

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659782

研究課題名(和文)腫瘍細胞を含む切除組織からの脱細胞化および再移植方法の検討

研究課題名(英文)Preparation of the acellular dermal matrix from the skin of giant melanocytic nevi

研究代表者

森本 尚樹 (MORIMOTO, Naoki)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：40378641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：巨大色素性母斑治療を目的として、皮膚及び母斑組織の脱細胞化する方法、つまり組織から細胞をすべて取り除く方法の検討を行った。高張食塩水、界面活性剤(SDS)、酵素(トリプシン)を用いた方法、高圧を用いた方法を検討した。どの方法でもあきらかな組織損傷はなかった。界面活性剤が最も効率よく脱細胞化できたが組織になんらかの毒性が残存している可能性があった。高圧を用いた方法でも皮膚の脱細胞化が可能であり今後臨床応用が期待できると思われた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we prepared the acellular dermal matrix from the skin of giant melanocytic nevi using hypertonic saline (1 N NaCl), 0.05 % trypsin, 0.1 % SDS (sodium dodecyl sulfate), and high-hydrostatic pressurization (HHP). No obvious damage to dermis was observed in all methods. SDS could decellularize skin easily, however it had cytotoxicity to prevent the attachment of cells. HHP was also useful for decellularization and it could be applied in a clinical application.

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：再生医学 脱細胞化 皮膚

1. 研究開始当初の背景

色素性母斑は、小さいものは一般に「ほくろ」と呼ばれる黒褐色のあざであり、真皮中に存在する腫瘍細胞（母斑細胞）がメラニン色素を産生するために生じる。出生2万人に一人と言われる巨大色素性母斑患者（20cm以上、体表2%以上などと定義）では悪性黒色腫の発生頻度が8%程度あるとされ、外観上の問題と共に生命予後に関しても問題となる疾患である。治療は外科的切除が基本となるが、巨大なもの程移植できる健全皮膚が不足するために完全切除は困難である。これ以外では、生後早期に皮膚表層の母斑細胞を切除するキュレタージュ、レーザー治療などが行われるが、いずれの方法も母斑細胞を完全に除去することはできない。再生医療（細胞治療）を用いた治療も散見されるが、現状の再生医療では真皮が十分に再生できないため、やはり完全な母斑組織の切除は不可能である。母斑細胞が残存する現状の治療では、母斑の再発や悪性腫瘍の発生の可能性を常に考慮する必要があり、患者・医療者両者にとって大きな負担となっていた。

2. 研究の目的

組織内の細胞を除去する脱細胞化（無細胞化）には、界面活性剤、高張食塩水、細胞解離剤、アルカリ、凍結融解などを用いる様々な方法がある。界面活性剤を用いる方法が最も脱細胞効果が高いとされるが、界面活性剤は組織に結合、残存し、取り除くのが困難なため、臨床使用するには安全面での課題が残る。我々は超高压法による脱細胞化技術に注目した。本法は高压を利用し組織内の細胞を完全に破壊する方法であり、薬剤を用いないために安全性が高い方法であると考えられた。本研究においては以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) 皮膚及び母斑組織から脱細胞化について、今まで報告のある種々の方法を行い、完全に母斑細胞を除去可能で、組織損傷の少ない方法を確認、確立する。

(2) 皮膚及び母斑組織を脱細胞化した組織を足場として用いて培養皮膚を作成する。

(3) 脱細胞化組織の臨床応用方法を確立する。

3. 研究の方法

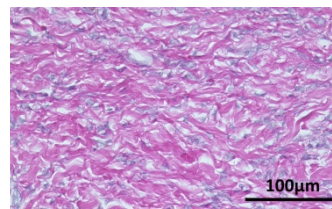
本研究では、正常皮膚検体および母斑組織からの組織損傷の少ない脱細胞化方法を検討する。具体的には、高張食塩水（1N）、界面活性剤である0.1%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、0.05%トリプシン、超高压法を用いて検討する。脱細胞化については、組織切片（HE標本、電顕）および組織内残存DNA量を測定し評価する。組織損傷については、ヘマトキシリンエオジン組織切片を用いてコラ

ーゲン線維・弾性線維の損傷評価、表皮基底膜、血管などを免疫染色で確認、比較する。また、脱細胞化が確認できた組織（正常皮膚、母斑組織）をヌードマウス背部皮下へ移植し、6ヶ月経過を観察し、腫瘍性変化の有無・腫瘍細胞の残存の有無を組織切片で確認する。

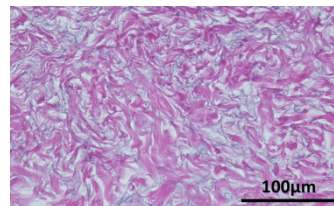
4. 研究成果

(1) 高張食塩水（1N）、0.1%SDS、0.05%トリプシンを用いた母斑組織の脱細胞化の検討

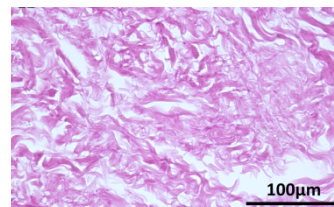
母斑組織を上記の薬剤で48時間処理し、14日間洗浄した後のヘマトキシリンエオジン組織切片を示す。



