

**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)

氏名 溝口 高弘

所属 山口大学大学院医学系研究科  
医学専攻  
器官病態外科学講座

平成 30 年 11 月

## 目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	6
4. 方法	7
5. 結果	11
6. 考察	19
7. 結語	21
8. 謝辞	22
9. 参考文献	23

## 1. 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  $5.0 \times 10^5$  cells と末梢血単核球  $2.0 \times 10^6$  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  $50 \mu\text{m}$  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  $1.25 \times 10^5$  cells と末梢血単核球  $2.0 \times 10^6$  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- $\beta$ 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ありに多かった。線維芽細胞を用いた scratch 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、線維芽細胞の細胞遊走を有意に促進した。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と細胞遊走能を有し、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。

## 2. 研究の背景

難治性皮膚潰瘍は、末梢動脈疾患を含む虚血性疾患、糖尿病、褥瘡、静脈不全によるうっ血などにより引き起こされ、それぞれ原因に応じた治療が行われている[1-4]。特に閉塞性動脈硬化症、バージャー病、ブルートゥー症候群などの末梢動脈疾患は、全世界で2億人もの人々が罹患していると報告されている[5]。末梢動脈疾患による重症下肢虚血に対しては、血管内治療もしくはバイパス治療による血行再建が第一選択治療であるが、全身状態や解剖学的な条件から血行再建が行えない患者も存在する[6]。また、手術が成功しても、微小血管の循環障害が残存すれば、皮膚潰瘍は難治化する。そのため、他に治療の選択肢がない重症末梢動脈疾患患者に対して、血管再生を促進する新たな画期的な治療法の開発が望まれている。

当教室では、血行再建が実施できない重症下肢虚血患者を対象に、骨髄細胞移植を実施し、一定の血管再生効果を報告している[7]。そして、我々は、虚血組織での移植細胞の生存率を改善させるため[8、9]、移植前に低酸素環境で培養することで移植細胞の機能を増強させる「低酸素プレコンディショニング」という方法を報告している[10、11]。また、移植細胞採取の低侵襲化のために、我々は、移植細胞を骨髄細胞から末梢血単核球へ変更し、虚血下肢動物モデルにおいて、低酸素プレコンディショニングを行った末梢血単核球は、微小血管密度と下肢の血流を改善することを報告した[12、13]。近年、細胞シート技術が確立され[14]、細胞シート移植は、様々な動物モデルで治療効果が示されている[15-19]。また、我々は、重症下肢虚血に対する細胞移植の臨床試験を実施する中で、難治性皮膚潰瘍という疾患を経験し、我々は細胞シート技術を難治性皮膚潰瘍の治療に応用することが出来るのではないかと考えるに至った。

通常の創治癒過程は増殖因子、サイトカイン、ケモカインを含む複雑なシグナルネットワークにより調整されており、(1)炎症期、(2)増殖期、(3)成熟期から構成される[20]。静脈性や糖尿病性の皮膚潰瘍のような難治性皮膚潰瘍では、増殖因子の異常な発現が慢性炎症を引き起こし、創治癒過程を遅延させていることが報告されている[21、22]。VEGF、TGF- $\beta$ 1、PDGF-BBは炎症期から増殖期へ移行するのに必要な因子である[23、24]。末梢血単核球は、通常の創治癒過程の炎症期において必要なTGF- $\beta$ 1やPDGF-BBなどの増殖因子やインターロイキンを分泌することが報告されている[22-25]。また、TGF- $\beta$ 1とPDGF-BB

は線維芽細胞の VEGF とコラーゲンの mRNA 発現を増加させる[26]。そのため、我々は、炎症期を惹起し、更に、増殖期を加速させるために、“増殖因子を分泌する”末梢血単核球と“コラーゲンを分泌し、細胞シートの基質となる”線維芽細胞からなる細胞混合シートを開発し、これまでにマウスとラビットの動物モデルで皮膚潰瘍治療の有効性を報告してきた[26、27]。しかし、これまで報告してきた細胞シートは単層の細胞シートである為に、臨床応用を考慮すると、細胞シートの扱い易さの向上、および、治療効果を増強させる必要があった。そのため、我々は、細胞を積層させて作製する積層細胞シートを作製する方法を考案した。本研究の目的は、その積層細胞混合シートの有用性を、マウスを用いた研究で検証することである。

### 3. 目的

本研究の目的は、我々が考案した積層細胞混合シートの増殖因子分泌能、血管新生能、創治癒促進能を、従来の単層細胞混合シートと比較解析し、更に、難治性皮膚潰瘍モデルマウスで積層細胞混合シートの治療効果を検証することである。

## 4. 方法

### 使用動物

オスの C57BL/6 マウスが Japan SLC 社より購入された。また、オスの GFP 発現マウス (C57BL/6/Tg14) は大阪大学遺伝情報実験センター岡部勝先生より寄託された[28]。動物実験は、山口大学の動物実験倫理委員会の承認の下、そのガイドラインに則り実施された (#31-093)。

### 細胞混合シートの作製

末梢血単核球は Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories 社) を用いてマウス末梢血から比重遠心法で分離された。線維芽細胞はマウスの尾からコラゲナーゼ (Wako 社) を用いて分離された。これらの細胞は 10%ウシ血清 (Thermo Fisher Scientific 社) 含有の CTS AIM-V メディウム (Thermo Fisher Scientific 社) で培養された。単層細胞混合シート作製のため、末梢血単核球 1ml ( $2 \times 10^6$  細胞/ml) と線維芽細胞 1ml ( $1.25 \times 10^5$  細胞/ml) が温度応答性細胞培養皿である UpCell (CellSeed 社) 24-well plate に播種された。積層混合細胞シート作製のため、末梢血単核球 1ml ( $2 \times 10^6$  細胞/ml) と線維芽細胞 1ml ( $5.0 \times 10^5$  細胞/ml) が通常培養皿の 24-well plate に播種された。細胞シート作製の為の培養液は 5%ウシ血清 (Thermo Fisher Scientific 社) 含有の CTS AIM-V メディウム (Thermo Fisher Scientific 社) と HFDM-1 (Cell Science & Technology 社) を 1ml ずつの計 2ml で培養された。低酸素プレコンディショニングの条件は、細胞を 2 日間通常酸素条件下 ( $37^\circ\text{C}$ 、20%酸素、5%二酸化炭素) で培養後、1 日間低酸素条件下 ( $33^\circ\text{C}$ 、2%酸素、5%二酸化炭素) で培養されたものである。細胞シートの剥離方法として、単層細胞混合シートは室温下で、シートを温度応答性細胞培養皿の底面から剥離され、また、積層細胞混合シートは 10 PU/ml のディスパーゼで 40 分間培養後、細胞シートを培養皿の底面からピンセットで剥離された。

