

Abstract of Doctoral Thesis

Name: Melpa Susanti Purba

Title: Studies of Canine Fibroblasts for Resources of Veterinary Regenerative Medicine

(獣医再生医療の資源としての犬の線維芽細胞に関する研究)

Abstract of thesis:

Cell sheet technology has emerged as a promising approach for enhancing wound healing, particularly in challenging cases such as preventing postoperative complications. This method utilizes sheets of cells, which can promote tissue regeneration and accelerate the healing process through various mechanisms, including enhanced cell migration, angiogenesis, and cytokine secretion. Fibroblast is a well-known cell that produces cell sheets to improve wound healing. Fibroblasts play a crucial role in wound healing, acting as dynamic mediators of tissue repair through various mechanisms. Their functions include synthesizing extracellular matrix components, recruitment of immune cells, and modulation of inflammatory responses. When cell sheet technology shows great promise, challenges remain in standardizing production and ensuring consistent outcomes across different patient populations, especially in animals. The current studies established the cell sheet from canine fibroblast and investigated the effect of low-level laser therapy in canine fibroblast cells and fibroblast sheets.

The first chapter of the study is conducted to establish and characterize the canine multilayered fibroblast sheet from three origin tissues: oral mucosa, skin, and tail skin. This study uses large numbers of cells because this method is relatively simple and cost-effective compared with other cumbersome methods. A canine multilayered fibroblast sheet was produced using the large-numbers cell seeding method with Rho kinase inhibitor. Immunohistochemical examination revealed that the multilayered cell sheet comprised fibroblasts. Comparing the thickness of the cell sheet, the oral mucosa group showed the thickest layer compared to the others. In addition, we found that the proliferation of oral mucosal fibroblast was significantly higher than others, while the viability cell of the three groups was more than 90%. These results provide the primary data that oral mucosa has the potential as a source of fibroblast to develop the canine fibroblast sheet study.

The second chapter of the study describes the *in vivo* investigation, which was done by autologously transplanting the oral mucosa fibroblast sheet into the bronchial stump of the canine's lobectomy. Histological evaluation showed thicker soft tissue with a thicker collagen deposition on the transplanted site than the control group (without transplantation). Transplantation of fibroblast sheets on canines may stimulate wound healing and be expected to prevent leakage postoperatively.

The third chapter of the study employs low-level laser (LLL) therapy to evaluate the effects of LLL irradiation in canine fibroblasts. LLL irradiation stimulates cell growth by regulating the expression of genes related to cell proliferation, cell migration, DNA synthesis, and others. Since our first study used

large numbers to produce the sheet, an investigation of the proliferation of cells using LLL irradiation was done. In addition, the effect of LLL irradiation on migration cell ability and toxicity was evaluated along with proliferation cells. The investigation was done using an Erchonia® EVL dual-diode laser at wavelengths of 405 nm (5 mW) and 640 nm (7.5 mW) with irradiation times of 120, 360, and 1,800 sec. Our findings suggest that LLL therapy at wavelengths of 405 and 640 nm with an irradiation time of 120–360 sec (0.26–0.51 J/cm²) can stimulate the proliferation and migration of canine fibroblasts without causing the toxicity effects. Besides the impact of LLL therapy stimulating the proliferation of cells, this finding may contribute to a better understanding of the beneficial role of LLL stimulation in canine wound healing.

The last chapter extends our investigation into the effect of LLL therapy in canine fibroblast sheets by examining the toxicity and thickness of the sheet. Since LLL irradiation can improve processes relevant to tissue regeneration, we evaluated whether LLL irradiation affects the formation of cell sheets. This study used an Erchonia® EVL dual-diode laser at wavelengths of 405 nm (5 mW) with energy densities of 0.17 and 0.51 J/cm² and 640 nm (7.5 mW) with energy densities of 0.26 and 0.77 J/cm². The irradiation was done for six different group treatments. LLL therapy influences the thickness of the fibroblast sheet, suggesting its potential to enhance the proliferation of cells. All the irradiation groups at each energy density did not induce a higher cytotoxicity level than non-irradiation groups, demonstrating the safety of the LLL therapy. These findings suggest that LLL irradiation enhanced the thickness of the fibroblast sheet and was safely employed to produce the sheets.

