モデルでほぼ全生着するような安定した技術を開発してから行うことが望ましいと考えている。これらの技術開発における進歩発展は、重症熱傷患者への治療を含め、将来的な再構築皮膚を用いた臨床医療へ貢献するものと考えている。

Fig. 7A



Fig. 7B



## 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 1 件)

松本佳隆、局所免疫寛容を誘導する同種再構築皮膚の開発を目指して、第 7 回札幌形成外科研究会、平成 23 年 10 月 22 日、札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本佳隆 (MATSUMOTO YOSHITAKA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70452977

### (2) 研究分担者

四ッ柳高敏 (YOTSUYANAGI TAKATOSHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70250595