

中川浩志 論文内容の要旨

主 論 文

Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing

ヒト間葉系幹細胞は人工皮膚を用いた創傷治癒を促進する

H.Nakagawa, S.Akita, M.Fukui, T.Fujii, K.Akino

中川浩志 秋田定伯 福井雅士 藤井徹 秋野公造

British Journal of Dermatology · 153, pp.29-36, 2005 年 7 月

長崎大学大学院医学研究科外科系専攻

(指導教授：平野 明喜教授)

緒 言

皮膚欠損創では創面に高度の感染を伴う場合や母床に血行障害がある場合には、被覆が困難となることが多い。これらの創傷治癒に関する問題を解決するために再生医学の応用について検討した。

欠損部での細胞増殖の足場として人工真皮代用物（ペルナック、以下、人工真皮と略す）を使用し、これに創傷治癒促進に欠かせない蛋白である増殖因子を併用した。しかし、人工真皮と増殖因子のみでは創傷治癒が充分でないという報告が既になされており、増殖性・分化能力が高い骨髄由来間葉系幹細胞を人工真皮と増殖因子に加え、実際の創傷治癒に有効か検討を加えた。

対象と方法

実験にはヌードラット75匹を使用した。ラットの背部に肉様膜を含む1.5 × 1.5cmの全層皮膚欠損創を作成し、DMEM培地に 5×10^6 個のヒト間葉系幹細胞（以下 hMSCsと略す）または塩基性線維芽細胞増殖因子（以下bFGFと略す）を含浸させた人工真皮で創を被覆した。含浸させる培地により以下の5群（各群15匹）に分類した。 対照群：人工真皮にDMEM培地のみを含浸したもの、 hMSCs 単独群：人工真皮にhMSCsのみを含浸したもの、 hMSCs + bFGF 1 μ g群：人工真皮にhMSCsとbFGF 1 μ gを含浸したもの、 hMSCs + bFGF 10 μ g群：人工真皮にhMSCsとbFGF 10 μ gを含浸したもの、 hMSCs + bFGF 100 μ g群：人工真皮にhMSCsとbFGF 100 μ gを含浸したものである。各々につき、創傷の大きさ、組織像、蛋白発現の有無を術後3、7、42日目に測定した。創傷の大きさはデジタルカメラで撮影した画像をイメージ解析ソフト(NIH image)を用いて計測した。標本はヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織像を観察した。さらに、ヒト由来上皮組織マーカーであるパンサイトケラチン、ヒト間葉系細胞特異的表面マーカーであるCD29とCD44、ヒト特異的基底細胞膜表面マーカーであるインテグリン 3、ヒト表皮顆粒層に特異的に発現する皮膚由来抗ロイコプロテイン

ーゼ (Skin-derived anti-leukoproteinase以下SKALPと略す) の各免疫組織染色を行った。蛋白発現は術後7日の検体でウエスタンブロット解析を行った。

結 果

術後7日のhMSCs単独群の全層皮膚欠損創の大きさは対照群に比べ、約63%と有意に小さくなっていた。さらにbFGF含有群(1,10,100 μ g)ではhMSCs単独群に比べ、それぞれ約46%、20%、20%と有意に小さくなっていた。組織像では、対照群はそれ以外のhMSCsを含有する全ての群に比べて創断端の巻き込みが明らかであった。免疫組織学的にはパンサイトケラチンは術後3、7、42日のhMSCs含有群すべてに陽性であった。CD29とCD44はhMSCs含有群すべてにおいて3日で強陽性であり、特にbFGF10、100 μ g含有群では、免疫陽性細胞数は対照群が0に対しCD29が平均11.9、11.0、CD44が平均11.6、12.3と有意な細胞数の増加を認めた。インテグリン α 3とSKALPはbFGF存在下で容量依存的に発現上昇し、さらに経時的にも発現上昇が確認された。ウエスタンブロット法で施行した蛋白発現は抗ヒトパンサイトケラチンを一次抗体とする反応でhMSCs含有群において38kDaと42kDaに特異的発現を認めた。

考 察

間葉系マーカーは術後7日までに発現が減少し、上皮系マーカーは経時的・容量依存的に発現が上昇した。これは移植した幹細胞がより分化した上皮系細胞に変換したことを示している。また、ヒト細胞にのみ反応するパンサイトケラチンが術後7日のウエスタンブロット法解析でhMSCs含有群において38kDaと42kDaにその発現が認められた。これは、ヒト間葉系幹細胞由来組織がパンサイトケラチンを発現したものと思われ、上皮系への分化転換がタンパク発現で確認されたものと考えられる。同様に、免疫組織染色でもヒトパンサイトケラチンはhMSCs含有群でのみ発現が認められた。これらデータからhMSCsとbFGFの併用は皮膚欠損モデルにおいて創傷治癒を促進し、創傷部位で上皮に分化した。また、足場として用いた市販の人工真皮も有用であった。

ヒト由来特異的上皮系蛋白(サイトケラチン)を発現することから細胞の超越分化(trans-differentiation)や脱分化(de-differentiation)は本研究でも認められ、種を越えた場合にも認められる変化であると結論づけられ、非常に興味深いと思われた。本実験で用いた細胞や増殖因子、および人工真皮は既に臨床使用が許可されており、今後、臨床応用が可能になるのではないかと考えられた。