

論文の内容の要旨

1 申請者

防衛医科大学校 長野 寿人

2 論文題目

ナノシートを利用したスフェロイド化脂肪由来幹細胞の移植法に関する研究

3 論文の内容の要旨（博士：2,000 字程度）

（背景）

既存の治療法では治癒しない難治性皮膚潰瘍への効果的な治療法として、組織修復や臓器再生を促進する幹細胞移植の開発が期待されている。脂肪由来間葉系幹細胞 (Adipose-derived mesenchymal stem cells: ASCs) は脂肪組織から樹立できる体性幹細胞で、成長因子等の分泌によるパラクライン効果によって組織修復能がある。このため ASCs 移植は難治性皮膚潰瘍に対して有効な治療法と考えられている。しかし ASCs 移植後の細胞寿命が短命なため治療効率が制限されている事が大きな問題である。今回、移植後の細胞寿命の改善のために幹細胞のスフェロイド化に着目した。3 次元培養によって得られるスフェロイドは複数の細胞が凝集して形成される細胞塊で細胞-細胞間と細胞-細胞外マトリックス間の相互作用が維持されているため、移植後の細胞寿命の延長が期待できる。また、移植した幹細胞の生着と増殖を支持するための足場としてナノシートを利用した。ナノシートは 100 nm 程度の厚みの超薄膜で、接着剤なしで対象組織へ貼り着くことができるデバイスである。この高い接着性によってナノシートは細胞の足場として潜在的有用性があると予想でき、ASC スフェロイドと組み合わせることで創傷治癒を促進できると考えられた。

そこで本研究では、ASCs をスフェロイド化しナノシートで担持することで創傷治癒促進効果が得られるかについて明らかにすることを目的とした。そしてその効果機序として、ナノシートによって ASCs の接着が促進され ASCs が移植部位で増殖すると仮説を立てた。この仮説検証のために ASCs に発光遺伝子を導入し *in vivo imaging* で ASCs の生着を評価した。

（対象と方法）

ASCs 1000 cells/well を低吸着プレートで 24 時間培養してスフェロイドを得た。200 個のスフェロイドを遠心分離によって回収しナノシートへ滴下して担持させた。マイトマイシン C による難治性潰瘍モデル (8 週齢雄、C57BL/6) を作成し、上記の ASC スフェロイド担持ナノシートを移植した。まず、移植後の細胞の生存期間を評価するために ASCs に発光遺伝子であるナノランタンを導入した。ナノシートへの担持によって ASCs の生着や生存期間が改善するかについて *in vivo imaging* で検証した。次に創傷治癒促進効果の検証のため、創面積の測定、組織学的解析、肉芽組織中の成長因子の濃度測定を行った。実験群として皮膚欠損/未治療群、難治性潰瘍/未治療群、難治性潰瘍/ナノシート治療

群、難治性潰瘍/ASC スフェロイド担持ナノシート治療群の 4 群に分けて創傷治癒を評価した。

(結果)

In vivo imaging による解析ではナノシートへ ASC スフェロイドを担持することで最大 10 日間発光が観察されたが、ナノシートで担持せず ASC スフェロイドのみを移植した場合は 3 日で発光が消失した。術後 14 日目の創面積は難治性潰瘍/ASC スフェロイド担持ナノシート治療群が最も小さく、特に難治性潰瘍/未治療群と比較して有意に小さかった。組織学的解析では、難治性潰瘍/ASC スフェロイド担持ナノシート治療群で最も肉芽組織の厚さと再生上皮長が増加した。血管新生と肉芽組織中の細胞増殖を反映する CD31 と Ki-67 による免疫組織化学染色による評価では、難治性潰瘍/未治療群と比較して難治性潰瘍/ASC スフェロイド担持ナノシート治療群でより多くの CD31、Ki-67 陽性細胞が見られた。また難治性潰瘍/ASC スフェロイド担持ナノシート治療群の肉芽組織中の血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) と肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) の濃度は、難治性潰瘍/未治療群と比較してそれぞれ有意に増加していた (VEGF, 9.2 ± 4.5 ng/ml vs 1.0 ± 0.2 ng/ml, $p < 0.01$) (HGF, 59.4 ± 10.0 ng/ml vs 9.8 ± 3.4 ng/ml, $p < 0.01$)。

(考察)

本研究ではナノシートへの担持によって移植後の ASC スフェロイドの細胞寿命が 3 日から 10 日へ延長することを示した。ナノシートで担持せずに ASC スフェロイドのみを潰瘍部に滴下した場合は 3 日で発光が消失しており、ASC スフェロイド単独では皮膚欠損部との接着が弱いために細胞生存期間が短命になることが示唆された。ナノシートで担持した ASC スフェロイドにおいて移植直後から 7 日目まで発光が漸増しており、細胞増殖による細胞数の増加が考えられた。また、ASC スフェロイド担持ナノシートの移植によって創面積の縮小、肉芽組織の増生、上皮の再生、血管新生の促進などが観察され、創傷治癒が促進していた。ASC スフェロイドの移植によって肉芽組織中の VEGF や HGF 濃度が上昇しており、これらの血管新生因子のパラクライン効果によって創傷治癒が促進されたことが示唆された。

(結論)

本研究では、ASC スフェロイド担持ナノシートの移植システムを考案し、動物モデルにおいて創傷治癒促進効果が得られることを示した。肉芽組織中の VEGF と HGF 濃度が上昇しており、ASCs によるパラクライン効果によって創傷治癒が促進された可能性が示唆された。移植したスフェロイドは少なくとも 10 日間は創面に生着かつ増殖することが *in vivo imaging* によって示唆された。ASC スフェロイド担持ナノシートによる治療は、皮膚創傷分野において有効な細胞移植治療の一つになりうると考えられた。

4 キーワード (5 個程度)

「adipose-derived stem cells」 「spheroid」 「nanosheet」 「*in vivo imaging*」
「wound healing」