### 細胞混合シートの増殖因子発現

積層細胞混合シートの線維芽細胞数を VEGF 分泌能で評価するため、末梢血単核球 1ml ( $2 \times 10^6$  細胞/ml) の細胞数は固定され、線維芽細胞の細胞数は異なる条件で播種された。末梢血単核球 1ml ( $2 \times 10^6$  細胞/ml) と線維芽細胞 1ml (0,

1.25, 2.5, 5.0 x10<sup>5</sup> 細胞/ml) が通常培養皿の 24-well plate に播種された。また、線維芽細胞は 1.0 x10<sup>6</sup> 個以上で播種されると、培養器内で意図せず剥離したため、細胞数の検討から除外した。培養液は 5%ウシ血清含有の CTS AIM-V メディウムと HFDM-1 が 1ml ずつの計 2ml が用いられた。培養条件は低酸素プレコンディショニングの条件と同一にした。

積層細胞混合シートおよび単層細胞混合シートの conditioned medium 中の成長因子の濃度 (VEGF, HGF, TGF-β1, CXCL-1, CXCL-2, IL6) が、酵素結合免疫吸着法 (ELISA) (R&D 社) のプロトコルに従い測定された。

#### Tube formation assay による血管新生誘導能の評価

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical endothelial cell: HUVEC) は EGM2 培地 (Lonza 社) で培養された。HUVEC はトリプシン処理後、10%FBS/DMEM 培地で懸濁された。そして、Matrigel (Corning 社) でコーティングした 96-well plate の 1 ウェルに、HUVEC は 2 x 10<sup>4</sup> 個/75 μl で播種された。続いて、各ウェルに単層細胞混合シート、積層線維芽細胞シート、積層細胞混合シートの conditioned medium が 75 μl ずつ加えられた。また、コントロールとして未使用の培地が加えられた。培養開始 9 時間後に、Angiogenesis Analyzer for ImageJ software (National Institute of Health) を用いて血管新生誘導能が評価された [29、30]。

#### スクラッチアッセイによる細胞遊走能評価

マウスの尾から単離された線維芽細胞が、10%ウシ血清含有の CTS AIM-V メディウムで培養され、24-well plate にコンフルエントとなるように播種された。200 μl 用のピペットチップでウェルをスクラッチすることで、細胞間隙が作製された。そして、ウェルを PBS で洗浄後、積層細胞混合シート、積層線維芽細胞シート、単層細胞混合シートの conditioned medium、コントロールとして未使用培地が、ウェルに加えられた。培養開始 0 時間後、12 時間後の状態が撮影され、BZ-X analyzer software (Keyence) で細胞の遊走した面積が算出された。

#### TUNEL 法によるアポトーシス検出

Terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TDT)-mediated dUTP-dioxigenin nick end labeling (TUNEL) 法を用いてアポトーシスが検出された。



積層細胞混合シートと単層細胞混合シートが培養され、4%パラホルムアルデヒド (Wako 社) で固定後に PBS で洗浄され、さらに 0.1%Triton-X/Protein blocking solution (Dako 社) で透過処理された。TUNEL アッセイは In Situ Cell Death Detection Kit (Roche 社) で実施された。細胞核は、6-diamino-2-phenylindole (DAPI) で染色後、蛍光顕微鏡 (BZ-9000 Generation II system; Keyence 社) を用いて、アポトーシスが観察された。

#### マウス皮膚潰瘍モデルの作製と細胞シート移植

マウス皮膚潰瘍モデルは、マウスにストレプトゾトシンが腹腔内投与され、血糖値が 300mg/ml 以上となった糖尿病マウスの背部皮膚を剪刀で鋭的に切り取り、直径 8mm の円形皮膚欠損が作製された。

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、積層混合細胞シート群移植、コントロールとして無治療群の 4 群で、治療実験が実施された。

1000  $\mu$ l ピペットを用いて細胞シートを吸引し、マウスの皮膚潰瘍上へ細胞シートが移植された。皮膚潰瘍部位は、ウルゴチュール (Laboratories Surgo 社) 及びデルマエイド (ALCARE 社) で被覆後、弾性接着包帯 (ニチバン社) で固定された。

介入前および介入後 3, 5, 7 日目の創傷治癒面積が、それぞれ Image J にて測定され、各時点における潰瘍治癒率 (潰瘍面積縮小率) が算出された。

#### 治癒組織の組織学的解析

治癒後の皮膚組織が採取され、10%パラホルムアルデヒドで固定したのち、パラフィンで包埋された。薄切凍結切片 (3  $\mu$ m 厚) が作製され、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色、および、各種免疫組織染色が行われた。脱パラフィン化した切片は、Target Retrieval Solution (DAKO Cytomation 社) で抗原賦活化され、プロテインブロッキング (DAKO 社) で処理された。血管内皮細胞を染色するため、切片は、抗 CD31 抗体 (Abcam 社) + Dylight550-抗ラビット IgG ヤギ抗体で染色された。末梢血単核球の積層細胞混合シート内への取り込みを評価するため、GFP マウスより分離された末梢血単核球を含んだ積層細胞混合シートが生ハムに貼付され、同様の処理後、抗 GFP 抗体 (Medical & Biological Laboratories 社) +Dylight550-抗ラビット IgG ヤギ抗体で染色された。

### 統計学的解析

全てのデータは、平均値 ± 標準偏差で表記された。多群間の統計学的な比較は **one-way ANOVA** 検定で評価され、**Bonferroni** 法で補正された。2 群間の統計学的な比較は **student's t-test** で評価された。統計学的な有意差は、 $p < 0.05$  をもってありとした。全ての統計学的解析は、**STATA software** (StataCorp 社) で実施された。

