

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

ながの ひさと
長野 寿人

(救急医学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度

目 次

第 1 章 背景	1
第 2 章 対象と方法	4
(1) スフェロイド移植	4
1.1. 細胞調整とスフェロイド形成	
1.1.1. Adipose-derived stem cells (ASCs) の培養	
1.1.2. ASCs への発光遺伝子 (ナノランタン) の導入と細胞評価	
1.1.2.1. ASCs への発光遺伝子 (ナノランタン) の導入	
1.1.2.2. 遺伝子導入効率の評価	
1.1.2.3. 細胞表面マーカーの確認	
1.1.2.4. 細胞数と発光量の相関	
1.1.3. スフェロイド培養	
1.2. ナノシートの合成	
1.2.1. ナノシートの合成方法	
1.2.2. 蛍光物質含有ナノシートの合成	
1.3. ASC スフェロイド担持ナノシートの作製	
(2) 病態モデル動物の作製	7
2.1. マイトマイシン C による難治性潰瘍モデルの作製	
2.2. ASC スフェロイド担持ナノシートの移植	
(3) 治療効果の評価方法	9
3.1. <i>In vivo</i> imaging	
3.1.1. ASCs の生着・生存の評価	
3.1.2. ナノシートの分解度の評価	
3.2. 創傷治癒の評価	
3.2.1. 創面積の測定	
3.2.2. 組織学的解析	
3.2.3. 免疫組織化学染色による解析	
3.2.4. 成長因子濃度の測定	

(4) 統計解析	11
第 3 章 結果	12
(1) ASC スフェロイド担持ナノシート移植後の細胞生存期間	
1. 1. ASC スフェロイドの特性	
1. 2. ASCs の生着・生存期間	
1. 3. ナノシートの分解の推移	
(2) ASC スフェロイド担持ナノシートの創傷治癒促進効果	
2. 1. 創面積の経時的な推移	
2. 2. 肉芽増生と再生上皮	
2. 3. 血管新生、細胞増殖	
2. 4. 成長因子濃度	
第 4 章 考察	15
第 5 章 結論	18
謝辞	19
略語一覧	21
引用文献	22
図表	33

第1章 背景

はじめに

難治性皮膚潰瘍は既存の治療法で治癒するのが困難な創傷で、糖尿病や重症虚血肢を基礎疾患として発症することが多い。これらの難治性皮膚潰瘍を契機として感染症を併発し四肢の切断や敗血症への進行から死に至ることもある。近年の創傷治療の発展に伴い FGF-2 製剤（trafermin: フィブラストスプレー®、科研製薬、東京）、陰圧閉鎖療法、人工真皮などの治療によってこれらの難治性潰瘍もある程度治癒することができるようになった。しかし依然として治療抵抗性の難治性皮膚潰瘍は存在し、効果的な治療法の開発が望まれている。

脂肪由来間葉系幹細胞と創傷治癒

間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells: MSCs）は脂肪組織中に存在する体性幹細胞で、サイトカインや成長因子の分泌能(1, 2)、損傷臓器へのホーミング能力(3)、組織修復能などを有するので再生医療分野において細胞移植の重要な供給源である。MSCs は当初骨髄から樹立されたが、その後脂肪組織からも容易に MSCs を分離可能なことが報告され、Adipose-derived MSCs（ASCs）と呼ばれている(4)。骨髄から採取する必要がある MSCs と比較すると ASCs は脂肪組織から採取可能であるため、採取に伴う侵襲が少ない。また ASCs 移植による組織修復効果は心筋再生(5)、骨再生(6)、血管新生(7)などの幅広い臓器において確認されている。皮膚創傷においても ASCs は熱傷(8)、糖尿病性潰瘍(9)、虚血性四肢潰瘍(7)などの治療で有効性が確認されており、皮膚難治性潰瘍に対しても有効な治療法になりうると考えられる。これらの治療効果は主に ASCs が損傷臓器において分泌するサイトカインや成長因子（パラクライン効果）によって得られていると考えられている(10)。しかし ASCs の移植後の細胞生存期間は非常に短く、この事は ASCs の治療効率を妨げる大きな問題である(11-13)。

これまでの報告では移植後 72 時間以内に移植された ASCs のほとんどが失われており (11, 14)、この細胞生存期間の短さの原因として、低栄養状態、局所的な低酸素状態 (15, 16)、細胞と細胞外マトリックスとの接着の喪失によって誘導される接着細胞のアポトーシスの一種である Anoikis によって生じる細胞死 (17) などが考えられている。

細胞のスフェロイド化と移植後の細胞生存期間

著者らはこの細胞生存期間の短さを改善し、創傷治癒促進効果を増強する目的で細胞のスフェロイド化に着目した。3-dimensional (3D) culture 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その中では細胞-細胞間、細胞-細胞外マトリックス間の相互作用が保たれている。スフェロイドは細胞間および細胞-細胞外マトリックス間の相互作用により、アノイキスや過酷な微小環境に対する耐性を有している (18, 19)。また近年幹細胞のスフェロイド化は、細胞の生存期間を延長する可能性があるとの報告されている (20, 21)。さらにスフェロイドは 2-dimensional monolayer (2D) culture の場合に比べてパラクライン効果が増強するとの報告もある (22, 23)。したがって ASCs をスフェロイド化して皮膚潰瘍部に移植することは single cell suspension 状態の ASCs を移植するよりも細胞の生存期間を延長し創傷治癒を促進できると考えられる (24, 25)。

幹細胞の足場としてのナノシート

一般的に幹細胞移植の際には、細胞の生着と増殖のための土台となる足場 (scaffold) が必要と考えられている。また足場は細胞、サイトカインとともに組織修復や臓器再生において重要な再生医療の 3 要素である。ASC スフェロイドの形成と保持をサポートするために、これまでもいくつかの生体材料 (ヘパリン (26)、ハイドロゲル (27, 28)、その他 (29, 30))

が足場として使用されてきた。これらの足場を用いることで幹細胞スフェロイドの移植の際に ASCs の生着をサポートし、移植された ASCs は創傷治癒を促進することが報告されている。

一方、著者らの研究グループではこれまでに、生体材料をナノシートと呼ばれる超薄膜構造に形成したものを ASCs の足場として使用して創傷治癒研究を進めてきた(31, 32)。ナノシートは文字通りナノレベル(10~100 nm)の厚さをもったシートで、広範囲を被覆することが可能なデバイスである。このレベルの薄さゆえに、分子間力の1種であるファンデルワールス力が強く、分子間相互作用によって対象物質と強固に結合する。よって、接着剤なしで対象組織に貼り付けることが可能であり(33, 34)、ナノシートを組織欠損部と接着し密閉させることも可能となる。これまでに血管損傷(35)、腸管穿孔(36)、肺損傷(34)、皮膚欠損(32)などの動物モデルにおいてその効果を示してきた。

このようにナノシートは高い接着性を有し、細胞の足場としての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が、これまでに検証されてこなかった。

そこで本研究では、ナノシートとスフェロイド化 ASCs を組み合わせることで創傷治癒を促進できるかについて明らかにすることを目的とした(図 1)。そしてその効果機序として、ナノシートの接着性が ASCs の創傷への生着を促進して ASCs が移植部位で増加するとの仮説を立てた。この仮説検証のために、発光遺伝子(ナノランタン(37))を ASCs に導入し、*in vivo* imaging による非侵襲的かつ経時的な観察を行い、ASCs の生着と生存期間を評価した。

第 2 章 材料と方法

(1) スフェロイド移植

1.1. 細胞調整とスフェロイド形成

1.1.1. Adipose derived mesenchymal stem cells (ASCs) の培養

C57BL/6 マウス由来の ASCs (購入時 6 継代) を Cyagen Bioscience (Santa Clara, CA) から購入し実験に用いた。細胞は DMEM/F12 培地 (Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12) に 10% fetal bovine serum と 1% penicillin streptomycin を添加した培地中で 5% CO₂、大気圧、37 °C の条件下で培養した。実験には 10 継代までの細胞を使用した。

1.1.2. ASCs への発光遺伝子 (ナノランタン) の導入と細胞評価

1.1.2.1. ASCs への発光遺伝子 (ナノランタン) の導入

今回の実験では生細胞を *in vivo* で経時的に追跡する必要があったため、ASCs へ発光遺伝子であるナノランタンを導入した。発光タンパク質ナノランタン、蛍光タンパク Venus、ピューロマイシン耐性遺伝子の 3 つをコードするレトロウイルスベクターを ASCs に感染させた (ウイルスベクターは岡山大学工学部佐藤あやの先生から供与)。リコンビナントヒトフィブロネクチン (レトロネクチン®; タカラバイオ、東京、日本) でプレコート (80 μ g/ml) された培養 dish 上で、ASCs をレトロウイルスに感染させたのち、ピューロマイシン (6 μ g/ml) を添加して細胞の選別 (セレクション) を行った。そして、ピューロマイシンによって選別された細胞のみを継代培養し、以降の実験に供した (ナノランタン ASCs)。

細胞懸濁液の作製に関しては、次のように行った。培養中の ASCs (あるいはナノランタン ASCs) に 0.25% トリプシンを用いて dish から回収し、遠心分離で上清を破棄した後 2.0×10^5 細胞/50 μ l PBS (Phosphate-buffered saline) となるように再懸濁した。

1.1.2.2. 遺伝子導入効率の評価

遺伝子の導入効率を評価するために、遺伝子に組み込まれている蛍光タンパク (Venus) に由来する蛍光を測定した。蛍光計測にはフローサイトメトリー (FACS Cant II (BD Bioscience 社製)) を使用し、得られたデータは FlowJo™ソフトウェア (BD Biosciences 社製) で解析した。

1.1.2.3. 細胞表面マーカーの確認

ASCs とナノランタン ASCs の細胞表面マーカーに変化がない (差異のない) ことを確認するための実験を行った。まず Fc 受容体に対する非特異的バックグラウンドシグナルを軽減する目的で Fc ブロック処理を行い、以下の抗体で染色した。PE hamster anti-mouse CD29、Alexa Fluor 647 conjugated rat anti-mouse CD34、BV480 rat anti-mouse CD44、PerCP-Cy5.5 rat anti-mouse 7AAD、APC-Cy mouse anti-rat CD90、BV421 rat anti-mouse CD105、PE-Cy7 rat anti-mouse Sca-1 (全て BD bioscience から購入) の各抗体を加え 45 分間氷上で染色した。次に PBS で 2 回洗浄し、FACS Cant II (BD Bioscience 社製) でデータを取得し、FlowJo™ソフトウェア (BD Biosciences 社製) により解析した。

