

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462823

研究課題名(和文) 自己細胞由来人工皮膚グラフトを用いた重症熱傷治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment using autologous artificial skin graft in patients with severe burn injury

研究代表者

小網 博之 (Koami, Hiroyuki)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：10465354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植皮術に耐えうるような強固な人工皮膚グラフト作成のための基礎実験を行った。中胚葉由来の繊維芽細胞や血管内皮細胞、外胚葉由来のケラチノサイトを in vitro にてそれぞれ細胞培養を行い、基本単位となる細胞凝集塊(スフェロイド)を作成した。多数のスフェロイドを集簇させると厚さを持った皮膚パッチを作成できた。しかし、繊維芽細胞単独や繊維芽細胞が豊富なスフェロイドでは、作成可能であったが、ケラチノサイトのみのパッチや繊維芽細胞に乏しいパッチは、菲薄化しており脆弱であった。そこで、間葉系幹細胞を加えたケラチノサイトの皮膚パッチは、これまでにない強度で面積も大きかった。今後も基礎実験を継続していきたい。

研究成果の概要(英文)：We performed in vivo study in order to produce the artificial skin graft which possessed sufficient firmness to skin grafting. At first, we performed basic cell cultures and produced spheroids using fibroblasts, endothelial cells and keratinocyte, respectively. Second, we collect a lot of spheroids in one plate. Finally, gathering spheroids are transformed into one skin patch after one day. We could produce a skin patch including rich fibroblast, but couldn't form the patch by poor fibroblast or no fibroblast. Next, we utilize the fat-derived mesenchymal stem cells to accelerate stronger crosstalk between keratinocytes and fibroblasts. The new patch of keratinocyte including fat-derived mesenchymal stem cells is stronger and large. We will proceed basic experiments and assess the interactions of mesenchymal stem cells between keratinocytes and fibroblasts in the future.

研究分野：救急医学

キーワード：3次元皮膚培養 スフェロイド 繊維芽細胞 ケラチノサイト 血管内皮細胞 熱傷モデル ラット 脂肪由来間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

正常皮膚は、外界から異物の侵入を防ぐだけでなく、生体内にある水分や電解質、タンパクなどの漏出も防ぐことでその恒常性を維持している。広範囲熱傷は、そうした皮膚の性状バリアを破綻させるために、著明な体液や電解質、タンパクの漏出を引き起こす。そして、細菌などの感染源に対する免疫応答も低下し、易感染状態となることから、重症感染症を引き起こし致死率が高くなることが知られている。

治療の原則は、感染が成立しない急性期からの壊死組織のデブリドマンならびに皮膚移植であるが、広範囲熱傷では、自家皮膚移植用の皮膚グラフトに限界があり、創閉鎖までに複数回の植皮が必要となる症例もある。人工皮膚や同種皮膚などで一時的閉鎖を行うのが一般的だが、いずれは脱落してしまうために、手術回数の増加や在院日数の増加などを引き起こしてしまい、いずれ感染の悪化などにより致命的となる症例も少なくない。いわば、広範囲熱傷は医療経済ならびに社会全体の大きな損失となり得るのである。

近年、再生医療の進歩により、自家培養表皮を用いた植皮術が臨床応用されるようになった。しかし、まだまだ大学病院をはじめとした限られた施設を中心に行っている程度であり、市中病院に広く普及するには至っていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

広範囲熱傷において、早期より壊死組織の除去ならびに自家皮膚移植による創閉鎖が必要であるが、熱傷面積が広いと創閉鎖までに複数回の移植手術を繰り返す必要がある。一方、近年の再生医療技術の進歩により、免疫応答の少ない自家培養表皮を用いた皮膚移植技術が臨床応用されるようになり、生着率の向上や手術回数の減少により入院期間の短縮化などが期待されるが、一般に普及するには時期尚早と考えられる。その理由としては、作成までに時間がかかることや、作成にかかる費用が高いこと、感染の問題や培養にて使用した薬剤に対するアナフィラキシーの可能性など諸問題が解決されていないためである。また、長期予後に関するデータも乏しく、癌化の危険なども払拭されていない。

これまで考案された培養皮膚は、2次元シートのもが多く報告されているが、3次元培養皮膚グラフトに関する報告は少ない。近年臨床使用されている自家培養表皮も2次元シートであるため、真皮層に代わるような土台をあらかじめ構築する必要がある。以上より、我々は当初 BPR システムを用いた3次元組織構築技術を用いて3次元皮膚グラフトを作成し、熱傷モデル動物に対する生着の効果を検討することにより、臨床応用の可能性を模索する方針とした。