## 5. 結果

### 積層細胞混合シートの作製

我々がこれまでに報告してきた単層細胞混合シートは、末梢血単核球 (PBMNC) 1ml ( $2 \times 10^6$  細胞/ml) と線維芽細胞 (Fibroblast) 1ml ( $1.25 \times 10^5$  細胞/ml) を温度応答性細胞培養皿である UpCell24-well plate に播種して作製された[26]。UpCell を用いた細胞混合シート作製における、線維芽細胞の最大播種数を探索するため、末梢血単核球の細胞数は  $2 \times 10^6$  細胞で固定され、線維芽細胞の播種数が検討された。UpCell を用いた場合、 $1.25 \times 10^5$  細胞以上の線維芽細胞を播種すると、細胞混合シートは培養器内で自然に剥離した。そのため、我々は意図的に細胞シートを剥離する為、通常の 24-well plate を使用し、積層細胞混合シートが作製可能か検討を行った。末梢血単核球の細胞数は  $2 \times 10^6$  細胞で固定され、線維芽細胞播種数が異なる条件で検討された。末梢血単核球 1ml ( $2 \times 10^6$  細胞/ml) と線維芽細胞 1ml (1.25, 2.5, 5.0,  $10 \times 10^5$  細胞/ml) が、通常培養皿の 24-well plate に播種された。細胞は、2 日間通常酸素条件下で培養した後に、1 日間低酸素条件下での培養による低酸素プレコンディショニング後に、ディスパーゼ処理され、細胞はシート状態で剥離された。 $10 \times 10^5$  個の線維芽細胞では培養器内で自然に剥離したが、それ以外の細胞数 (1.25, 2.5,  $5.0 \times 10^5$  細胞/ml) では、ディスパーゼ処理により細胞シートの作製が可能であった。

末梢血単核球 1ml ( $2 \times 10^6$  細胞/ml) と線維芽細胞 1ml (0, 1.25, 2.5, 5.0,  $10 \times 10^5$  細胞/ml) が、通常の 24-well plate に播種され、低酸素プレコンディショニングを含む 3 日間の培養後、conditioned medium が回収され、VEGF 濃度が測定された。末梢血単核球 1ml ( $2 \times 10^6$  細胞/ml) と線維芽細胞 1ml ( $5.0 \times 10^5$  細胞/ml) の conditioned medium が、他群よりも有意に高い VEGF 濃度を示した(図 1A)。この細胞数条件で作製された細胞混合シートの肉眼像と、細胞混合シートを生ハムに貼付後に作製された切片の H&E 染色の組織が観察された(図 1B-D 左)。また、末梢血単核球 1ml ( $2 \times 10^6$  細胞/ml) と線維芽細胞 1ml ( $1.25 \times 10^5$  細胞/ml) が、UpCell 24-well plate で作製された単層細胞混合シートの肉眼像と H&E 染色の組織が観察された(図 1B-D 右)。前者は直径 8mm で安定した円形を示しており、また、病理組織では積層構造を示しており、末梢血単核球 1ml ( $2 \times 10^6$  細胞/ml) と線維芽細胞 1ml ( $5.0 \times 10^5$  細胞/ml) で作製された細胞混合シートが積層細胞混合シートとして、以下の実験に用いられた。

積層細胞混合シート内に末梢血単核球が取り込まれているか否かが、GFP 陽性マウスの末梢血単核球を使用して検討された。免疫染色により細胞シート内に GFP 陽性の末梢血単核球が検出された(図 1E)。

