

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08845

研究課題名(和文) 他家細胞を用いた機能強化型積層細胞シートによる難治性皮膚潰瘍の治療法の開発

研究課題名(英文) Development of enhanced multilayered cell sheets using allogeneic cells for treatment of refractory cutaneous ulcers

研究代表者

柳原 正志 (Yanagihara, Masashi)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：40379954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：難治性皮膚潰瘍に対する治療法として、機能強化した他家積層線維芽細胞シートを開発した。細胞シート作製時に成長因子を添加し、従来の積層細胞シートに比べ、VEGFやHGFの産生量が高く、生細胞数が増加し、厚みが増したシートとなった。マウス皮膚潰瘍モデルでの治療効果の検討では、創傷治癒早期において機能強化した他家積層細胞シート貼付群は無治療群に比べ、有意に高い創閉鎖率を示した。治癒直後の瘢痕組織中にCD3陽性のリンパ球の集積を認めたものの、強い拒絶反応は示さず、創傷治癒の効果に影響を与えなかった。本研究より、機能強化した他家積層細胞シートは難治性皮膚潰瘍に対する有用な治療法となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自家細胞を用いた細胞シート移植治療は理想的な治療法ではあるが、患者自身の線維芽細胞の機能低下のため細胞シートを作製できない症例が存在する。そのため、本治療法の実用化には、コストを抑え、高品質かつ安定供給可能な同種・他家細胞シートが必要である。機能強化した他家積層線維芽細胞シートは、従来の積層細胞シートに比べ、シートの厚みが増し、創傷治癒に必要な成長因子の分泌能が向上した。マウスでの治療実験から機能強化した他家積層線維芽細胞シートは創傷治癒過程を促進し、治療効果を有することが示された。

研究成果の概要(英文)：We developed an enhanced allogeneic multilayered fibroblast sheet as a treatment for refractory cutaneous ulcers. By adding growth factors during cell sheet production, the sheets produced higher amounts of VEGF and HGF, increased the number of viable cells, and became thicker compared to conventional cell sheets. In an experiment of therapeutic effect in a mouse skin ulcer model, the wound closure rate was significantly higher in the group treated with the enhanced allogeneic multilayered cell sheets than in the untreated group (control) in the early stage of wound healing. Although there was an accumulation of CD3-positive lymphocytes in the scar tissue of the allogeneic multilayered cell sheet-treated groups immediately after healing, they did not show strong rejection and did not affect the effect of wound healing. These data suggest that enhanced allogeneic multilayered fibroblast cell sheets may be a promising therapeutic material for refractory cutaneous ulcers.

研究分野：細胞シート移植治療

キーワード：細胞シート 難治性皮膚潰瘍 他家細胞移植治療 再生医療

1. 研究開始当初の背景

本邦では約130万人の難治性皮膚潰瘍患者が存在し、既存の治療法では治癒しない症例、再発を繰り返す症例が多くあり、新たな治療法の開発が望まれている。我々は各種成長因子を分泌する末梢血単核球と、皮膚の基質となる線維芽細胞から成る細胞混合シートを開発し、「難治性皮膚潰瘍に対する培養ヒト自己細胞混合シートを用いた移植治療に関する臨床試験(第Ⅰ相試験)」を実施した。末梢血単核球とヒト口腔組織由来線維芽細胞を共培養した自家積層細胞混合シートを下肢皮膚潰瘍部に移植し、個々の症例に対する評価で安全性と創傷治癒効果を認めた。しかし、自家細胞を用いるため、組織採取の侵襲性、細胞培養に要する時間や高額な費用という課題がある。さらに、自家細胞を用いた同臨床試験から、患者自身の線維芽細胞の機能低下が高率にみられ、細胞シート作製に至らず治療の機会を逸するという新たな問題点が明らかになった(*Am J Transl Res.* 2021;13:9495-9504.)。自家細胞を用いた細胞シート移植治療は理想的な治療法ではあるが、広々臨床に普及させるためには、コストを抑え、高品質かつ安定供給可能な他家細胞で作製した細胞シートが必要である。

我々は独自の方法で線維芽細胞を積層化させた積層細胞シートを開発してきた。動物モデルによる他家細胞移植治療実験では、他家の積層細胞シートは移植片として永久的には生着しないこと、強い拒絶反応を示さず、自家の積層細胞シートと同等の治療効果を発揮し得ること、を確認している(*Am J Transl Res.* 2020;12:2652-2663.)。これは他家細胞シート移植療法の安全性と有効性を裏付けるものである。このように、細胞シート移植治療の臨床応用を見据えると、安定供給可能な他家細胞から作製した細胞シートが最善のアプローチと考えられる。しかしながら、これまでの自家移植(マウス皮膚潰瘍モデル)の検討では、末梢血単核球を含まない積層細胞シートは治療効果を有するが、細胞混合シートに比べるとその効果は弱い。そのため、積層細胞シートの創傷治癒促進作用の強化が他家細胞シートの臨床応用に向けた重要な課題である。我々の開発した自家細胞シートの細胞混合シートは、末梢血単核球との共培養により活性化した線維芽細胞から VEGF、HGF 等の産生が飛躍的に上昇し、そのパラクライン効果により血管新生を促し、皮膚潰瘍の早期の創傷治癒を促進することを報告している(*Cell Physiol Biochem.* 2018;47:201-211.)。そこで、末梢血単核球と同等の効果を有する活性化因子を補充することで積層細胞シートの機能を高めることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性皮膚潰瘍に対する他家細胞シート移植治療のために、末梢血単核球の代わりに成長因子を補充し、機能強化した積層線維芽細胞シートを開発することである。