1.1.2.4. 細胞数と発光量の相関

ナノランタン ASCs の発光量が細胞数に比例して増加するか否かを検証する目的で、0 個から 384 個までのスフェロイドを 200 μ l の培地を含めて 24 well プレートに播種した。発光基質 Coelenterazine h (Fujifilm Wako Chemicals U.S.A, Richmond, VA) を各 well に 10 μ g ずつ添加した。発光強度は *in vivo* 発光・蛍光イメージング装置である IVIS Lumina series III (PerkinElmer) により測定した。

1.1.3. スフェロイド培養

ASC スフェロイドの作製のために ASCs 懸濁液を 96 well 低吸着プレート (Prime Surface®; MS-9096U, Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) に播種した。24 時間培養を続けることで、細胞同士が凝集したスフェロイドを得た (図 2)。播種細胞数と ASC スフェロイドの大きさの関係を調べる目的で、ASCs を 250 細胞から 8000 細胞/well までの細胞数に割り振ってスフェロイドを作製した。これらの細胞数で作製されたスフェロイドから分泌された VEGF (Vascular endothelial growth factor) の培養上清中の量を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で mouse VEGF Quantikine ELISA kit (R&D systems 社) を用いて測定した。

1.2. ナノシートの合成

1.2.1. ナノシートの合成方法

Micro Gravure™コーター ML-120 (Yasui Seiki Co., Ltd., Kanagawa, Japan) を用いて roll to roll 法 (連続式印刷技術法) の 1 種である gravure coating 法により生分解性ポリマーのナノシートを作製した (図 3)。生成されたナノシートを合成基盤であるロールからの剥離を容易にする目的で、ポリエチレンテレフタレート (polyethylene terephthalate; PET) フィルム上にポリビニルアルコール (polyvinyl alcohol; PVA) 溶液 (20 mg/ml) を塗布し、ナノシートを基盤から剥離した (line speed: 1.3 m/min、gravure speed: 30 rpm、100℃)。その後、生分解性かつ生体親和性の高い poly-D,L-lactic acid (PDLLA, Polysciences Inc. Warrington, PA) を材料としてナノシートを作製するために PDLLA を酢酸エチルに溶解したポリマー溶液 (20 mg/ml) を PVA コート PET フィルムに塗布した (line speed: 1.3 m/min、gravure speed: 30 rpm、60℃)。PVA コートされた PET フィルムに担持されたナノシートを 2 cm×2 cm に切り出し、蒸留水に浸して PVA 層を溶解させてナノシートを得た。ナノシートは生体への移植実験への使

用前にエチレンオキサイドガスで滅菌した。

1.2.2. 蛍光物質含有ナノシートの合成

皮膚欠損部に移植した後のナノシートの接着状況は、移植された細胞の生存を左右するため、移植部位におけるナノシートの存在を確認する必要がある。しかし、ナノシートは透明な超薄膜であるため、移植後に組織上で肉眼観察することが困難である。そこでナノシートの存在の確認のために、蛍光物質を含有するナノシートを作製した。蛍光物質にはナイルレッド (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) を用い、ポリマー溶液に溶解し (終濃度 3.5% (w/v))、上記のナノシートと同様の手順でナイルレッドナノシートを作製した。

1.3. ASC スフェロイド担持ナノシートの作製

低吸着培養によって得られた 200 個のスフェロイドを 50 ml コニカルチューブに回収し、1200 g、2 分間遠心分離して上清を破棄した。得られたスフェロイドペレットにハンクス平衡塩溶液 (20 μ l) を加え、個々のスフェロイドの構造が崩壊しないように穏やかにピペッティングして再懸濁した。得られた 200 個のスフェロイド懸濁液を 3 cm \times 3 cm のナノシートの中央 (約 2 mm の範囲) に穏やかに滴下して、ASC スフェロイド担持ナノシートを作製した (図 4)。

(2) 病態モデル動物の作製

2.1. マイトマイシン C による難治性潰瘍モデルの作製

以降の動物実験では防衛医科大学校動物実験倫理委員会 (許可番号: 19013) の承認を得て、指針・規則に従って動物実験を行った。

8 週齢の雄 C57BL/6 マウス (25-30 g) を日本 SLC (日本、静岡県) から購入した。3 種混合麻酔薬 (ミダゾラム 0.3 mg/kg、メデトミジン 4 mg/kg、ブトルファノール 5 mg/kg) をマウス腹腔内に投与し、過去の報告を参考

にマイトマイシン C による難治性皮膚モデルを作製した(38)。まずマウスの背部を剃毛後に脱毛剤 (Epilat®; Kracie Home Products, Tokyo, Japan)を用いて脱毛した。8 mm デルマパンチを用いてマウスの背部に皮筋を含む全層皮膚欠損創 (約 8 mm 径) を作製した。1 mg/ml のマイトマイシン C (10 v/v% ethanol and 90 v/v% ethylene glycol) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 20 μ l を皮膚欠損部の露出した筋膜上に局所的に塗布し、10 分間静置した。その後、生理食塩水でマイトマイシン C を洗い流して難治性潰瘍モデルとした。

2.2. ASC スフェロイド担持ナノシートの移植

ASC スフェロイド担持ナノシートの移植後にマウスの自傷や床敷による汚染を防止する目的で以下の手順で創傷被覆材でのドレッシングを行った。まず図 5A に示すように、皮膚欠損部を囲むように直径 10 mm の穴をあけたハイドロコロイドドレッシング (40 mm×30 mm, DuoactiveET®; ConvaTec, Berkshire, UK)を装着した。その後 ASC スフェロイドを含むナノシートを移植する群の場合は、スフェロイドが皮膚欠損部側になるようにナノシートを張り付けた。次に図 5B に示すように、エチレン/プロピレンゴム (Eptsealer®; Nitto Denko, Osaka, Japan)をハイドロコロイドドレッシングに貼付して外部環境から創部を保護した (図 5C)。創収縮を防ぐために創傷被覆材と皮膚を 5-0 ナイロン糸で 9 か所円周状に縫合した。乾燥防止のためにエチレン/プロピレンゴムにフィルムドレッシング (Opsite®; Smith and Nephew plc, Watlford, UK)を接着して創部を外気と遮断した。最後に粘着性のテープ (Silkytex®, ALCARE Co, Tokyo, Japan)でマウスの体幹と創傷被覆材を固定した。フィルムドレッシングと粘着性テープを剥がすことで創部に負荷を加えずに小窓から観察し (図 5D)、観察後は新しいフィルムドレッシングと粘着テープに交換した。ASC スフェロイド担持ナノシートの創傷治癒効果を検証するために、以下の 4

つの動物実験群で比較した（詳細は表 1 に記載）。

1. 皮膚と皮下組織を除去した後、マイトマイシン C、ASCs、ナノシートの処理・移植をいずれも行わない群（Untreated skin defect）
2. マイトマイシン C による難治性潰瘍に対して、ASCs とナノシートの移植を行わない群（Untreated RU: Untreated refractory ulcer）
3. マイトマイシン C による難治性潰瘍に対して、ASC スフェロイドを担持しないナノシートで治療した群（NS alone for RU: Nanosheet alone for refractory ulcer）
4. マイトマイシン C による難治性潰瘍に対して、ASC スフェロイド担持したナノシートで治療した群（ASCs spheroids NS for RU: ASCs spheroids nanosheet for refractory ulcer）

(3) 治療効果の評価方法

3.1. *In vivo* imaging

3.1.1. ASCs の生着・生存の評価

ナノランタン ASC スフェロイドからの発光を *in vivo* で可視化することで ASCs の生存期間を計測した。ナノランタン ASC スフェロイドを移植したマウスに 100 μ l の Coelenterazine h (0.5 mg/ml) を経静脈的に投与した。IVIS を用いて細胞の発光を観察し、Living Image®software 3.0 (PerkinElmer) を用いて発光の総量を算出した。発光は関心領域 (region of interests: ROI) を指定し総光量を計測した。コントロールとしてマウス周辺で、発光が無い部分の光量をバックグラウンドとして計測した。

3.1.2. ナノシートの分解度の評価

今回作製した PDLLA ナノシートは生体内で分解されるため、皮膚潰瘍部に移植した後のナノシートの残存の程度を評価した。前述のマイトマイシ

ン C による難治性潰瘍モデルにナイルレッドナノシートを移植した。移植 3、7、14、21 日目にナイルレッド由来の蛍光 (Excitation. 560 nm, Emission. 620 nm) を IVIS で測定し、残存するナノシートを算出した。

3.2. 創傷治癒の評価

3.2.1. 創面積の測定

皮膚潰瘍の創面積の経時的変化を計測するために、術後 0、3、7、10、14 日目にマウスとカメラの距離を一定にして写真撮影した。創部の面積は Image J ソフトウェア (39) で計測し、0 日目の皮膚潰瘍の面積を 100% として経時的な変化を算出した。

3.2.2. 組織学的解析

術後 14 日目にマウスを安楽死させて残存している皮膚潰瘍部を含む組織を採取し、10%ホルマリンで 24 時間固定した。その後、パラフィンブロック標本を作製して試料を切り出し、通常のプロトコールでヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。HE 染色した切片を顕微鏡で観察し、皮膚欠損部で肉芽組織の厚さと再生した上皮の長さを計測した。再生上皮は創縁の上皮部分から潰瘍部方向へ伸長するが、毛包などの付属器は再生されない。このため潰瘍部に最も近接した毛包部分の上皮を基準とし、潰瘍部方向へ伸長する上皮の長さを再生上皮長として計測した。