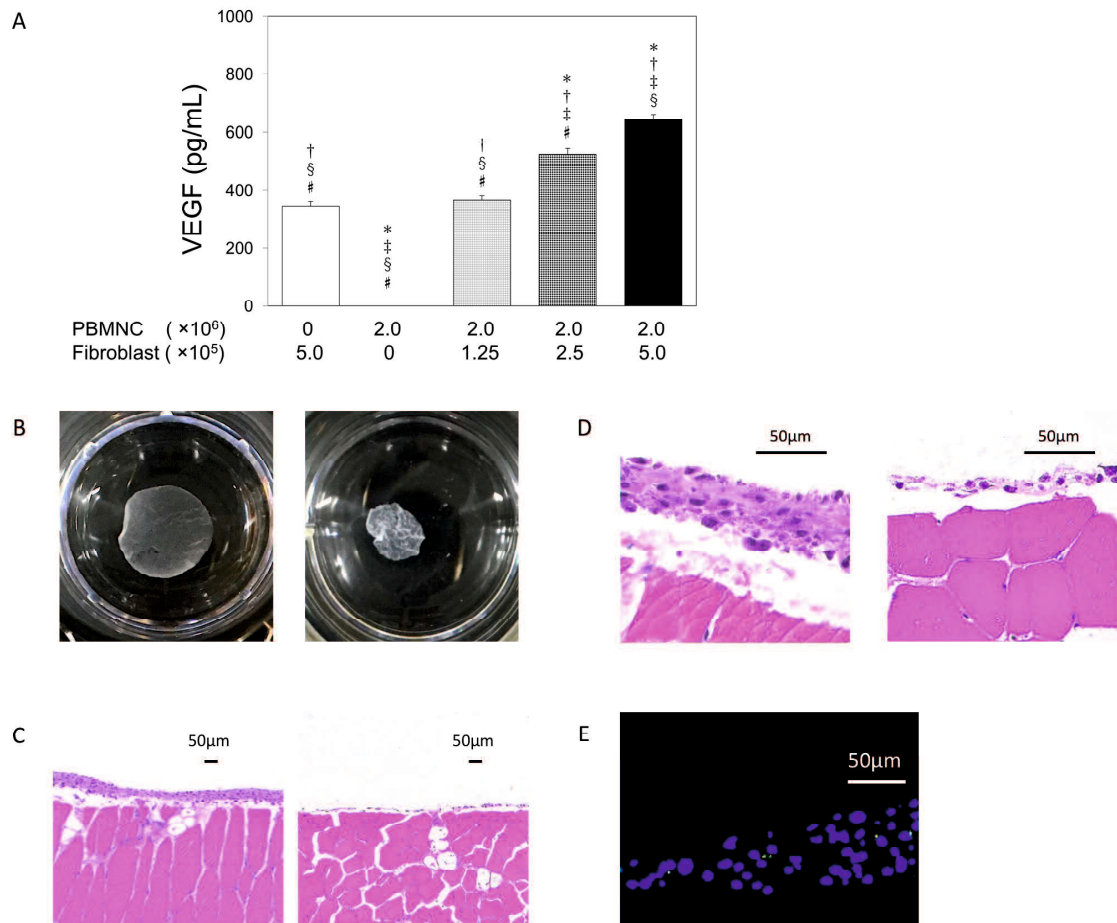


図 1. 線維芽細胞と末梢血単核球からなる積層細胞混合シート

(A) 線維芽細胞は末梢血単核球との共培養において、線維芽細胞数を増加させるほど VEGF の分泌量が増加した。(\*: $p < 0.01$  vs. 最も左の群, †: $p < 0.01$  vs. 左から 2 番目の群, ‡: $p < 0.01$  vs. 左から 3 番目の群, §: $p < 0.01$  vs. 左から 4 番目の群, # :  $p < 0.01$  vs. 左から 5 番目の群)

(B-D) 剥離後のシートの肉眼所見と H&E 染色。左が積層細胞混合シート。右が単層細胞混合シートを表す。積層細胞混合シートは単層細胞シートに比べ直径が大きく、厚みがあり安定的であった。

(E) GFP 免疫染色で GFP 陽性(緑色)が積層細胞混合シート内に観察された。青は DAPI を示す。

## 積層細胞混合シートは増殖因子とサイトカイン分泌を促進する

積層細胞混合シートが分泌する VEGF, HGF, TGF- $\beta$ 1, CXCL-1, CXCL-2, IL6 の濃度が ELISA で測定された(図 2)。積層細胞混合シート(Multi)は、単層細胞混合シート (Single)と積層線維芽細胞シート (Fibroblast)よりも IL-6 を除く全ての因子で有意に高値を示した。IL-6 濃度は積層細胞混合シートと単層細胞混合シートで同等であった。

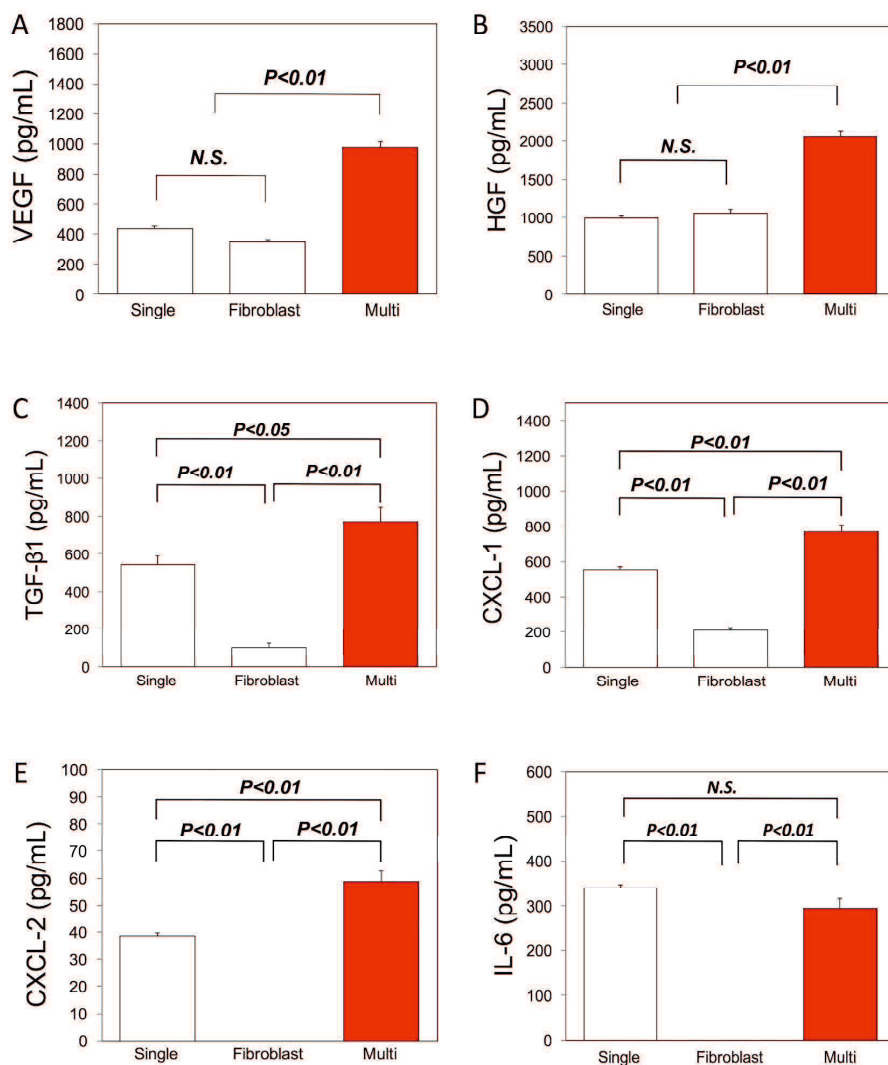


図 2. 細胞シートの分泌能

(A-F) ELISA による conditioned medium における増殖因子とサイトカインの濃度測定。IL-6 を除き、積層細胞混合シートは高い分泌能を示した。

### 積層細胞混合シートの血管新生能

積層細胞混合シートの血管新生能を検証するため、HUVEC と細胞シートの **conditioned medium** を用いて、**tube formation assay** が行われた(図 3A)。培養 9 時間後の時点で、コントロールである未使用メディウム (**Fresh Medium**) よりも有意に、積層細胞混合シートは **tube formation** を促進した。この結果から、積層細胞混合シートから分泌された **VEGF** が、血管新生を促進していることが示唆された。

### 積層細胞混合シートの細胞遊走能

積層細胞混合シートの分泌物が創部における線維芽細胞の遊走能に関与するかが検証された。線維芽細胞と細胞シートの **conditioned medium** を用いたスクラッチアッセイでは、積層細胞混合シートの **conditioned medium** は、培養 18 時間後の時点で線維芽細胞の遊走能を有意に促進した(図 3B)。

