

(様式3号)

学位論文の要旨

氏名 溝口 高弘

〔題名〕

Treatment of Cutaneous Ulcers with Multilayered Mixed Sheets of Autologous Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells

(自家線維芽細胞と末梢血単核球からなる積層細胞混合シートを用いた皮膚潰瘍治療)

〔要旨〕

難治性皮膚潰瘍に対し当教室では、各種成長因子を分泌する末梢血単核球と線維芽細胞から成る細胞混合シートによる治療法を開発し、これまでにその有用性を報告してきた。これまでの当教室での細胞混合シートは単層であったが、細胞シートの扱い易さ、および、治療効果の増強を目指し、本研究では、細胞を積層化することで作製した積層細胞シートの治療効果を、マウスを用いた実験で検討した。C57BL/6マウスの尾から分離培養された線維芽細胞 5.0×10^5 cellsと末梢血単核球 2.0×10^6 cellsを、24-well通常培養皿に播種し、3日間共培養することで厚さ約50 μm の積層細胞混合シートが作製された。従来の単層細胞混合シートは、線維芽細胞 1.25×10^5 cellsと末梢血単核球 2.0×10^6 cellsを、24-well温度応答性培養皿に播種して作製された。積層細胞混合シートのconditioned mediumのVEGF、HGF、TGF- β 1の濃度は、単層細胞混合シートのconditioned mediumよりいずれも高値であった。HUVECを用いたtube formation assayにおいて、積層細胞混合シートのconditioned mediumは、単層細胞混合シートのconditioned mediumよりもHUVECが形成する分岐点が有意に多かった。さらに、糖尿病モデルマウス背部の皮膚全層欠損創による皮膚潰瘍モデルの治療実験において、単層細胞混合シート移植群、積層線維芽細胞シート移植群、積層細胞混合シート移植群、無治療のコントロール群の4群で、創傷治癒率を比較した。シート移植3群における創傷治癒率は、コントロール群よりも高い結果であったが、単層細胞混合シート移植群と積層細胞混合シート移植群の間に有意差はなかった。しかし、血管内皮細胞のマーカーであるCD31に対する免疫染色では、積層細胞混合シート移植群の治癒組織は、他群よりも管腔構造の保たれた成熟血管を多く認めた。これらの結果は、積層細胞混合シートは単層細胞混合シートよりも高い血管新生能を有し、新たな創傷治癒に対する治療材としての可能性を示すものであると考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1 5 3 7号	氏 名	溝口 高弘
論文審査担当者	主査教授	矢野 雅文	
	副査教授	小林 誠	
	副査教授	廣野 公一	
学位論文題目名 (題目名が英文の場合、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)			
Treatment of Cutaneous Ulcers with Multilayered Mixed Sheets of Autologous Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells (自家線維芽細胞と末梢血単核球からなる積層細胞混合シートを用いた皮膚潰瘍治療)			
学位論文の関連論文題目名 (題目名が英文の場合、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)			
Treatment of Cutaneous Ulcers with Multilayered Mixed Sheets of Autologous Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells (自家線維芽細胞と末梢血単核球からなる積層細胞混合シートを用いた皮膚潰瘍治療)			
掲載雑誌名 Cellular Physiology and Biochemistry 第47巻 P.201 ~ 211 (2018年5月 <input checked="" type="checkbox"/> 掲載・掲載予定)			
(論文審査の要旨)			
<p>難治性皮膚潰瘍に対し溝口高弘が所属する教室では、成長因子を分泌する末梢血単核球と線維芽細胞から成る細胞混合シートによる治療法を開発し、その有用性を報告してきた。しかし、これまでの細胞混合シートは単層であるために移植が難しいことから、本研究では、細胞シートの扱い易さ、および、治療効果の増強を目指し、細胞を積層化することで作製した積層細胞シートの治療効果を、マウスを用いた実験で検討した。線維芽細胞数を従来の単層細胞混合シートの4倍とし、培養・剥離の方法を変更することで厚さ約50 μmの積層細胞混合シートが作製された。積層細胞混合シートの培養上清のVEGF、HGF、TGF-β1の濃度は、単層細胞混合シートの培養上清よりいずれも高値であった。Tube formation assayにおいて、積層細胞混合シートの培養上清は、単層細胞混合シートの培養上清よりもHUVECが形成する分岐点が有意に多かった。さらに、糖尿病モデルマウス背部の皮膚全層欠損創による皮膚潰瘍モデルの治療実験において、単層細胞混合シート移植群、積層細胞混合シート移植群、無治療のコントロール群で、創傷治癒率が比較された。シート移植群における創傷治癒率は、コントロール群よりも高い結果であったが、単層細胞混合シート移植群と積層細胞混合シート移植群の間に有意差はなかった。しかし、治癒後の組織に対するCD31に対する免疫染色において、積層細胞混合シート移植群は、他群よりも管腔構造の保たれた成熟血管を多く認めた。これらの結果は、積層細胞混合シートは単層細胞混合シートよりも高い血管新生能を有し、新たな創傷治癒に対する治療材としての可能性を示すものであると考えられた。</p> <p>本研究は末梢血単核球と線維芽細胞から成る積層細胞混合シートが、血管新生を促進し、創傷治癒を導くことを明らかにした。よって、学位論文として価値のあるものであると認められた。</p>			