しかしながら、基礎実験の DATA を集積するうちに、培養を繰り返して作成した細胞凝

集塊(スフェロイド)を基礎単位とし、これらを約  $1 \times 10^7$  個集簇させることにより、形態形成が比較的再現性を持って可能となることを確認できた。また、外胚葉由来のケラチノサイトと中胚葉由来の線維芽細胞や血管内皮細胞では、同じ培養条件でもその成長に差があることが分かった。そこで、生着率の向上ならびに植皮に耐えうる強度を備えた培養皮膚作成のために、まずはより強固な皮膚パッチを作成することを目標とし、それに必要なスフェロイドの条件などを検討する方針とした。

## 3. 研究の方法

### 3次元正常培養細胞グラフトの作成

まずは、線維芽細胞を用いてスフェロイド作成とその形態変化について評価した。細胞数による変化や時間経過による形態の変化を評価する。スフェロイドの大きさについては、写真の外観を写真撮影し、その面積を測定することで評価した。使用ソフトは image j を用いた。また、統計学的解析は、SPSS (version 23) ならびに Microsoft office 2013 (Excel & PowerPoint) を用いた。

次に、スフェロイドを用いて作製した皮膚パッチの形態変化を評価する。

使用する細胞は、中胚葉由来である皮膚線維芽細胞や血管内皮細胞、外胚葉由来であるケラチノサイトの3種類とする。線維芽細胞で行った上記検討を、他の2種類の細胞でも同様に行い、細胞間の違いについても検討する。

さらに、これら基礎データを用いて、次に複数の細胞を用いた合成パッチを作成する。その際には、スフェロイドを作成する段階で複数の細胞を混入させる方法と皮膚パッチを作成する段階で、複数の細胞由来のスフェロイドを混入する方法が考えられる。これらを作成しながら、その後の作成条件の検討を並行する。

最終的に、より形態として強固で一定の大きさを持った皮膚パッチを移植用として用いる。

強固な皮膚グラフトを作成できれば、次に正常ヌードマウスへの移植実験を行う。グラフトに相当するような小範囲の皮膚欠損を作成する。全身麻酔下にグラフトを移植し、ナイロン糸で数針縫合固定する。術後に創部を自ら損傷しないためにプラスチックのカバーなどで創部を被覆し手術終了とする。その後は麻酔から覚醒させ、急性期、亜急性期、慢性期の生着を確認する。創部は、病理学的にも確認する。

さらに生着のよいグラフトが判明すれば、熱傷モデルへの移植実験を行う。熱傷モデルをマウスやラットの背側に作成し、そこに細胞グラフトを同様に移植する。移植後の評価は同様に行い、その生着率を評価する。

## 4. 研究成果

スフェロイドの形態解析  
<線維芽細胞>

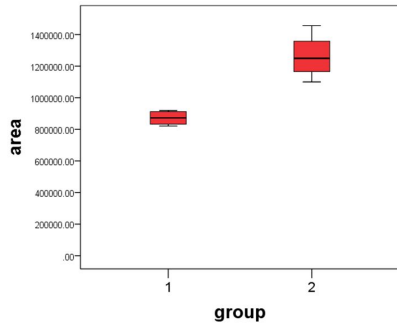


図1：細胞数とスフェロイドの大きさの関係（面積の単位はピクセル。Group1は1万個、Group2は2万個のスフェロイドそれぞれ4個ずつの集計）。平均で約1.5倍の大きさになった。

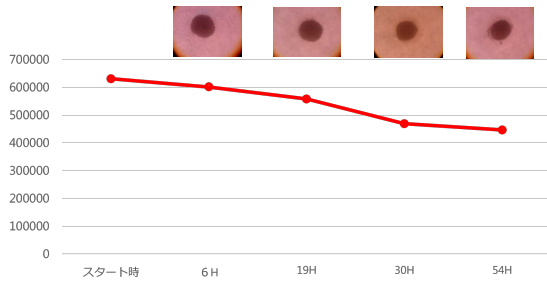
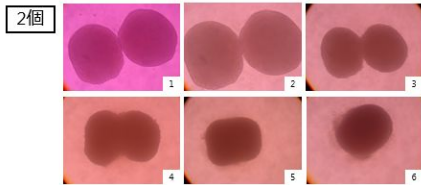