### 積層細胞混合シートの生存率

積層細胞混合シートの生存率を評価するため、ハムへ移植された積層細胞混合シートと単層細胞混合シートを構成する細胞のアポトーシスが **TUNEL** 染色で評価された(図 3C)。積層細胞混合シートは線維芽細胞数が増加しているにも関わらず、単層細胞混合シートと **TUNEL** 陽性細胞の割合は同等であり、線維芽細胞数の増加がアポトーシスを誘導する結果とはならなかった。

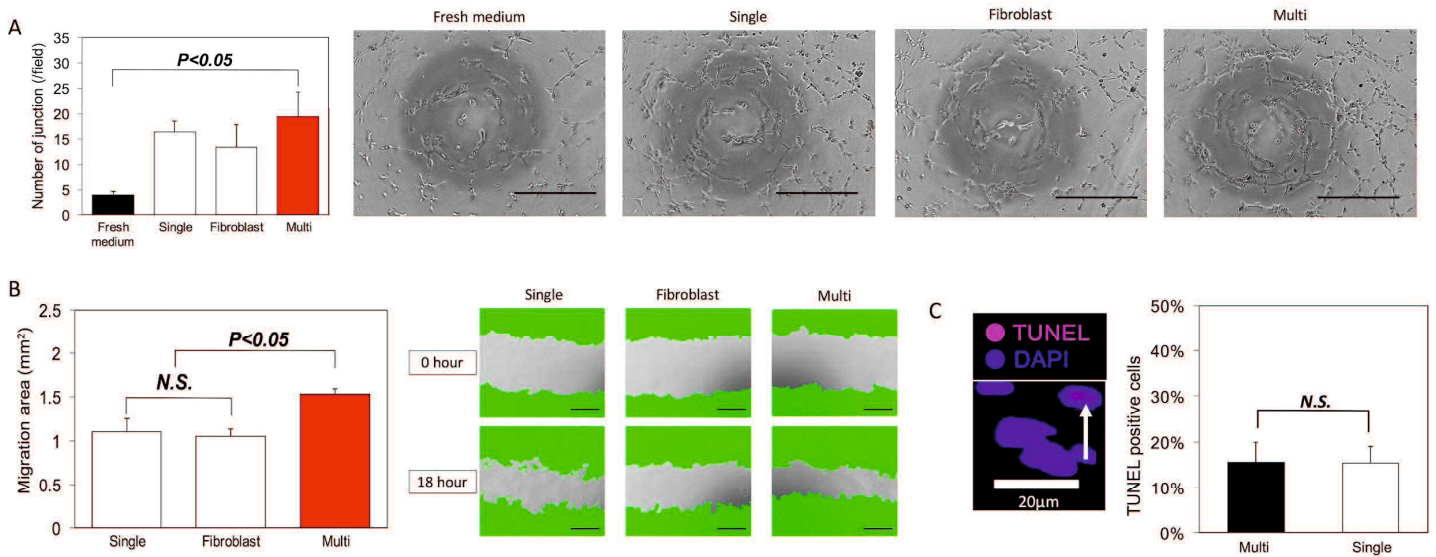


図 3. 積層細胞混合シートの血管新生能・細胞遊走能・生存率

(A) HUVEC が細胞シートの **conditioned medium**、または未使用の培地で培養され、10 倍視野で **tube** の交点数が測定された。積層細胞混合シートの **conditioned medium** は管腔形成を有意に増加させた (スケールバーは 500  $\mu\text{m}$  を示す)。

(B) スクラッチアッセイによる細胞シートの線維芽細胞遊走能の評価。コンフルエントの線維芽細胞がスクラッチ後に間隙が作製され、細胞シートの **conditioned medium** を用いて 18 時間培養した。線維芽細胞が遊走した面積が算出され、各群間で比較された(黄緑部分が細胞であり、スケールバーは 500  $\mu\text{m}$  を示す)。積層細胞混合シートの **conditioned medium** は線維芽細胞の遊走能を促進した。

(C) 細胞シートの生存率が **TUNEL** 染色により評価された。積層細胞混合シートの **TUNEL** 陽性率は単層細胞混合シートと同等であった。

### マウス皮膚潰瘍モデルにおける積層細胞混合シートの治療効果

積層細胞混合シートの皮膚潰瘍に対する治療効果の評価を行うため、糖尿病マウスの背部に皮膚全層欠損を作製し、細胞シートが移植された(図 4A)。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では、治療開始 7 日時点で無治療のコントロール群よりも有意に高い創治癒率を示した(図 4B)。治療開始 14 日時点で細胞シートを用いて治療した 3 群は、無治療のコントロール群よりも全て有意に高い創傷治癒率を示した。しかし、治療開始 7 日、14 日時点で細胞シート治療 3 群間では創傷治癒率に有意差はみられなかった。全てのマウスは治療開始後 21 日までに創治癒が得られた。

治癒組織の H&E 染色像では、コントロール群と細胞シート治療 3 群で組織再生に差を認めた(図 5A)。細胞シート治療 3 群では治癒組織が正常皮膚様であるのに対して、コントロール群では炎症細胞が多く浸潤しており、異常な組織形態を示していた。CD31 免疫染色により血管内皮細胞を染色したところ、積層細胞混合シート移植群では、他群よりも内腔の保たれた成熟した小血管が多く観察された(図 5B、C)。