3.2.3. 免疫組織化学染色による解析

肉芽組織中の血管新生と細胞増殖を評価する目的で免疫組織化学染色をおこなった。抗体として CD31 (DIA-300; DIANOVA GimbH Hamburg, Germany) と Ki-67 (NCL-Ki67p; Leica Biosystems, Newcastle, UK) を用いた。試料切片を脱パラフィン処理後、10 mM クエン酸バッファーを用いて 10 分間抗原賦活化処理を行った。その後、3% H_2O_2 を用いて内因性ペルオキシダーゼを不活化し、Blocking One (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)

を用いて非特異的結合反応を阻害した。切片はそれぞれの一次抗体と二次抗体で染色し、3,3'-ジアミノベンジジン-4HCl (DAB)とメイヤーのヘマトキシリンで核染色を行った。400倍視野で各スライドからランダムに5視野抽出し、陽性細胞数を計測してその平均値を算出した。

3.2.4. 成長因子濃度の測定

肉芽組織中に存在する各成長因子のタンパク濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で計測した。移植7日目に創部の肉芽組織を採取し、500 μ l の RIPA 溶解・抽出バッファーと 5 μ l の Halt プロテアーゼ阻害剤 (Thermo Fisher Scientific 社)を添加した。肉芽組織を剪刀で細切り、氷上で 30 分間インキュベートした。その後、Physcotron homogenizer (Microtec 社製)を用いて 30,000 rpm で 30 秒から 45 秒ホモジナイズした。さらに 30 分間氷上でインキュベートし、遠心分離を 2 回行って組織塊 (ペレットとして沈殿)を破棄した。得られた上清に含まれる総蛋白の濃度を Pierce™BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。そして上清に含まれる次の抗体の量を mouse Quantikine ELISA kit (R&D systems 社)を用いて測定した (VEGF、EGF (Epidermal growth factor)、FGF (Fibroblast growth factor)、PDGF (Platelet-derived growth factor)、HGF (Hepatocyte growth factor))。得られたデータは Image J ソフトウェアで 4-parameter logistic curve 曲線を作製することで解析した。

(4) 統計解析

全てのデータは平均値±標準偏差で示した。2群間の解析には Wilcoxon signed rank test を適用し、多群間の解析には Kruskal-Wallis method を適用した (JMP pro14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA))。統計的な有意差ありの定義は $p < 0.05$ とした。

第3章 結果

(1) ASC スフェロイド担持ナノシート移植後の細胞生存期間

1.1. ASC スフェロイドの特性

ASCs スフェロイドの直径は播種する細胞数に応じて増加した（図 6A, 6B）。また 250 から 8000 cells/well で作製した 1 スフェロイドあたりの VEGF 分泌量も構成される細胞数に応じて増加した（図 6C）。ただし、1 細胞あたりの VEGF 分泌量の期待値は 1000 cells/well のスフェロイドで最も高かった（図 6D）。これらの結果を踏まえ 1 スフェロイドを作製するための ASCs 播種数は 1000 cells/well とした。

1.2. ASCs の生着・生存期間

レトロウイルスベクターでの ASCs への遺伝子導入後にナノランタンの特性を評価した。まずピューロマイシンでのセクションによってナノランタン ASCs の Venus 陽性率はフローサイトメトリー解析でほぼ 100%であることを確認した（図 7）。また、レトロウイルスの感染の前後でナノランタン ASCs の表現型が ASCs の表現型と変化がないことをフローサイトメトリーでの解析で確認した（図 8）。

ナノランタン ASCs による *in vivo* imaging の前に、まずナノランタン ASCs の発光強度がスフェロイド数の増加とともに増加することを *in vitro* の実験で確認した（図 9）。ナノシートで担持したナノランタン ASC スフェロイドを皮膚欠損部に移植したとき、投与した全てのマウスにおいて発光が 10 日間以上見られ、最大 14 日間観察できた個体もあった（図 10A 上段、図 10B）。一方ナノシートを用いないナノランタン ASC スフェロイドのみを移植した場合、ナノランタン ASC スフェロイドの発光は 3 日で消失した（図 10A 下段、図 10B）。ナノシートで担持したナノランタン ASC スフェロイド発光強度は 7 日目にピークを迎え、7 日目の強度は他の日の発光強度の 10 倍であった（図 10B）。

1.3. ナノシートの分解の推移

ナイルレッドナノシート単体を皮膚欠損部に貼付した場合、元の貼付面積を 100%としたときの 40%以上のナノシートが 14 日間潰瘍部に残存していることを IVIS で確認できた (図 11)。

(2) ASCs スフェロイド担持ナノシートの創傷治癒促進効果

2.1. 創面積の経時的な推移

4 つの動物実験群の中で最も創傷治癒が促進されていたのは、ASC スフェロイド担持ナノシートで治療した難治性潰瘍群 (ASCs spheroids NS for RU) であった。

図 12 に示すように術後 14 日目時点での ASCs spheroids NS for RU 群の潰瘍のサイズは、難治性潰瘍を有する他の実験群の潰瘍のサイズより有意に小さかった。術後 3 日目の潰瘍のサイズは、ASCs spheroids NS for RU 群と Untreated RU 群でほぼ同じであったが ($89.6 \pm 6.4\%$ vs $89.5 \pm 6.1\%$, $p > 0.05$)、その以降 ASCs spheroids NS for RU 群では、7 日目 ($47.3 \pm 8.5\%$ vs $74.6 \pm 7.1\%$, $p < 0.01$)、10 日目 ($24.1 \pm 10.5\%$ vs $66.5 \pm 9.4\%$, $p < 0.01$)、14 日目 ($12.8 \pm 4.7\%$ vs $49.1 \pm 7.9\%$, $p < 0.01$) と潰瘍のサイズが Untreated RU 群と比較して小さかった (図 13)。

2.2. 肉芽増生と再生上皮

残存する潰瘍部を含む創部の病理学組織的観察では 4 つの実験群の中で、ASC スフェロイド担持ナノシートによって治療した難治性潰瘍群 (ASCs spheroids NS for RU) の肉芽組織が最も厚く、上皮の再生が促進されていることが示された (図 14)。ASC spheroids NS for RU 群のマウスの肉芽組織の厚さは、Untreated RU 群のマウスの 4.8 倍、Untreated skin defect 群のマウスの 1.6 倍であった (図 15)。NS alone for RU 群のマウスでは肉芽組織の増殖促進は見られなかった。ASC spheroids NS for RU 群のマ

ウスの再生上皮長は、Untreated RU 群のマウスの 2.4 倍、Untreated skin defect 群のマウスの 1.3 倍であった（図 15）。

2.3. 血管新生、細胞増殖

ASC spheroids NS for RU 群の肉芽組織における CD31 陽性細胞数は Untreated RU 群と比較して有意に多かった (52.3 ± 14.9 vs 10.5 ± 3.7) (図 16)。

同様に ASC spheroids NS for RU 群の Ki-67 陽性細胞数も Untreated RU 群と比較して有意に多かった (110.8 ± 20.4 vs 31.6 ± 18.8) (図 17)。

2.4. 成長因子濃度

ASC spheroids NS for RU 群の組織中の血管内皮増殖因子 (VEGF) および肝細胞増殖因子 (HGF) の濃度は、Untreated RU 群の組織中の濃度に比べてそれぞれ約 9 倍および 6 倍大きかった (1g タンパクあたりの量の平均値を表示)。線維芽細胞成長因子 (FGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、上皮成長因子 (EGF) の濃度は、ASC spheroids NS for RU 群と Untreated RU 群との間に有意差は見られなかった（図 18）。

第 4 章 考察

本研究では ASCs スフェロイドをナノシートで担持することにより移植後の細胞生存期間が 10 日以上へ延長することがわかった。また、ナノシートで担持された ASC スフェロイド移植によって VEGF 分泌や HGF 分泌が促進され、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。

本研究ではスフェロイドを作製するにあたって、内部が細胞死せず最大のサイズとなるような細胞数を採用した。スフェロイドを構成する ASCs への栄養は外側からの単純拡散によって供給されるため、スフェロイドのサイズが大きすぎる場合、内部の細胞には栄養が届かず細胞死に至る。過去の報告でも、スフェロイドの直径が 200 μm 以上の場合には内部の細胞死が増加(40)するので、スフェロイドの大きさは直径 100-150 μm 程度に制限した方がよいと考えられる(41)。著者らも ASCs スフェロイドは播種する細胞数に応じてその大きさが増加することを確認し、200 μm 以下のスフェロイドが作製できる ASCs 播種数が 1 スフェロイドあたり 1000 細胞以下であることを確認した。また 1 スフェロイドが分泌した VEGF 総量から 1 細胞あたりの VEGF 分泌量の期待値を計算すると 1000 細胞以下で作製したスフェロイドでは播種細胞数に応じて漸増し、2000 細胞以上で作製したスフェロイドの時は減少した。スフェロイドの直径 200 μm 以上の時にスフェロイドの内部が細胞死しているという報告を考慮すると、VEGF 分泌の総量が減少した可能性があると考えられた。

また、皮膚欠損部に滴下した ASC スフェロイドはナノシートが無い場合数日で消失していることから(図 10)、ASC スフェロイドの皮膚欠損部への接着能は弱く細胞生存期間は短命であることが示唆された。したがってこれまでの報告の通り、ASC スフェロイドを皮膚欠損部に強固に生着させるような移植は、足場なしでは困難であると考えられた。一方で ASC スフェロイドは多くの場合ナノシートの中央部にのみ存在し、それ以外の周辺

部には細胞が存在しなかった。このことより、無細胞領域の存在が糊代のように働き、スフェロイドと組織との接着を増強したと考えられた。

本研究ではナノランタンを用いて ASC スフェロイドの生存期間を定量的に測定できる非侵襲的な *In vivo* imaging システムを確立し、移植後の生細胞数を経時的に評価することができた。このシステムを用いることで、ASC スフェロイド担持ナノシートにおける ASCs の生存時間が、ナノシートで担持されていない ASC スフェロイドの場合よりも 4 倍以上長いことを明らかにすることができた(生存期間 14 日 vs 3 日)。また術後 7 日目にはナノシートの 80% 以上が残存し、ナノランタン ASCs の発光は 10 日目まで残存した。14 日目にはナノシートの約 40%が残存していたが、ナノランタン ASCs の発光は 14 日目に著しく減少していた(10 日目比 1%の発光)。この結果は、ナノシートによって少なくとも 10 日目までは細胞が創部に保持され、外部環境によって生じる乾燥などの細胞への悪影響を受けにくくなっていたことを示している。以前の報告(42-44)から、局所投与による ASCs の細胞生存期間は最大 8 日と考えられるが、著者らの移植法により細胞生存期間をさらに延長させることができたと考えられる。また図 10 のようにナノシートで担持されたナノランタン ASC スフェロイドの 7 日目の発光強度は 1 日目と比較して 10 倍に増加していることから、移植後にスフェロイド内の細胞は増殖している可能性が示唆された。