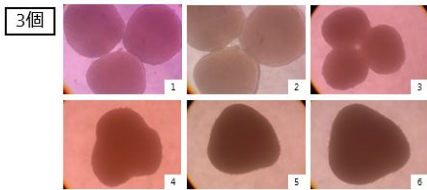
図2：1個のスフェロイド（2万個の細胞）の時間経過と大きさの推移。

時間経過に伴うスフェロイドの形態変化



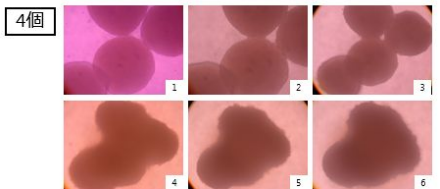
左上から右下へ作成直後、作成後2時間、6時間、下の段より19時間、30時間、54時間  
接眼レンズ10倍、対物レンズは2番まで10倍、それ以降は5倍

時間経過に伴うスフェロイドの形態変化



左上から右下へ作成直後、作成後2時間、6時間、下の段より19時間、30時間、54時間  
接眼レンズ10倍、対物レンズは2番まで10倍、それ以降は5倍

時間経過に伴うスフェロイドの形態変化



左上から右下へ作成直後、作成後2時間、6時間、下の段より19時間、30時間、54時間  
接眼レンズ10倍、対物レンズは2番まで10倍、それ以降は5倍

図3 - 1, 2, 3：時間経過に伴うスフェロイドの形態変化(上段から2個、3個、4個)

構造体の成功率 (2万個/wを用いて)

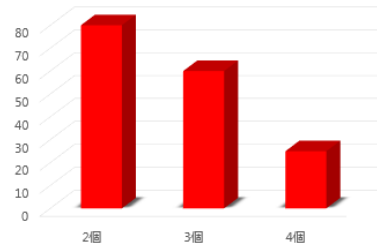
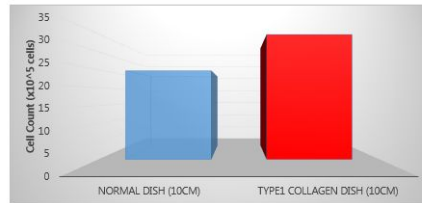


図4：構造体の成功率。スフェロイドの数が増えると結合率は低下する。

<ケラチノサイト>

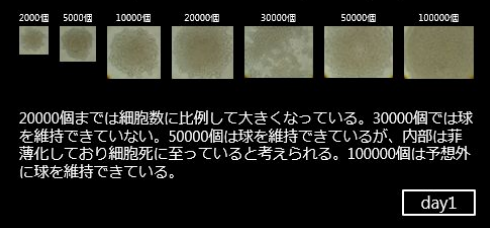
NHEK(P<sub>2</sub>)のdish別増殖率の違い



type1 dishは40.9%細胞数が増加した。

図5：ケラチノサイトのディッシュ別増殖率の違い。Type1 collagen dishは、通常のdishにくらべて40%以上細胞数が増加した。

細胞数とspheroidの関係 (NHEK,P3)

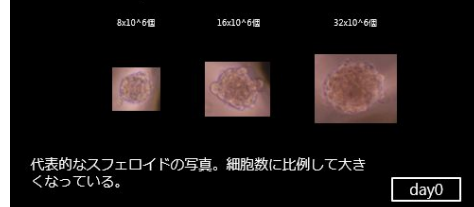


20000個までは細胞数に比例して大きくなっている。30000個では球を維持できていない。50000個は球を維持できているが、内部は菲薄化しており細胞死に至っていると考えられる。100000個は予想外に球を維持できている。

図6：細胞数とスフェロイドの関係。2万個までは、細胞数に比例して大きくなっている。3万個以上は形態を維持できず崩壊しているが、10万個では、形態は維持されていた。

<脂肪細胞由来間葉系幹細胞>

細胞数とspheroidの関係 (MSc,P4)