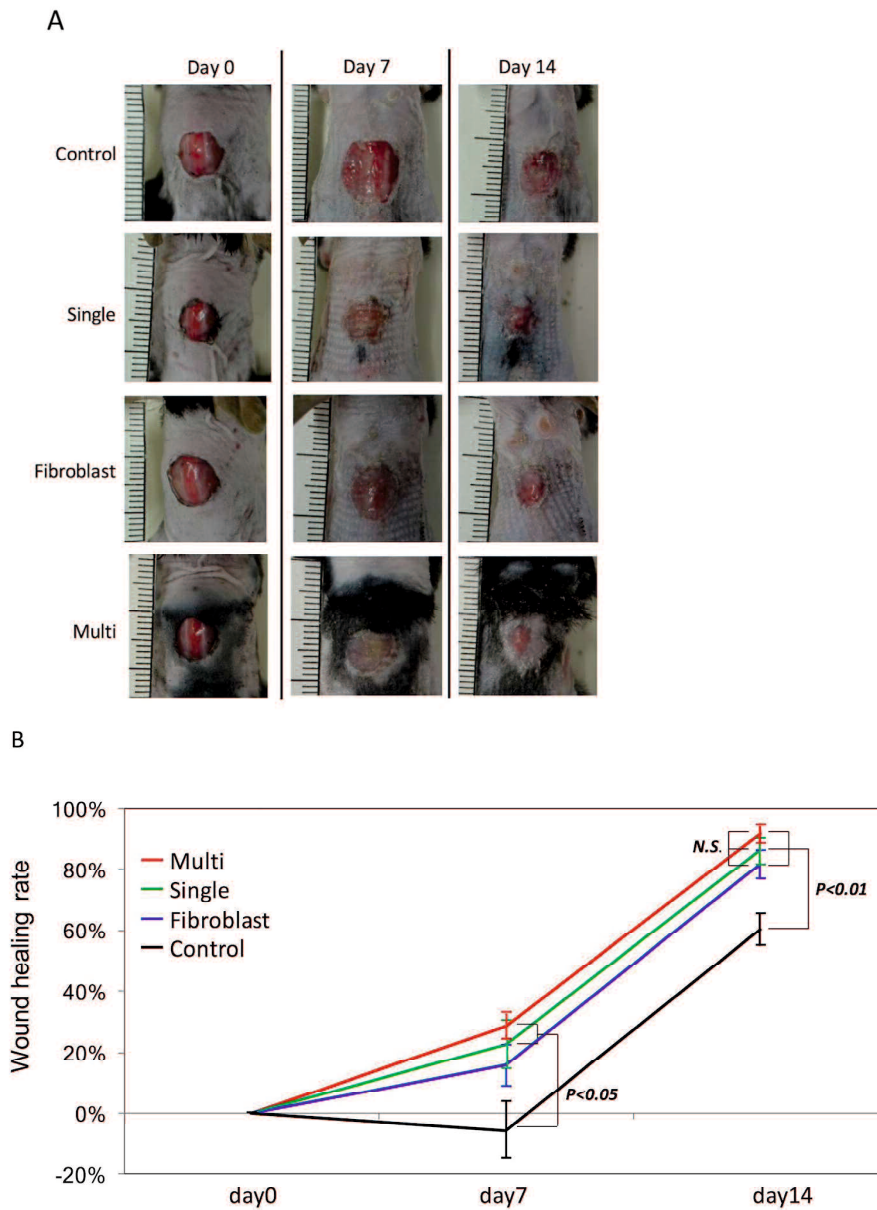


図 4. 細胞シートの治療効果

(A) 糖尿病マウス背部に皮膚全層欠損が作製され、無治療をコントロールとして、細胞シート移植 3 群と創治癒効果が検証された。移植開始 0 日目、移植開始 7 日目、移植開始 14 日目で、創治癒が評価された。

(B) Image J ソフトによる創傷面積測定に基づき各群の創傷治癒率が算出され、経時的推移が検証された。移植開始 14 日時点で、細胞シートを用いて治療した 3 群は、コントロール群よりも有意に高い創傷治癒率が示されたが、シート移植 3 群間における有意差は認めなかった。