本研究ではナノシートで担持された ASC スフェロイド移植群で肉芽組織中の VEGF と HGF 濃度が上昇しており、創傷治癒も促進していた。この結果から損傷部位に移植された幹細胞から放出される成長因子やサイトカインが周囲の細胞に作用するパラクライン効果(45, 46)によって創傷治癒が促進された可能性が考えられた。過去の報告でも ASCs は VEGF、HGF、FGF、EGF、PDGF を含む様々な成長因子(47)を産生することが知られている。今回の実験ではナノシートで担持した ASC スフェロイドの移植によって VEGF と HGF 濃度は未治療の難治性潰瘍群と比較して有意に上昇 (VEGF: 9

倍、HGF: 6 倍、 $p < 0.01$) していた。VEGF や HGF は血管内皮細胞 (48, 49)、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞 (50) の増殖を促進することが報告されており強力な血管新生因子である。VEGF と HGF は ASCs のパラクライン効果において中心的な役割を担っていると考えられており、多くの虚血性損傷モデルにおいて血管新生などの組織修復効果は ASCs から分泌された VEGF と HGF が寄与していると考えられている (10, 51-53)。一方で、今回ナノシートで担持した ASC スフェロイドの移植によって肉芽組織中の FGF、EGF、PDGF 濃度は有意な上昇はみられなかった。この理由として ASCs からの FGF、EGF、PDGF 分泌が少なく有意差を検出できない可能性が考えられる。また、ヒト ASCs の成長因子分泌の解析では、ASCs からの FGF、EGF、PDGF 分泌量は VEGF、HGF と比較して微量である (54-56) と報告されている。

本研究の今後の展望として今回作製した ASC スフェロイド担持ナノシートが糖尿病性潰瘍や重症虚血肢などの他の皮膚・皮下組織の治療に応用できる可能性がある。またこれまでの研究からナノシートには様々な薬効成分 (銀ナノ粒子 (57) やテトラサイクリン (58) など) を容易に担持できることが分かっており、これらの薬剤を付加することで創傷治癒をさらに促進することや感染創へ適応できるように機能を拡大することも期待できる。

本研究の限界は移植に最適なスフェロイドの数を検討していないことである。細胞継代の制限やサンプルサイズを考慮すると、200 個のスフェロイドが本研究で得られたほぼ最大数であった。この数のスフェロイドで有意な結果が得られたが、200 個のスフェロイドを使用する根拠は乏しく、さらなる検討が必要である。また一般に臨床の場合において、皮膚の創傷は本研究のものより桁違いに大きいため、本手法の直接的な臨床応用には限界がある可能性がある。ナノシートの表面積を大きくすることは可能であるが、本移植法が臨床応用のための大きな創傷に適用できるかどうかについては、今後検討する必要がある。

第 5 章 結論

本研究ではナノシートによる ASC スフェロイドの移植システムを考案し、その創傷治癒促進効果を動物モデルで検証した。移植され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 システムによって確認できた。ASC スフェロイド担持ナノシートで治療した難治性潰瘍群では移植後 14 日目の時点で、未治療群と比較して有意に潰瘍のサイズが減少した ($12.8 \pm 4.7\%$ vs $49.1 \pm 7.9\%$, $p < 0.01$)

ASC スフェロイド担持ナノシートで治療した難治性潰瘍群では肉芽組織中の 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。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。

謝辞

本研究にあたりご指導ご鞭撻を賜りました防衛医科大学校病院形成外科教授 東 隆一先生、同前教授 清澤 智晴先生、防衛医科大学校生理学講座教授 守本 祐司先生、防衛医科大学校免疫微生物学講座教授 木下 学先生に心より深く感謝申し上げます。また本研究を全般にわたりサポートをしていただいた形成外科医局秘書 石井 洋子様に深く御礼申し上げます。

また各実験にご協力いただきました東京工業大学 准教授 藤枝 俊宣先生、同研究室 田熊 めぐみ様、早稲田大学先進理工学部生命医科学科生体分子集合科学研究室 末松 良隆様に感謝申し上げます。

最後に私の研究生生活を常に支えてくれた妻 綾佳、長男 蒼祐に心から感謝致します。

付記

本論分の一部は、

2019 年 9 月 27 日 緊迫する国際情勢と CBRN 脅威に対する備え

「難治性潰瘍モデルを用いた新規治療法開発」

2020 年 8 月 22 日 日本ヒト細胞学会学術集会 シンポジウム

「ナノシートで担持した脂肪由来間葉系幹細胞スフェロイド移植法の確立と高輝度発光タンパク（ナノランタン）による細胞動態の評価」

で発表し、

基礎論文

Nagano H, Suematsu Y, Takuma M, Aoki S, Satoh A, Takayama E, Kinoshita M, Morimoto Y, Takeoka S, Fujie T, Kiyosawa T. Enhanced cellular engraftment of adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids by using nanosheets as scaffolds. Sci Rep. 2021 Jul 14;11(1):14500. doi: 10.1038/s41598-021-93642-6. PMID: 34262089; PMCID: PMC8280158.

に掲載された。

略語一覽

MSCs	Mesenchymal stem cells
ASCs	Adipose-derived MSCs
3D	3-dimensional
2D	2-dimensional
PDLLA	poly-d,l-lactic acid
BLI	bioluminescence imaging
PET	polyethylene terephthalate
PVA	polyvinyl alcohol
DMEM/F12	Dulbecco's modified eagle medium, nutrient mixture F-12
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
PBS	Phosphate buffered saline
VEGF	Vascular endothelial growth factor
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
PDGF	Platelet-derived growth factor
HGF	Hepatocyte growth factor

引用文献

1. Jablonska A, Drela K, Wojcik-Stanaszek L, Janowski M, Zalewska T, Lukomska B. Short-Lived Human Umbilical Cord-Blood-Derived Neural Stem Cells Influence the Endogenous Secretome and Increase the Number of Endogenous Neural Progenitors in a Rat Model of Lacunar Stroke. *Molecular neurobiology*. 2016;53(9):6413-25.
2. Treacy O, O'Flynn L, Ryan AE, Morcos M, Lohan P, Schu S, Wilk M, Fahy G, Griffin MD, Nosov M, Ritter T. Mesenchymal Stem Cell Therapy Promotes Corneal Allograft Survival in Rats by Local and Systemic Immunomodulation. *American Journal of Transplantation*. 2014;14(9):2023-36.
3. Ryu CH, Park SA, Kim SM, Lim JY, Jeong CH, Jun JA, Oh JH, Park SH, Oh WI, Jeun SS. Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;398(1):105-10.
4. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
5. Singh A, Singh A, Sen D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010–2015). *Stem cell research & therapy*. 2016;7(1):82.
6. Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, Shi D, Liu L, Zheng Q, Gao C, Wang J. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem

cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *European cells & materials*. 2010;20:109-20.

7. Harada Y, Yamamoto Y, Tsujimoto S, Matsugami H, Yoshida A, Hisatome I. Transplantation of freshly isolated adipose tissue-derived regenerative cells enhances angiogenesis in a murine model of hind limb ischemia. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*. 2013;34(1):23-9.

8. Oryan A, Alemzadeh E, Alemzadeh E, Barghi M, Zarei M, Salehiniya H. Effectiveness of the adipose stem cells in burn wound healing: literature review. *Cell and tissue banking*. 2021.

9. Kato Y, Iwata T, Morikawa S, Yamato M, Okano T, Uchigata Y. Allogeneic Transplantation of an Adipose-Derived Stem Cell Sheet Combined With Artificial Skin Accelerates Wound Healing in a Rat Wound Model of Type 2 Diabetes and Obesity. *Diabetes*. 2015;64(8):2723-34.

10. Suga H, Glotzbach JP, Sorkin M, Longaker MT, Gurtner GC. Paracrine mechanism of angiogenesis in adipose-derived stem cell transplantation. *Annals of plastic surgery*. 2014;72(2):234-41.

11. Coyle R, Yao J, Richards D, Mei Y. The Effects of Metabolic Substrate Availability on Human Adipose-Derived Stem Cell Spheroid Survival. *Tissue engineering Part A*. 2019;25(7-8):620-31.

12. Don CW, Murry CE. Improving survival and efficacy of pluripotent stem cell-

derived cardiac grafts. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2013;17(11):1355-62.

13. Ho SS, Hung BP, Heyrani N, Lee MA, Leach JK. Hypoxic Preconditioning of Mesenchymal Stem Cells with Subsequent Spheroid Formation Accelerates Repair of Segmental Bone Defects. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2018;36(9):1393-403.

14. Davis BH, Morimoto Y, Sample C, Olbrich K, Leddy HA, Guilak F, Taylor DA. Effects of myocardial infarction on the distribution and transport of nutrients and oxygen in porcine myocardium. *J Biomech Eng*. 2012;134(10):101005-.

15. Tu Y, Qiu Y, Liu L, Huang T, Tang H, Liu Y, Guo W, Jiang H, Fan Y, Yu B. mi R -15a/15b Cluster Modulates Survival of Mesenchymal Stem Cells to Improve Its Therapeutic Efficacy of Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association*. 2019;8(1):e010157.

16. Li L, Chen X, Wang WE, Zeng C. How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart? *Stem cells international*. 2016;2016:9682757.

17. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013;1833(12):3481-98.

18. Shojaei F, Rahmati S, Banitalebi Dehkordi M. A review on different methods to increase the efficiency of mesenchymal stem cell-based wound therapy. *Wound repair*

and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2019;27(6):661-71.

19. Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 2019;8(12).

20. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Kim BS. Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization. *Tissue engineering Part A*. 2012;18(19-20):2138-47.