In its entirety of chapters, the dissertation aims to provide primary data on regenerative medicine of canine fibroblast sheet combined with low-level laser therapy that stimulates wound healing. To the best of our knowledge, this is the first study to develop the canine fibroblast sheet and investigate the effect of LLL therapy on canine fibroblast cells and canine fibroblast sheet. The outcome of this research has considerable promise for improving regenerative medicine in the veterinary field.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	MELPA SUSANTI PURBA
審 査 委 員	主 査： 山口大学 教 授 谷 健二
	副 査： 山口大学 教 授 中市 統三
	副 査： 鹿児島大学 教 授 藤木 誠
	副 査： 山口大学 教 授 加納 聖
	副 査： 山口大学 教 授 早坂 大輔
題 目	Studies of Canine Fibroblasts for Resources of Veterinary Regenerative Medicine (獣医再生医療の資源としての犬の線維芽細胞に関する研究)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>創傷治癒の増殖期には線維芽細胞が増殖しコラーゲンを産生することによって、組織欠損部が補填される。実際の患部の欠損は複合的で、細胞シート工学を用いた移植治療を成功させるためには、動的な 3 次元形状に追従可能な細胞シートが必要であり、細胞資源として線維芽細胞が多く報告されている。多層細胞シートは単なる細胞群や単層細胞シート移植に比べて臨床的な操作性が優れており、臨床的意義が高いとされている。低出力レーザー (LLL) 治療は副作用が軽微で創傷治癒促進効果があることから、ヒトおよび獣医療において広く普及しているが、必ずしも科学的根拠に基づいた治療としては認知されていない。</p> <p>本学位論文では、獣医再生医療の資源としての犬の線維芽細胞に関する研究を行った。犬の口腔粘膜由来線維芽細胞の多層細胞シート作製に成功し、気管支断端瘻モデル犬に自己移植したところ、創傷治癒を促進する結果が得られた。また、LLL 治療は犬の線維芽細胞の増殖と遊走能を促進することが明らかになり、細胞シートに対して、より多層なシート作製に作用することが明らかになった。</p> <p>第一章では、健常ビーグル犬の口腔粘膜、体幹皮膚および尾部皮膚から線維芽細胞を分離培養し、高密度に細胞を播種することで多層細胞シート作製を試みた。マウス・ラットの細胞シート作製法で実施したところ、犬の線維芽細胞はシート状にはならなかった。Rho キナーゼ阻害剤を添加したところ、多層細胞シートが作製可能であった。また、口腔粘膜由来線維芽細胞は他の部位から得られた線維芽細胞に比べて増殖能力が高く、失敗することなく細胞シートが得られた。これら細胞シートは VEGF や MCP-1 などのサイトカインを産生することが確認された。第二章では、気管支断端瘻モデル犬を用いて自己多層細胞シート移植治療の効果を確認した。全身麻酔下で健常ビーグル犬 (n=6) の口腔粘膜組織から線維芽</p>	

細胞を分離し多層細胞シートを作製した。多層細胞シートが得られた後、再び全身麻酔を行い同一個体に対して医療用ステープラーを用いて左肺葉摘出術を実施し、無処置群 (n=2) および移植治療群 (n=2) に別けた。移植 1 週間後に安楽死を実施し病理組織学的検査に供した。無処置群に比べて移植群の気管支断端にはコラーゲン豊富な結合組織で覆われていた。これらのことから多層細胞シート移植は気管支断端の治癒促進に寄与し、気管支断端瘻の予防に有用な治療である可能性が示唆された。第三章では、培養線維芽細胞に対する LLL 治療効果について検討した。犬の口腔粘膜由来線維芽細胞を培養し、LLL 治療 (Erchonia® EVL, 波長 405 nm(5m W) および 640 nm(7.5 mW)) を 120 秒、360 秒、1,800 秒間、実施したところ、120 秒および 360 秒 (0.26–0.51 J/cm²) で細胞増殖および遊走能が増加することが明らかになった。第四章では、LLL 照射が細胞シートの多層性を促進するかについて検討した。第三章から得られた知見を基に LLL 治療 (Erchonia® EVL, 波長 405 nm(5m W) および 640 nm(7.5 mW)) を細胞増殖期およびシート作製期に実施したところ、細胞増殖期に作用させると細胞シートの多層性が増すことが明らかになった。また、いずれの条件でも無処置に比べて増殖性や多層性が低下することはなかった。

本研究から、犬の皮膚組織や口腔粘膜から採取した線維芽細胞から、多層細胞シートの作製に成功した。特に口腔粘膜由来の線維芽細胞は増殖能力が高く、細胞シート作製の細胞源として有用であると考えられた。同多層細胞シートは気管支断端に無縫合で移植可能であり組織補填できることが明らかになった。LLL 照射は犬の線維芽細胞の増殖および遊走能を向上させ、より多層な細胞シート作製を促進することが明らかになった。これらのことから、犬の線維芽細胞を細胞源とした再生獣医療の基礎的データが得られ、臨床的に有用とされている LLL 治療は再生獣医療をさらに発展させる可能性が示唆された。

以上より、本論文は博士 (獣医学) の付与に資する内容であると考ええる。