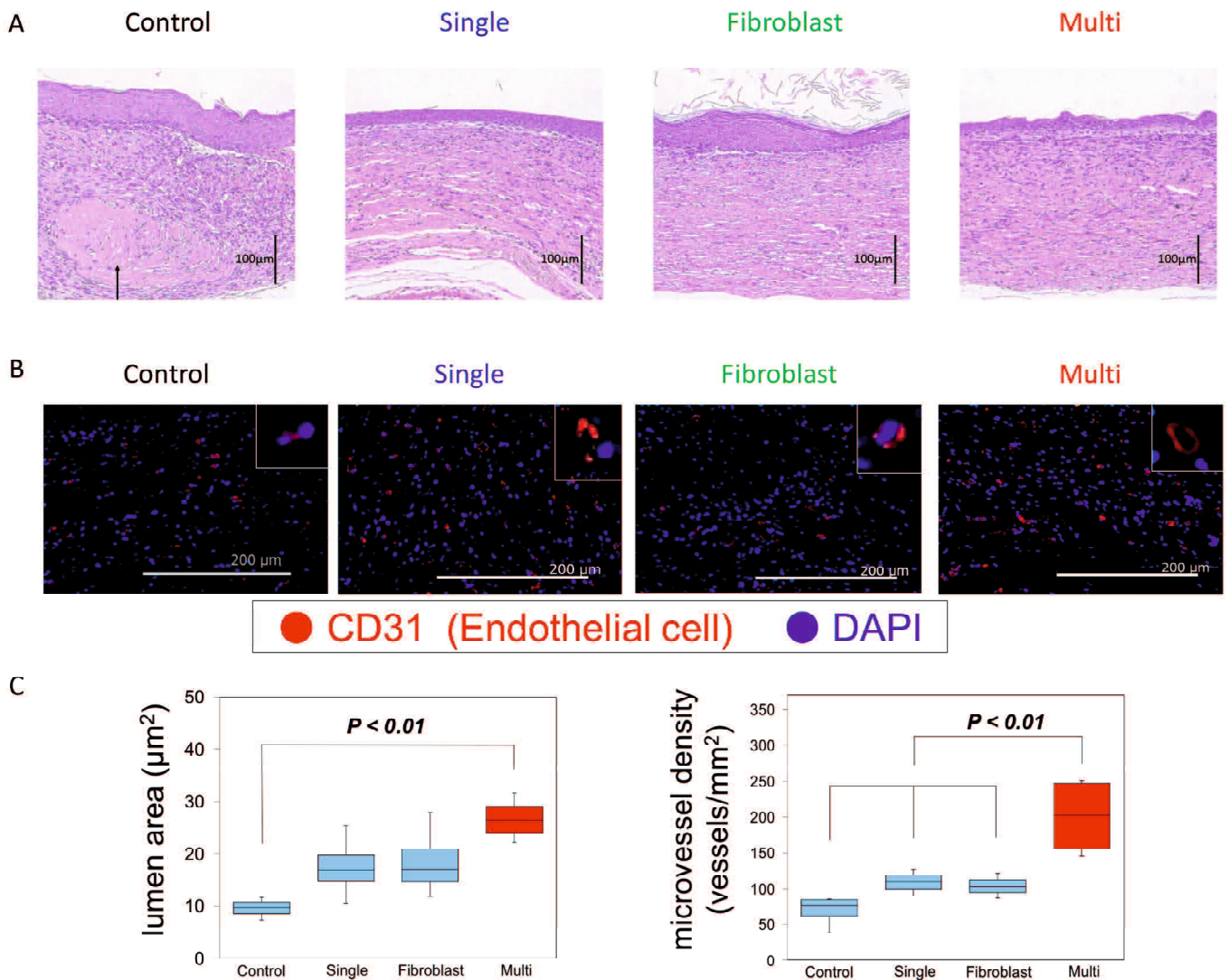


図 5. 細胞シート治療後の治癒組織における検討

(A) H&E 染色。シート移植 3 群では正常皮膚様に治癒しているが、コントロールは炎症細胞が浸潤し、肉芽種様組織（矢印）を認める異常な組織形態が観察された。

(B) 血管内皮細胞マーカーである CD31 の免疫染色が行われた。

(C) 内腔面積と小血管密度が比較検討された。積層細胞混合シートでは有意に内腔面積が大きく、小血管密度が高かった。

## 6. 考察

本研究において、我々は、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のマウスモデルにおける治療効果について検証した。潰瘍治癒には、細胞外マトリクスと細胞間のシグナリングの協調が求められ、線維芽細胞は、潰瘍治癒において表皮細胞と内皮細胞の細胞外マトリクスにおいて重要な役割を担っている[31]。これらの3種類の細胞は、VEGF、TGF- $\beta$ 1、HGFを含む血管新生に関連する成長因子を分泌することが知られている[32]。線維芽細胞は様々な組織から単離培養が可能であり、末梢血単核球は医療施設で容易に採取され、血管新生治療を促す細胞として虚血組織に移植されている[33-35]。成長因子のみならず、IL-6やCXCLのような炎症性サイトカインやケモカインは、正常な創治癒過程に必須であることが知られている[20,36]。我々が開発した積層細胞混合シートは、創傷治癒過程を促進することが期待されるこれらの成長因子、炎症性サイトカイン、ケモカインを分泌することから、創治癒を促す強力な治療法となることが示唆される。

細胞シート技術は、近年、急激に発展を遂げている。温度感受性培養皿を用いることで、細胞外マトリクスを保持した単層の細胞シートが作製可能である[37]。この技術により、我々は、接着細胞である線維芽細胞を基質とした細胞シートに末梢血単核球を混合させ、細胞外マトリクスを保持した単層細胞混合シートによる皮膚潰瘍に対する移植研究を行ってきた。しかしながら、温度感受性培養皿を用いた方法では、積層細胞シートの形成が非常に困難であった。そのため、我々は通常培養皿で積層細胞シートの作製を試行し、極少量のディスペーゼを使用することで、積層構造を維持したまま細胞を剥離することで、積層細胞シートの作製を可能とした。我々は、この方法を用いて、これまでと同様に、血管新生を促す末梢血単核球が積層細胞シートに組み込まれることを示した[26, 38]。

これまでに、我々はヘメオキシゲナーゼ1とヘキソキナーゼ2が活性化されることで、移植細胞の機能を増幅させる「低酸素プレコンディショニング」という方法を開発し、マウスを用いた実験においてCXCR4とインテグリン $\alpha$ Mを介して移植細胞の生着が亢進することを報告している[39-41]。また、ラビットを用いたこれまでの我々の研究では、低酸素プレコンディショニングを施した末梢血単核球は、細胞の接着能と血管新生能が増大し、下肢虚血への筋肉注射

により、血流を改善させることを報告している[13]。また、単層細胞混合シートを用いた検討において、低酸素プレコンディショニングは VEGF の分泌量を増大させることが示されている[26, 27]。そのため、本研究においても、我々は増殖因子分泌を促進させるために、低酸素プレコンディショニングを積層細胞混合シートにも適応した。

本研究の *in vivo* での皮膚潰瘍治療の検討において、創治癒を遅延させるため、ストレプトゾトシンにより誘発した糖尿病マウスが用いられた。細胞シートを用いて治療した 3 群では、治療開始 14 日時点で、無治療のコントロール群よりも有意に高い創傷治癒率を示した。特に、単層混合シート移植群と積層混合シート移植群では、治療開始 7 日時点で、コントロール群よりも有意に高い創傷治癒率を示した。この結果は、線維芽細胞のみの積層細胞シートでも、創治癒を促進するのに十分な VEGF などの増殖因子を分泌するが、末梢血単核球を加えた細胞混合シートは増殖因子とサイトカインの分泌が増すことで、治癒が促進しているものと示唆していると考えられた。しかしながら、治療開始 7 日、14 日時点で細胞シート移植の 3 群間では、創治癒率に有意差はみられなかったが、VEGF を含む増殖因子の分泌能が優れていることを反映してか、積層細胞混合シート移植群の治癒組織では、成熟した小血管が他群よりも有意に多く観察された。現在のところ、ヒトの難治性皮膚潰瘍を完全に反映した適切な動物モデルは存在せず、我々は今回の検討では糖尿病マウス皮膚全層欠損モデルを使用した。そのため、創治癒の観点からは積層細胞混合シートの治療効果は完全に反映されていないかもしれない。そのため、臨床研究において、難治性皮膚潰瘍に対する積層細胞混合シート移植の実施が望まれる。

## 7. 結語

我々の開発した積層混合細胞シートは、皮膚潰瘍マウスモデルにおいて創治癒に必要な成長因子やサイトカインを供給することにより血管新生と創治癒過程を促進し、治療効果を有することが示された。

そのため、積層細胞混合シートは今後難治性皮膚潰瘍に有用な治療法となる可能性がある。

## 8. 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました山口大学大学院 器官病態外科学講座（第一外科）、濱野公一教授に深謝申し上げます。

また、実験のご指導を頂きました、西本新先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）、上野耕司先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）に感謝申し上げます。

本論文は下記雑誌にて公開している論文を和訳したものである。

Cellular Physiology and Biochemistry と S. Karger AG, Basel より学位論文としての投稿を許可されている。

This article has been translated from the original by Takahiro Mizoguchi. S. Karger AG, Basel cannot be held responsible for any errors or inaccuracies that may have occurred during translation.