21. Ho SS, Murphy KC, Binder BY, Vissers CB, Leach JK. Increased Survival and Function of Mesenchymal Stem Cell Spheroids Entrapped in Instructive Alginate Hydrogels. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(6):773-81.

22. Lee EJ, Park SJ, Kang SK, Kim GH, Kang HJ, Lee SW, Jeon HB, Kim HS. Spherical bullet formation via E-cadherin promotes therapeutic potency of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood for myocardial infarction. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2012;20(7):1424-33.

23. Zhang Q, Nguyen AL, Shi S, Hill C, Wilder-Smith P, Krasieva TB, Le AD. Three-dimensional spheroid culture of human gingiva-derived mesenchymal stem cells enhances mitigation of chemotherapy-induced oral mucositis. *Stem cells and development*. 2012;21(6):937-47.

24. Li P, Guo X. A review: therapeutic potential of adipose-derived stem cells in

cutaneous wound healing and regeneration. *Stem cell research & therapy*. 2018;9(1):302.

25. Park I-S, Chung P-S, Ahn JC. Enhancement of Ischemic Wound Healing by Spheroid Grafting of Human Adipose-Derived Stem Cells Treated with Low-Level Light Irradiation. *PloS one*. 2015;10(6):e0122776-e.

26. Lei J, McLane LT, Curtis JE, Temenoff JS. Characterization of a multilayer heparin coating for biomolecule presentation to human mesenchymal stem cell spheroids. *Biomaterials science*. 2014;2(5):666-73.

27. Feng J, Mineda K, Wu SH, Mashiko T, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, Kanayama K, Asahi R, Sunaga A, Yoshimura K. An injectable non-cross-linked hyaluronic-acid gel containing therapeutic spheroids of human adipose-derived stem cells. *Scientific reports*. 2017;7(1):1548.

28. Murphy KC, Whitehead J, Zhou D, Ho SS, Leach JK. Engineering fibrin hydrogels to promote the wound healing potential of mesenchymal stem cell spheroids. *Acta biomaterialia*. 2017;64:176-86.

29. Hsu SH, Hsieh PS. Self-assembled adult adipose-derived stem cell spheroids combined with biomaterials promote wound healing in a rat skin repair model. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2015;23(1):57-64.

30. Lee JS, Chae S, Yoon D, Yoon D, Chun W, Kim GH. Angiogenic factors secreted

from human ASC spheroids entrapped in an alginate-based hierarchical structure via combined 3D printing/electrospinning system. *Biofabrication*. 2020;12(4):045028.

31. Nishiwaki K, Aoki S, Kinoshita M, Kiyosawa T, Suematsu Y, Takeoka S, Fujie T. In situ transplantation of adipose tissue-derived stem cells organized on porous polymer nanosheets for murine skin defects. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2019;107(5):1363-71.

32. Aoki S, Kinoshita M, Miyazaki H, Saito A, Fujie T, Iwaya K, Takeoka S, Saitoh D. Application of poly-L-lactic acid nanosheet as a material for wound dressing. *Plastic and reconstructive surgery*. 2013;131(2):236-40.

33. Fujie T, Okamura Y, Takeoka S. Ubiquitous Transference of a Free-Standing Polysaccharide Nanosheet with the Development of a Nano-Adhesive Plaster. *Advanced Materials*. 2007;19(21):3549-53.

34. Fujie T, Matsutani N, Kinoshita M, Okamura Y, Saito A, Takeoka S. Adhesive, Flexible, and Robust Polysaccharide Nanosheets Integrated for Tissue-Defect Repair. *Advanced Functional Materials*. 2009;19(16):2560-8.

35. Hagisawa K, Saito A, Kinoshita M, Fujie T, Otani N, Shono S, Park Y-K, Takeoka S. Effective control of massive venous bleeding by “multioverlapping therapy” using polysaccharide nanosheets in a rabbit inferior vena cava injury model. *Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders*. 2013;1(3):289-97.

36. Fujie T, Kinoshita M, Shono S, Saito A, Okamura Y, Saitoh D, Takeoka S.

Sealing effect of a polysaccharide nanosheet for murine cecal puncture. *Surgery*. 2010;148(1):48-58.

37. Suzuki K, Kimura T, Shinoda H, Bai G, Daniels MJ, Arai Y, Nakano M, Nagai T. Five colour variants of bright luminescent protein for real-time multicolour bioimaging. *Nature communications*. 2016;7(1):13718.

38. Nambu M, Ishihara M, Nakamura S, Mizuno H, Yanagibayashi S, Kanatani Y, Hattori H, Takase B, Ishizuka T, Kishimoto S, Amano Y, Yamamoto N, Azuma R, Kiyosawa T. Enhanced healing of mitomycin C-treated wounds in rats using inbred adipose tissue-derived stromal cells within an atelocollagen matrix. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2007;15(4):505-10.

39. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.

40. Tamura T, Sakai Y, Nakazawa K. Two-dimensional microarray of HepG2 spheroids using collagen/polyethylene glycol micropatterned chip. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2008;19(5):2071-7.

41. Anada T, Fukuda J, Sai Y, Suzuki O. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials*. 2012;33(33):8430-41.

42. Lam MT, Nauta A, Meyer NP, Wu JC, Longaker MT. Effective delivery of stem

cells using an extracellular matrix patch results in increased cell survival and proliferation and reduced scarring in skin wound healing. *Tissue engineering Part A*. 2013;19(5-6):738-47.

43. Kallmeyer K, Andre-Levigne D, Baquie M, Krause KH, Pepper MS, Pittet-Cuenod B, Modarressi A. Fate of systemically and locally administered adipose-derived mesenchymal stromal cells and their effect on wound healing. *Stem cells translational medicine*. 2019.

44. Muhammad G, Xu J, Bulte JWM, Jablonska A, Walczak P, Janowski M. Transplanted adipose-derived stem cells can be short-lived yet accelerate healing of acid-burn skin wounds: a multimodal imaging study. *Scientific reports*. 2017;7(1):4644.

45. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2012;30(5):804-10.

46. Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative medicine*. 2010;5(1):121-43.

47. Park BS, Jang KA, Sung JH, Park JS, Kwon YH, Kim KJ, Kim WS. Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 2008;34(10):1323-6.

48. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival

functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9(4):777-94.

49. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 5):853-65.

50. Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2010;86(6):588-610.

51. Song S-Y, Chung H-M, Sung J-H. The pivotal role of VEGF in adipose-derived-stem-cell-mediated regeneration. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2010;10(11):1529-37.

52. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. Novel Autologous Cell Therapy in Ischemic Limb Disease Through Growth Factor Secretion by Cultured Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(12):2542-7.

53. Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2006;291(4):R880-4.

54. Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. Locally Administered Adipose-

Derived Stem Cells Accelerate Wound Healing through Differentiation and Vasculogenesis. *Cell transplantation*. 2011;20(2):205-16.

55. Kim W-S, Park B-S, Sung J-H, Yang J-M, Park S-B, Kwak S-J, Park J-S. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*. 2007;48(1):15-24.

56. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-8.

57. Ito K, Saito A, Fujie T, Miyazaki H, Kinoshita M, Saitoh D, Ohtsubo S, Takeoka S. Development of a ubiquitously transferrable silver-nanoparticle-loaded polymer nanosheet as an antimicrobial coating. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2016;104(3):585-93.

58. Saito A, Miyazaki H, Fujie T, Ohtsubo S, Kinoshita M, Saitoh D, Takeoka S. Therapeutic efficacy of an antibiotic-loaded nanosheet in a murine burn-wound infection model. *Acta biomaterialia*. 2012;8(8):2932-40.

図表（参考文献 1 から引用または改変）

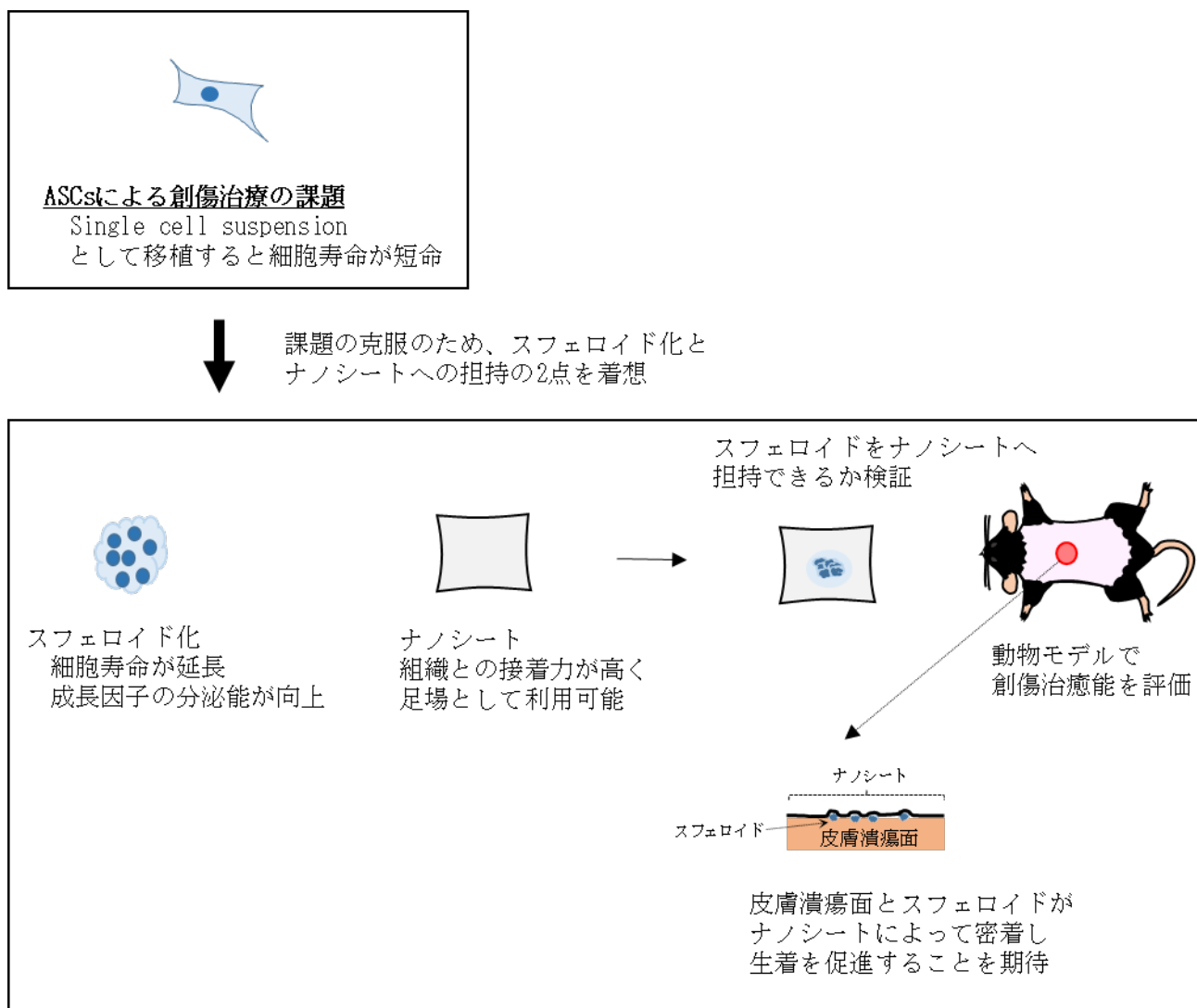


図 1 本研究の概略

ASCs による創傷治癒促進効果を高めるため、ASCs のスフェロイド化とナノシートへの担持の 2 点を着想し、この組み合わせによって創傷治癒促進効果が得られるかについて検証した。