3. 研究の方法

(1) 積層細胞シートの作製

マウスの尾を採取し、コラゲナーゼ処理後、AIM-V + 10% FBS 培地を用いて線維芽細胞を単離・培養した。末梢血単核球は Lympholyte-M を用いてマウス末梢血から比重遠心法で分離した。1×10⁶/mL に調製した末梢血単核球を 48 時間培養した培養上清を回収し、馴化培地とした。積層細胞シート作製用培地に成長因子または馴化培地を添加し、2.5×10⁵/mL に調整した線維芽細胞懸濁液を 2mL ずつ 24 ウェルプレートに播種し、3 日間培養した。培養後、上清を除去し、PBS(-) でリンスし、Dispase (10PU/mL) を用いて細胞シートを培養皿から剥離して、積層細胞シートとした。細胞混合シートは既報(*Cell Physiol Biochem.* 2018;47:201-211.) に従い、作製した。

(2) VEGF、HGF の測定

細胞シート培養後の培養上清を採取し、上清中の VEGF、HGF を ELISA 法で測定した。

(3) 細胞シートの生細胞数の検討

方法(1)に従って作製した細胞シートを剥離せずに、生細胞数を測定した。各ウェルの培地を除去後、MTS 含有培地(新鮮培地 + 20% MTS 試薬)を 500μL 加え、1 時間インキュベート後、490nm の吸光度を測定し、積層細胞シートの値と比較し、相対的生細胞数を求めた。

(4) 糖尿病マウス全層皮膚欠損モデルでの治療効果の検証

雄の C57BL/6 マウスにストレプトゾトシン(STZ)を 5 日間連日腹腔内投与した。STZ 投与後 9 日目および 10 日目の血糖値が 300 mg/dL 以上であるものを糖尿病マウスと定義した。糖尿病マウスに 2% イソフルランによる吸入麻酔を施行し、生検パンチを用いて背側正中に 6mm の全層皮膚欠損創を作製し、無治療群、C3H/He マウス由来積層細胞シート、C3H/He マウス由来機能強化積層細胞シート(成長因子+)の 3 群で治療効果を検証した。治療開始 1 日、3 日、5 日、7 日、9 日、11 日、13 日後の創傷治癒率を計測し、各群の経時的な治療効果を比較した。

(5) 組織学的解析

治癒後のマウスの皮膚組織を採取し、10%ホルマリン中性緩衝液で固定後、パラフィン包埋切片を作製し、HE 染色と蛍光免疫染色に用いた。免疫染色では、脱パラフィンした切片は抗原賦活化後、ブロッキング処理した。一次抗体として抗 CD3 抗体(Abcam)を、二次抗体として抗 rabbit IgG H&L (DyLight550, Abcam)を用いた。細胞核の染色には DAPI を使用した。

4. 研究成果

(1) 積層細胞シートの機能強化の検討

成長因子を添加して積層細胞シートを作製することで、培養上清中の VEGF、HGF 量が増加し、産生能が細胞混合シートと同等またはそれ以上に強化された (図 1)。また、細胞シート中の生細胞数が有意に増加していた (図 2)。細胞シートの組織標本の HE 染色の観察から、シートの厚みが増していた。末梢血単核球の代わりに成長因子を添加して積層細胞シートを作製することで、積層細胞シートの機能が強化された。