論文題目：Treatment of Cutaneous Ulcers with Multilayered Mixed Sheets of Autologous Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells

著者：Takahiro Mizoguchi, Koji Ueno, Yuriko Takeuchi, Makoto Samura, Ryo Suzuki, Tomoaki Murata, Tohru Hosoyama, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano

Journal 情報：Cellular Physiology and Biochemistry 47 巻 201-211 頁 2018 年

## 9. 参考文献

- [1] Vuorisalo S, Venermo M, Lepäntalo M. Treatment of diabetic foot ulcers. *J Cardiovasc Surg* 50, 275-291 (2009).
- [2] Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA* 293, 217-228 (2005).
- [3] Wu SC, Driver VR, Wrobel JS, Armstrong DG: Foot ulcers in the diabetic patient, prevention and treatment. *Vasc Health Risk Manag* 3, 65-76 (2007).
- [4] Vartanian SM, Conte MS. Surgical intervention for peripheral arterial disease. *Circ Res* 116, 1614-1628 (2015).
- [5] Brass EP et al. Parenteral therapy with lipo-ecraprost, a lipid-based formulation of a PGE1 analog, does not alter six-month outcomes in patients with critical leg ischemia. *J Vasc Surg* 43, 752-759 (2006).
- [6] Franz RW et al. Use of autologous bone marrow mononuclear cell implantation therapy as a limb salvage procedure in patients with severe peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 50, 1378-1390 (2009).
- [7] Esato K et al. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease. *Cell Transplant* 11, 747-752 (2002).
- [8] Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 94, 1543-1553 (2004).
- [9] Li TS et al. Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, 468-473 (2002).
- [10] Kubo M et al. Hypoxic preconditioning enhances angiogenic potential of bone marrow cells with aging-related functional impairment. *Circ J* 76, 986-994(2012).
- [11] Kubo M et al. Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, 590-595 (2008).

- [12] Kudo T et al. Hypoxic preconditioning reinforces cellular functions of autologous peripheral blood-derived cells in rabbit hindlimb ischemia model. *Biochem Biophys Res Commun* 444, 370-375 (2014).
- [13] Matsuura K, Utoh R, Nagase K, Okano T. Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine. *J Control Release* 190, 228-239 (2014).
- [14] Sawa Y, Miyagawa S. Cell sheet technology for heart failure. *Curr Pharm Biotechnol* 14, 61-66 (2013).
- [15] Ohki T et al. Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. *Gastroenterology* 143, 582-588 (2012).
- [16] Watanabe K et al. Development of transplantable genetically modified corneal epithelial cell sheets for gene therapy. *Biomaterials* 28, 745-749 (2007).
- [17] Akizuki T et al. Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. *J Periodontal Res* 40, 245-251 (2005).
- [18] Takeuchi Y et al. Development of novel mouse model of ulcers induced by implantation of magnets. *Sci Rep* 7, 4843 (2017).
- [19] Behm B et al. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26, 812-820 (2012).
- [20] Tatiana N et al. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches. *Adv Skin Wound Care* 25, 304-314 (2012).
- [21] Vellayappan MN et al. Nanomaterials as a game changer in the management and treatment of diabetic foot ulcers. *RSC Adv* 6, 114859-114878 (2016).
- [22] Eming, SA et al. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127, 514-525 (2007).
- [23] Röhl J et al. The role of inflammation in cutaneous repair. *Wound Practice and Research* 23, 8-15 (2015).
- [24] Samura M et al. Combinatorial treatment with apelin-13 enhances



- the therapeutic efficacy of a preconditioned cell-based therapy for peripheral ischemia. *Sci Rep* 6, 19379 (2016).
- [25] Ueno K et al. Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. *Sci Rep* 6, 28538 (2016).
- [26] Takeuchi Y et al. Ulcer healing effect of autologous mixed sheets consisting of fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells in rabbit ischemic hind limb. *Am J Transl Res* 9, 2340-2351 (2017).
- [27] Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407, 313-319 (1997).
- [28] Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Benton G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 12, 267-274 (2009).
- [29] Tanaka Y et al. Autologous preconditioned mesenchymal stem cell sheets improve left ventricular function in a rabbit old myocardial infarction model. *Am J Transl Res* 8, 2222-2233 (2016).
- [30] Cerqueira MT, Pirraco RP, Martins AR, Santos TC, Reis RL, Marques AP. Cell sheet technology-driven re-epithelialization and neovascularization of skin wounds. *Acta Biomater* 10, 3145-3155 (2014).
- [31] Liu Y et al. In vitro construction of scaffold-free bilayered tissue-engineered skin containing capillary networks. *BioMed Res Int* 2013, 561410 (2013).
- [32] Horie T et al. Long-term clinical outcomes for patients with lower limb ischemia implanted with G-CSF-mobilized autologous peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis* 208, 461-466 (2010).
- [33] Moriya J et al. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv* 2, 245-254 (2009).
- [34] Tateishi-Yuyama E et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a

- pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet* 360, 427-435 (2002).
- [35] Zaja-Milatovic S, Richmond A. CXC chemokines and their receptors: A case for a significant biological role in cutaneous healing. *Histol Histopathol* 23, 1399-1407 (2008).
- [36] Murakami D et al. The effect of micropores in the surface of temperature- responsive culture inserts on the fabrication of transplantable canine oral mucosal epithelial cell sheets. *Biomaterials* 27, 5518-5523 (2006).
- [37] Chauhan SK, Lee HK, Lee HS, Park EY, Jeong E, Dana R. PTK7+ mononuclear cells express VEGFR2 and contribute to vascular stabilization by upregulating angiopoietin-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 1606-1615 (2015).
- [38] Kubo M, Li TS, Suzuki R, Ohshima M, Qin SL, Hamano K. Short-term pretreatment with low- dose hydrogen peroxide enhances the efficacy of bone marrow cells for therapeutic angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, 2582-2588 (2007).
- [39] Liu H et al. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1alpha in MSCs. *Biochem Biophys Res Commun* 401, 509-515 (2010).
- [40] Kubo M, Li TS, Kamota T, Ohshima M, Qin SL, Hamano K. Increased expression of CXCR4 and integrin alphaM in hypoxia-preconditioned cells contributes to improved cell retention and angiogenic potency. *J Cell Physiol* 220, 508-514 (2009).