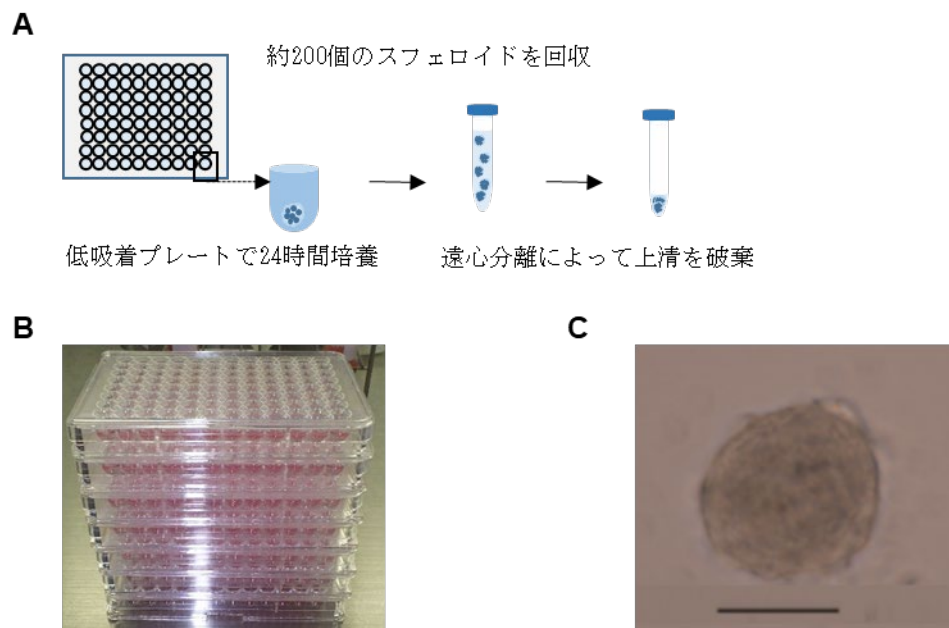


図 2 スフェロイドの調整

A. 低吸着プレートでスフェロイドを培養した。

低速遠心分離によって個々のスフェロイドを壊さずに洗浄し、上清を破棄した。

B. スフェロイド作製で使用した U 字型ボトム低吸着プレート

24 時間培養することで均一なスフェロイドを作製できる。

C. 1000 細胞の ASCs で作製した 1 個のスフェロイド (scale bar=100 μ m)

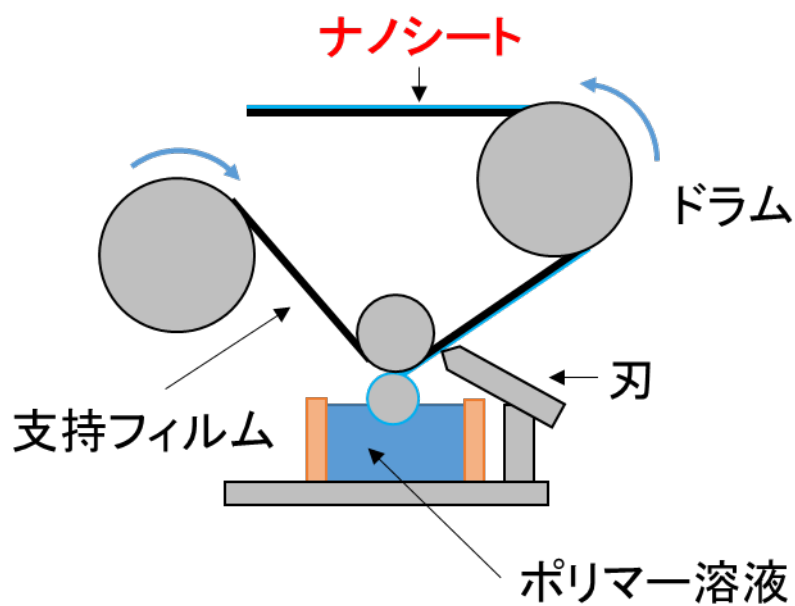


図 3 Roll to roll 法の概略 (<https://www.waseda.jp/inst/wias/news-en/2018/07/04/4958/>より引用、改変)

ナノシートの原材料となる PDLLA を基盤となる PET フィルムに連続的に塗布することで大きな面積のナノシートを製造できる。

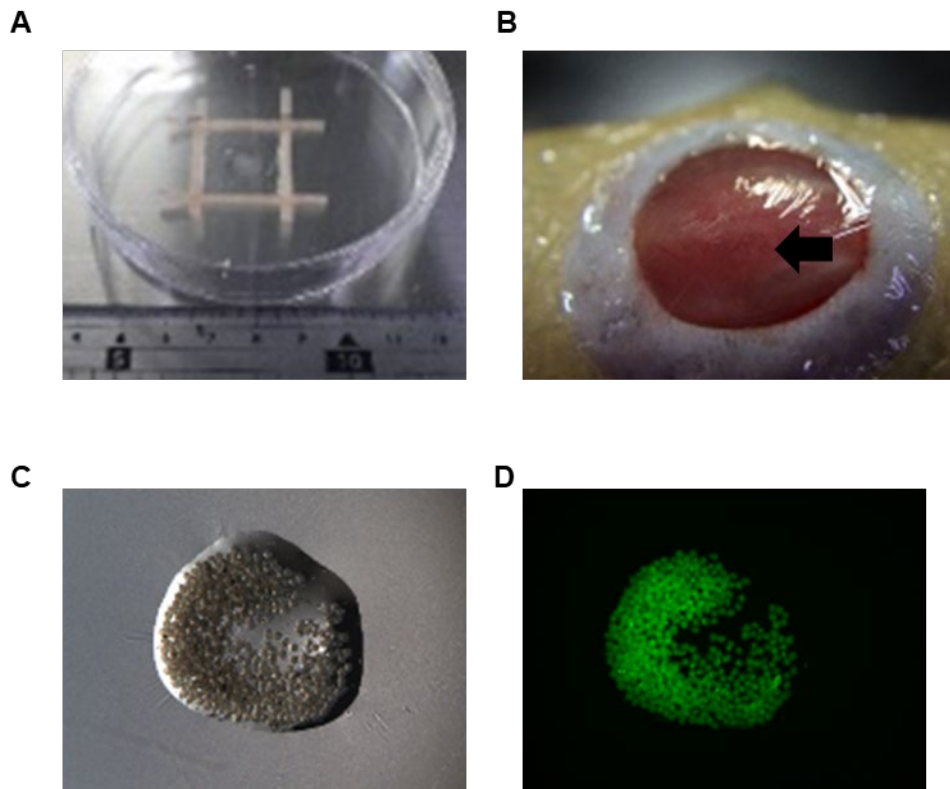


図4 ASCスフェロイド担持ナノシートの調整

A. ASCスフェロイド担持ナノシートのマクロ画像

PET film から剥離したナノシート上にスフェロイドペレットを滴下した。中央にある液滴はASCスフェロイドと $20\ \mu\text{l}$ の HBSS

B. 皮膚欠損部に移植されたASCスフェロイド担持ナノシート

移植されたスフェロイドは肉眼的に白色の点として観察できる（黒矢印）

C. ナノランタンASCスフェロイド担持ナノシートの拡大画像（明視野）

D. ナノランタンASCスフェロイド担持ナノシートの拡大画像（蛍光画像）

ASCスフェロイドは限局された範囲に集中して配置することが可能である。

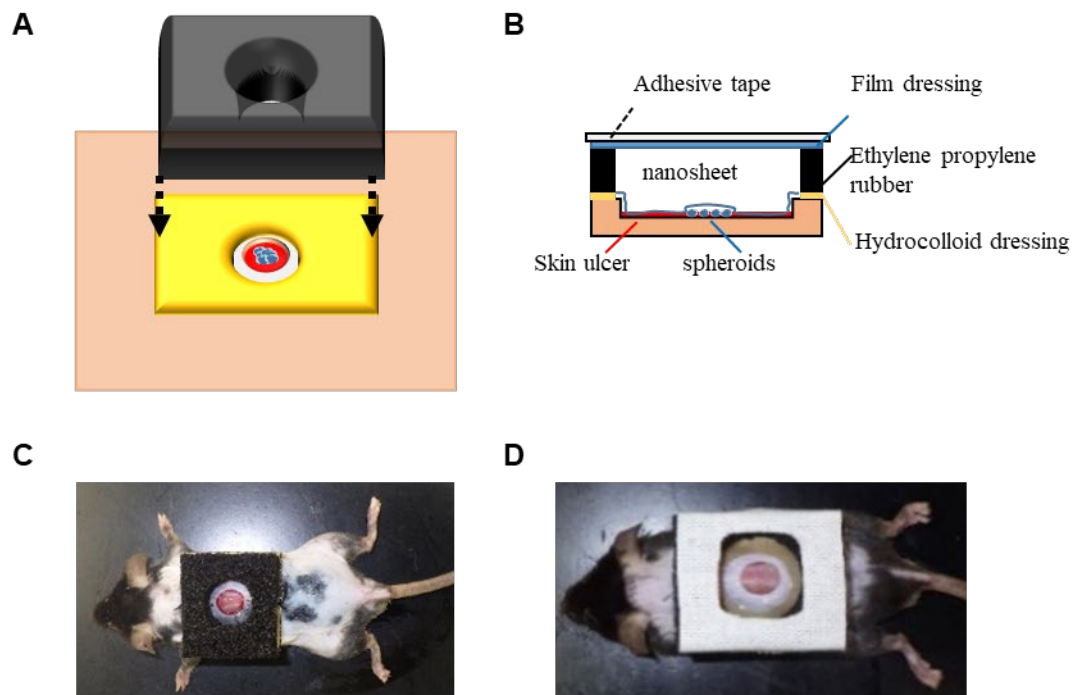


図 5 創傷部のドレッシングの方法

A. 移植されたスフェロイドと創傷被覆材との位置関係（平面図）

スフェロイド（水色）が移植された皮膚欠損部（赤色）の周囲に Hydrocolloid（黄色）を貼付し、その直上を創傷被覆材（Ethylene propylene rubber）（黒色）で被覆した。