代表的なスフェロイドの写真。細胞数に比例して大きくなっている。

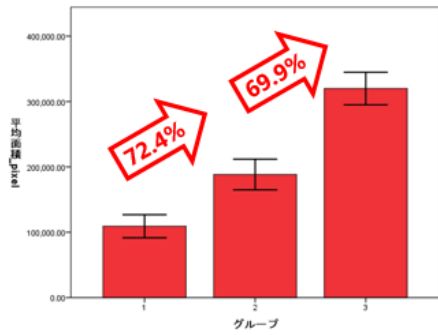


図7 - 1, 2 : 細胞数とスフェロイドの関係。細胞数が増えるにつれて大きさも比例して大きくなっている。

皮膚パッチについて  
< 線維芽細胞単独 >

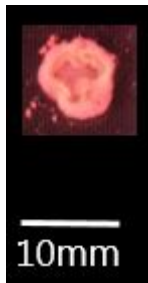


図8 : 中央部は菲薄化したパッチとなる。

< ケラチノサイト単独 >

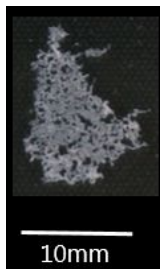


図9 : 菲薄化したシートを形成するが、非常に脆弱である。

< 血管内皮細胞単独 >

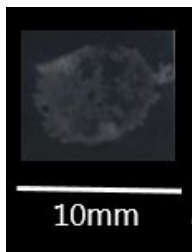


図10: ケラチノサイト同様に菲薄化した膜状パッチとなる。

< 脂肪由来間葉系幹細胞単独 >



図11 : やや球状のパッチとなる。

< 合成パッチ >

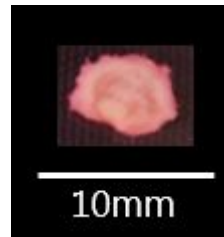


図12: 線維芽細胞と血管内皮細胞の合成パッチ。中央部も厚みをもったパッチを形成する。

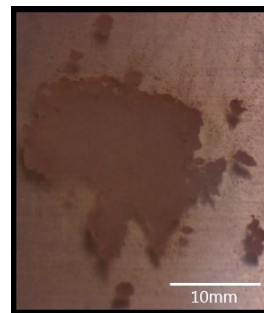


図13: 線維芽細胞とケラチノサイトの合成パッチ。厚みに乏しいシート状のパッチを形成。

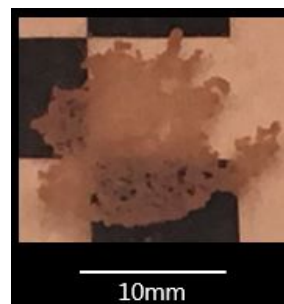


図14: ケラチノサイトと間葉系幹細胞の合成パッチ。ケラチノサイト単独に比べてより強度をもったシートを形成した。

パッチの時間経過による変化について  
< 線維芽細胞単独パッチ >

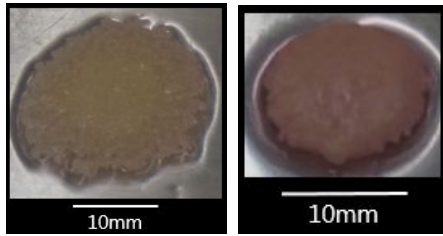


図 16 : 左 day1、右 day8。やや厚みもち径も小さくなるが、パッチとしての機能は維持している。

<今後の研究課題>

本研究期間内では、植皮に耐えうる強度を持った3次元皮膚パッチの作成に難渋し、移植するまでには至らなかった。しかしながら、より強固なパッチ作成は植皮後の生着の為に必須条件であり、3次元構造を維持するためにも外胚葉由来のケラチノサイトと中胚葉由来の線維芽細胞を中心とした各細胞との橋渡しが必要となる。我々の基礎実験から、間葉系幹細胞がその可能性を担う可能性が考えられた。今後ともより強固なパッチの作成に関わる基礎研究を積み重ねていきたい。

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)

Noguchi R, Nakayama K, Itoh M, Kamohara K, Furukawa K, Oyama J, Node K, Morita S: Development of a three-dimensional pre-vascularized scaffold-free contractile cardiac patch for treating heart disease. J Heart Lung Transplant. 査読あり 35:137-145,2016.

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計1件)

名称:組織体形成装置及び組織体形成キット

発明者:野口亮

権利者:国立大学法人佐賀大学

種類:特許

番号:特開 2016-000029

取得年月日:2016年1月7日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小網博之 (KOAMI HIROYUKI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号:10465354

(2)研究分担者

阪本雄一郎 (SAKAMOTO YUICHIRO)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号:20366678

(3)連携研究者

野口亮 (NOGUCHI RYO)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号:70530187