1N 食塩水

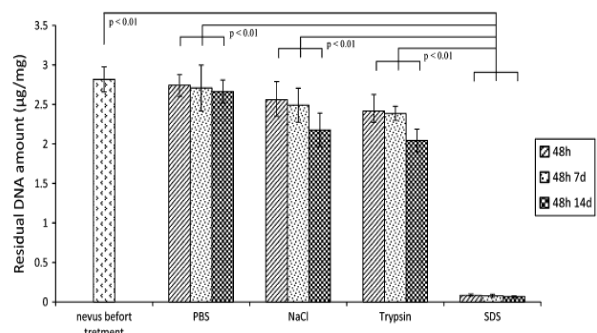


0.05%トリプシン



0.1%SDS

1N食塩水（1N）、0.05%トリプシンでは14日間の洗浄後も細胞（核）が残存していたが、0.1%SDSで処理した組織では核は確認できなかった。

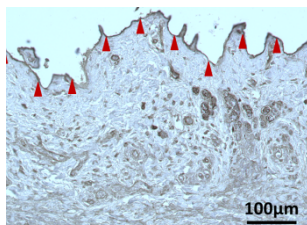


組織内の残存DNA量の定量を行った結果、SDS処理群では48時間処理をした時点で細胞は

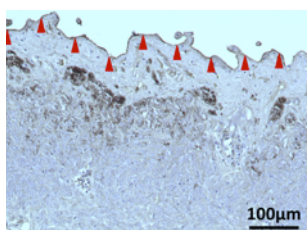
ほぼ除去されていることが確認された。1N 食塩水、0.05%トリプシンでは 14 日の洗浄後も細胞核 (DNA) は残存していた。正常皮膚を用いても同様の結果であった。

(2) 表皮基底膜免疫染色 (抗タイプ IV コラーゲン免疫染色)

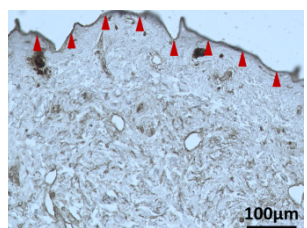
14 日洗浄した各組織の表皮基底膜を抗タイプ IV コラーゲン免疫染色を用いて染色した。



1N 食塩水



0.05%トリプシン

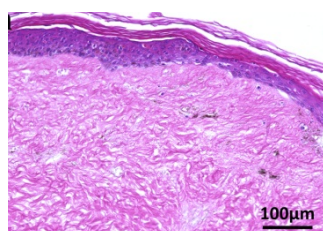


0.1%SDS

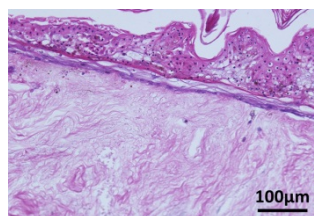
上記切片いずれにおいても基底膜は染色された、また真皮構造にも明らかな損傷は確認されなかった。正常皮膚を用いた場合も同様の結果であった。

(3) 母斑組織を脱細胞化した組織を足場として用いて培養皮膚作成

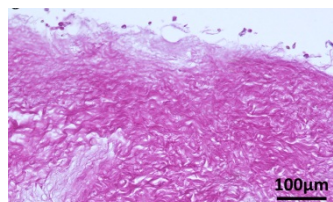
48 時間処理、14 日間洗浄した組織上に培養表皮を移植し、5 日間気液界面培養をおこなった。それぞれのヘマトシキリンエオジン組織写真を示す。



1N 食塩水



0.05%トリプシン



0.1%SDS

1N 食塩水、0.05%トリプシンで処理した検体では、培養表皮が生着したが、0.1%SDS で処理した組織では生着しなかった。SDS (界面活性剤) が最も効率よく脱細胞化できたが組織になんらかの毒性が残存している可能性があると考えられた。

(4) 高圧処理について

高圧処理について、100MPa から 1000MPa まで皮膚あるいは母斑組織を加圧した。この結果、超高圧 (1000MPa) 処理を行うと、組織内の細胞活性消失することを確認した。

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 1 件)

① Liem PH, Morimoto N, Ito R, Kawai K, Suzuki S. Autologous skin reconstruction by combining epidermis and acellular dermal matrix tissue derived from the skin of giant congenital melanocytic nevi. *J Artif Organs*. 2013 Sep;16(3):332-42. doi: 10.1007/s10047-013-0708-2. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① Kouji SHIMA, Liempham HIEU, Atsushi MAHARA, Naoki MORIMOTO, Tetsuji YAMAOKA, Shigehiko SUZUKI, Toshia FUJISATO, Hydrostatic pressure treatment for making acellular dermis grafts, TERMIS-AM meeting 2013, 平成 25 年 11 月 12 日、Atlanta, US

② 森本尚樹、楠本健司、Pham Hieu LIEM、鈴木茂彦、馬原淳、山岡哲二、島耕史、藤里俊哉、超高圧法を用いた皮膚の脱細胞化方法の検討、第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会、平成 25 年 11 月 7 日、新潟

③ 島耕史、Liempham Hieu、馬原淳、森本尚樹、鈴木茂彦、山岡哲二、藤里俊哉、超高圧印加法による皮膚組織の脱細胞化、日本生物高分子学会 2013 年度大会、平成 25 年 10 月 20 日、

大阪

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：加圧処理を用いた皮膚の脱細胞化方法
発明者：森本尚樹、鈴木茂彦、山岡哲二、馬原淳、藤里俊哉
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2013/073103
出願年月日：平成 25 年 8 月 29 日
国内外の別：国際

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 尚樹 (MORIMOTO, Naoki)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：40378641

(2) 研究分担者

河合 勝也 (KAWAI Katsuya)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：90273458

(3) 連携研究者

山岡 哲二 (YAMAOKA, Tetsuji)
国立循環器病研究センター研究所・
生体医工学部・部長
研究者番号：50243126

藤里 俊哉 (Fujisato, Toshia)
大阪工業大学・工学部・教授
研究者番号：60270732