B. 移植されたスフェロイドと創傷被覆材の位置関係（断面図）

図のように創傷被覆材で皮膚欠損部を囲うことで、スフェロイドを含む皮膚欠損部が外界から保護されるようにした。

C. ドレッシング途中の写真（adhesive tape 貼付前）

D. ドレッシング終了直前の写真（film dressing 貼付前）

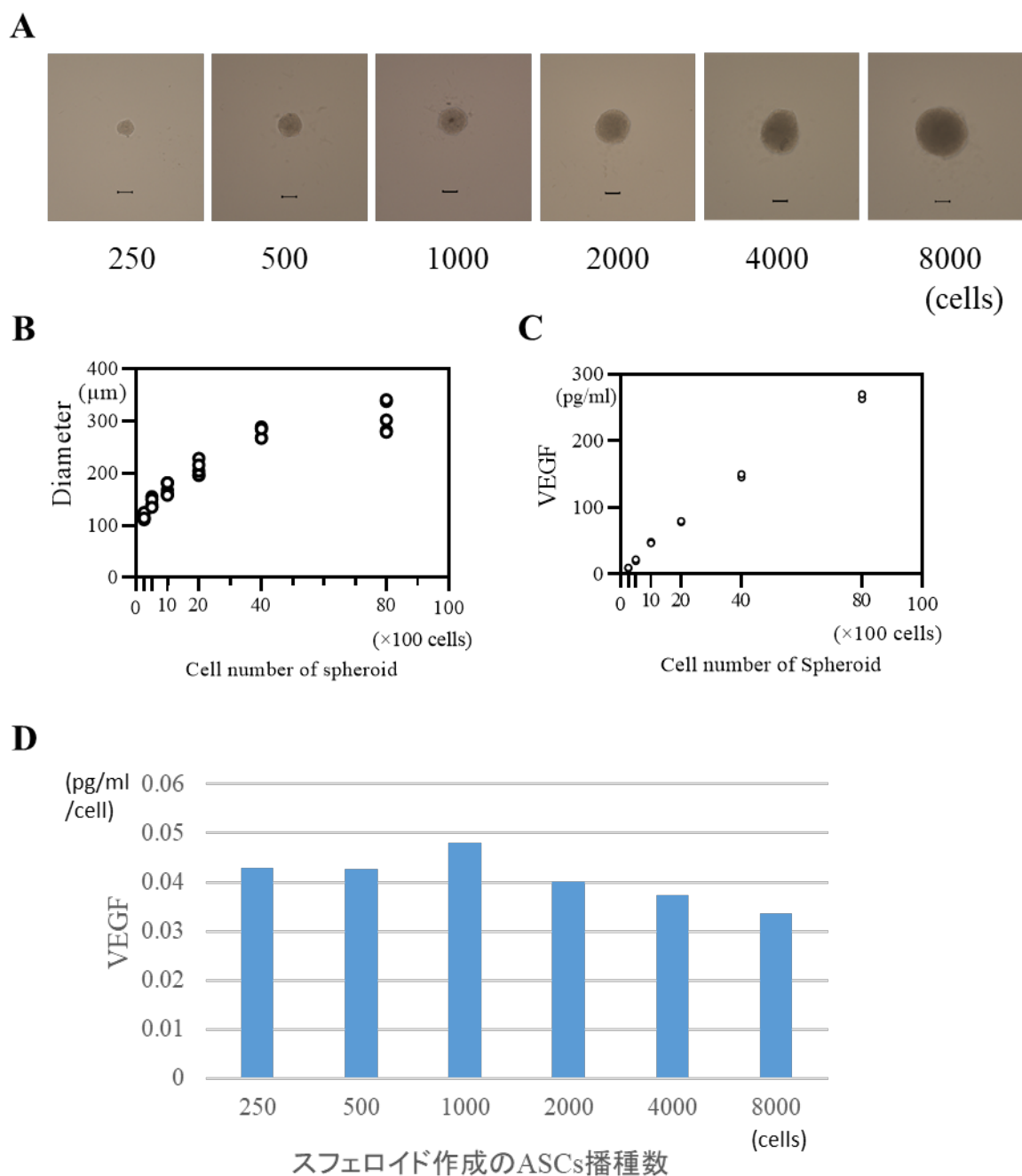


図 6 播種細胞数毎のスフェロイドの大きさと VEGF 分泌能の評価

- A. ASCs を 250 から 8000 cells/well まで段階的に細胞数を割り振ってスフェロイドを作製した。スフェロイドの大きさは細胞数に比例して大きくなった (scale bar=100 μ m)。
- B. 250 から 8000 cells/well で作製した ASC スフェロイドの大きさ (直径)

1 種類の個数あたり 3 個のスフェロイドを作製し、その直径を測定した。

播種する細胞数に応じてスフェロイドの直径は対数関数的に増加した。

C. 250 から 8000 cells/well で作製した ASC スフェロイドの培養上清中の VEGF 濃度。播種する細胞数に応じて VEGF 濃度は上昇した。

D. 250 から 8000 cells/well で作製した ASC スフェロイドの培養上清中の VEGF 濃度を 1 細胞あたりに換算した。「1 細胞の VEGF 分泌量の期待値 = 1 スフェロイドの VEGF 分泌量 / スフェロイド構成細胞数」の計算式に基づいて算出した。1000 cells/well で 1 細胞あたりの VEGF 分泌量の期待値が最も高かった。

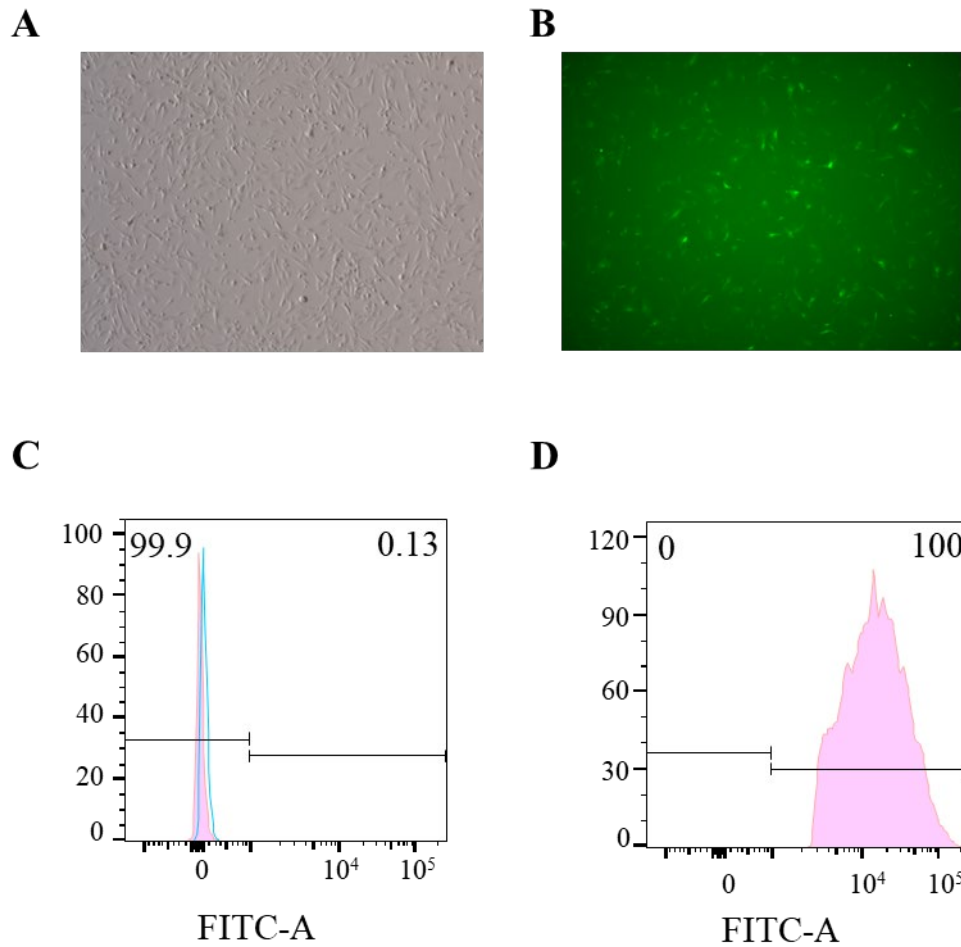


図 7 ASCs へのナノランタンの導入

- A. 野生型 ASCs (明視野)
- B. ナノランタンを導入した ASCs (蛍光画像)
- C. 野生型 ASCs のフローサイトメトリー解析
- D. ナノランタン ASCs のフローサイトメトリー解析