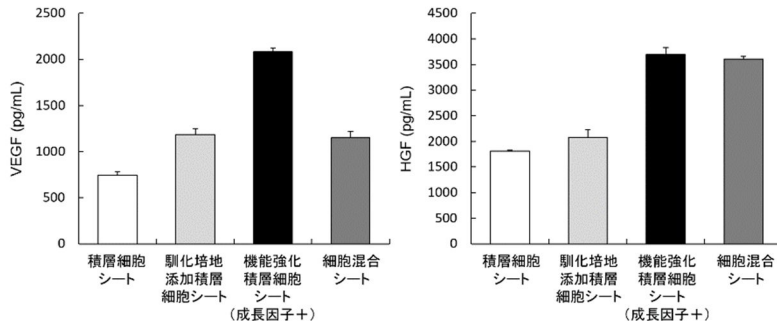


図 1 各細胞シートの培養上清中の VEGF、HGF 量の比較

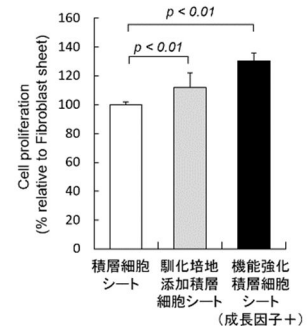


図 2 細胞シート中の生細胞数の比較

(2) マウス皮膚潰瘍モデルにおける機能強化他家積層細胞シートの治療効果

機能強化した他家積層細胞シートの皮膚潰瘍に対する治療効果を検証するため、糖尿病マウスの背部に皮膚全層欠損創を作製し、他家積層細胞シートを移植した。図 3 のように、機能強化した他家積層細胞シート貼付群では、治療開始 3 日目において無治療のコントロール群よりも有意に高い創閉鎖率を示した。治療開始 7 日目において細胞シートを用いて治療した 2 群は無治療のコントロール群よりも有意に高い創閉鎖率を示した。図 4 のように、治癒直後 (治療開始 15 日目) の他家積層細胞シート群では、癒痕組織中に CD3 陽性のリンパ球の集積を認めなかったものの、強い拒絶反応は示さず、創傷治癒の効果に影響を与えなかった。治癒後の遠隔期 (治療開始 28 日目) では、リンパ球の集積を認めなかった。

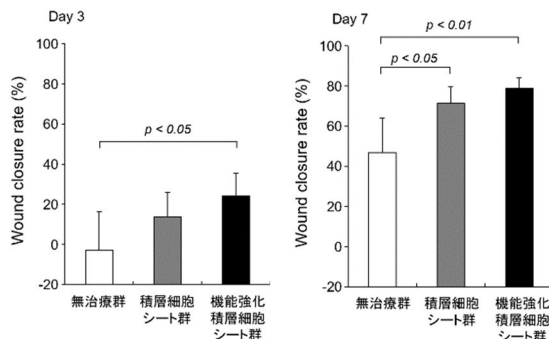


図 3 機能強化した他家積層細胞シートの治療効果

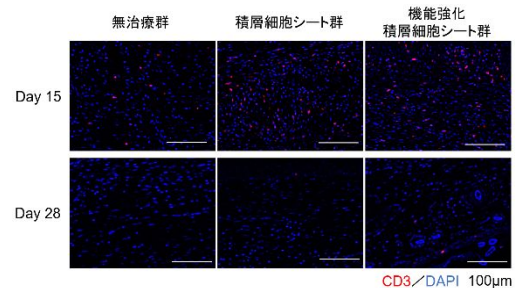


図 4 治癒組織への CD3 陽性細胞の集積

本研究から、成長因子の補充により積層線維芽細胞シートの VEGF、HGF 産生能が強化され、創傷治癒過程を促進することが示された。機能強化した他家積層線維芽細胞シートは難治性皮膚潰瘍に対する有用な治療法となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yanagihara Masashi, Matsuno Yutaro, Ueno Koji, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Tanaka Toshiki, Hamano Kimikazu	4. 巻 35
2. 論文標題 Fibroblasts are the most suitable cell source for regenerative medicine due to their high intracellular fibroblast growth factor 2 content	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2023.101510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Naohiro Yamamoto, Koji Ueno, Masashi Yanagihara, Hiroshi Kurazumi, Yuya Tanaka, Atsunori Oga, Mototsugu Shimokawa, Eijiro Harada, Toshiki Tanaka, Kimikazu Hamano	4. 巻 15
2. 論文標題 Allogenic multilayered fibroblast sheets promote anastomotic site healing in a rat model of esophageal reconstruction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 3217-3228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Soichi Ike, Koji Ueno, Masashi Yanagihara, Takahiro Mizoguchi, Takasuke Harada, Kotaro Suehiro, Hiroshi Kurazumi, Ryo Suzuki, Tomoko Kondo, Tomoaki Murata, Bungo Shirasawa, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano	4. 巻 14
2. 論文標題 Cryopreserved allogenic fibroblast sheets:development of a promising treatment for refractory skin ulcers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 3879-3892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsuno Yutaro, Yanagihara Masashi, Ueno Koji, Saito Toshiro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Katsura Shunsaku, Oga Atsunori, Hamano Kimikazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Dry preserved multilayered fibroblast cell sheets are a new manageable tool for regenerative medicine to promote wound healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-16345-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳原正志、松野祐太郎、上野耕司、齋藤寿郎、蔵澄宏之、鈴木亮、桂春作、小賀厚徳、濱野公一
2. 発表標題 組織修復・再生療法での普及を目指した乾燥積層線維芽細胞シートの開発
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上野耕司、蔵澄宏之、柳原正志、溝口高弘、原田剛佑、森景則保、濱野公一
2. 発表標題 miR-709はGSK3B抑制およびFGF2上昇により血管新生を促す
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 乾燥細胞シート及び乾燥細胞シートの作製方法	発明者 濱野 公一、柳原 正志、上野 耕司、松野祐太郎	権利者 国立大学法人 山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-077772	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞シートを培養基材から剥離する方法及び細胞シートの作製方法	発明者 柳原正志、濱野公一、上野耕司	権利者 国立大学法人 山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-177899	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	濱野 公一 (Hamoano Kimikazu) (60263787)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	

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
---------	---------