レトロウイルスによるナノランタン導入後 (同時に蛍光タンパク遺伝子 (Venus) とピューロマイシン耐性遺伝子が組み込まれている)、ピューロマイシン添加培地によるセクションによって純化した。セクション後ナノランタン ASCs のほぼ全ての細胞が Venus 陽性であることをフローサイトメトリーで確認した。

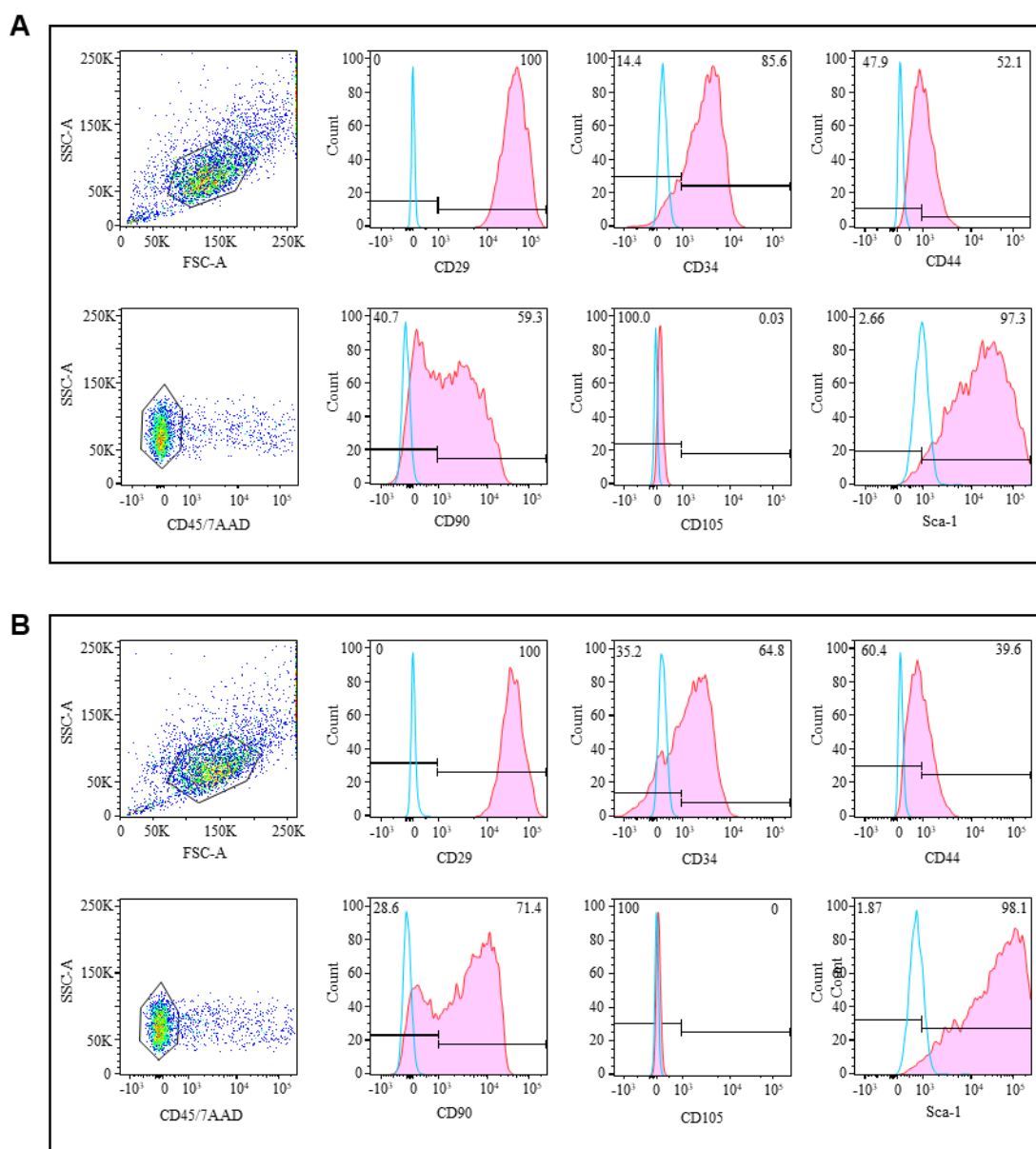


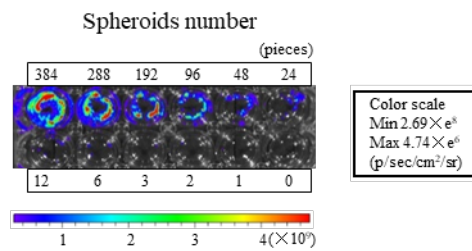
図 8 ASCs とナノランタン ASCs の細胞表面マーカーの比較

A. ASCs の細胞表面マーカー解析

B. ナノランタン ASCs の細胞表面マーカー解析

遺伝子導入の前後の細胞表面マーカーのパターンに大きな変化がないことを確認した。

A



B

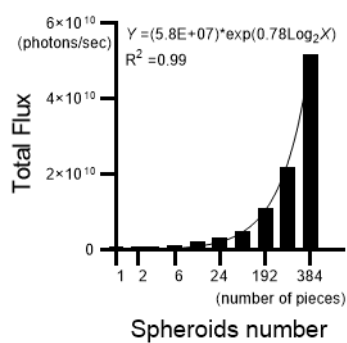


図 9 ASC スフェロイドの発光の解析 (*in vitro*)

A. IVIS による発光の解析

ASC スフェロイドを 0 から 384 個/well に割り付けてプレートに静置した。Coelenterazine h を加えて総発光量を解析した。

B. スフェロイド数毎の総発光量の比較

総発光量は ASC スフェロイドの数に比例して指数関数的に増加した。

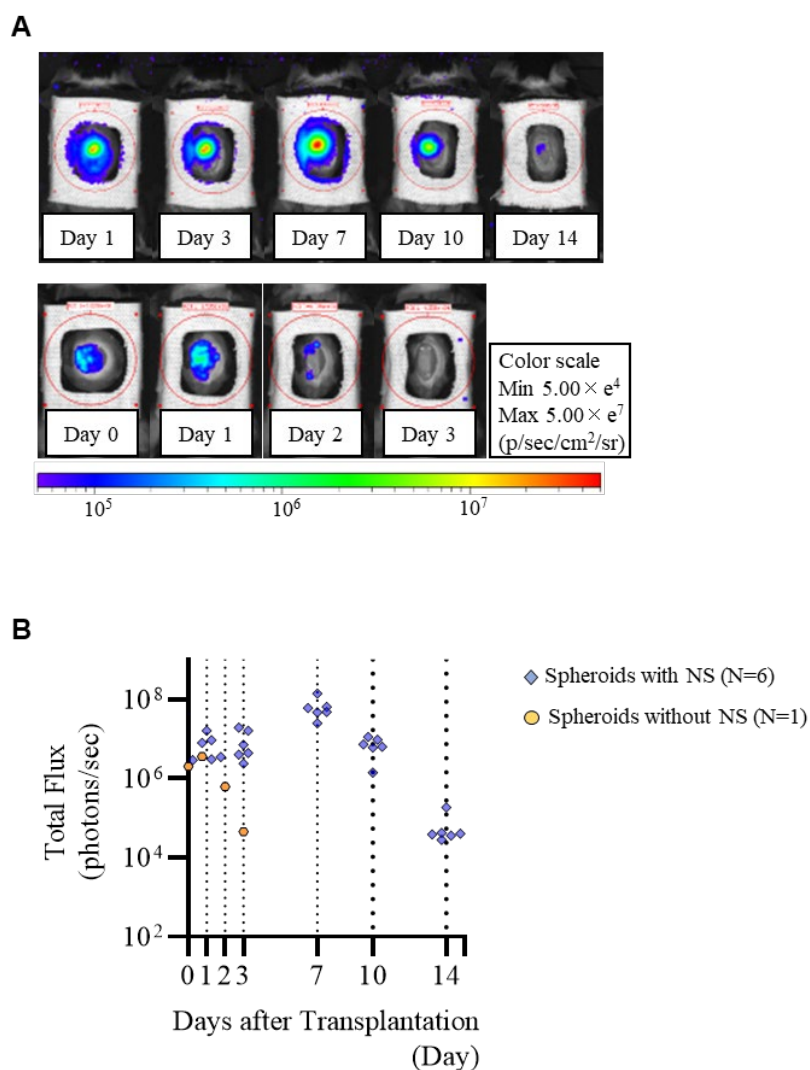


図 10 ナノシートの有無によるナノランタン ASC スフェロイドの総発光量比較 (*in vivo*)

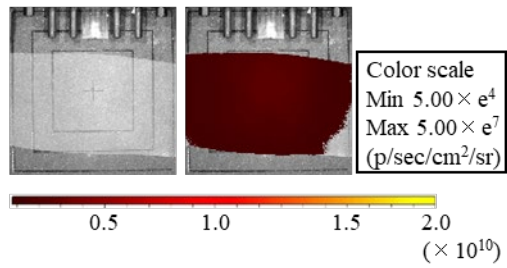
A. 上段：ナノシートで担持したナノランタン ASC スフェロイドの発光の経時的変化

下段：ナノシートなしで単純滴下されたナノランタン ASC スフェロイドの発光の経時的変化

B. ナノシート担持 or 非担持ナノランタン ASC スフェロイドの発光の経時的変化の比較

ナノシートで担持した場合は 10 日間以上発光が維持されたが、ナノシートなしの場合では 3 日で発光が消失した。

A



B

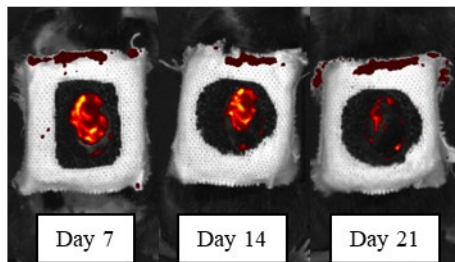


図 11 ナイルレッドナノシートによるナノシートの移植後の残存を評価

A. IVIS によって可視化されたナノシート

ナイルレッドナノシートは蛍光を保持しているため、容易に観察できる。

B 難治性潰瘍モデルへ移植したナイルレッドナノシートの経時的な変化

移植 14 日目まではナノシートは潰瘍部で比較的温存されたが、21 日目にはナノシートの約 90 %が消失していた。

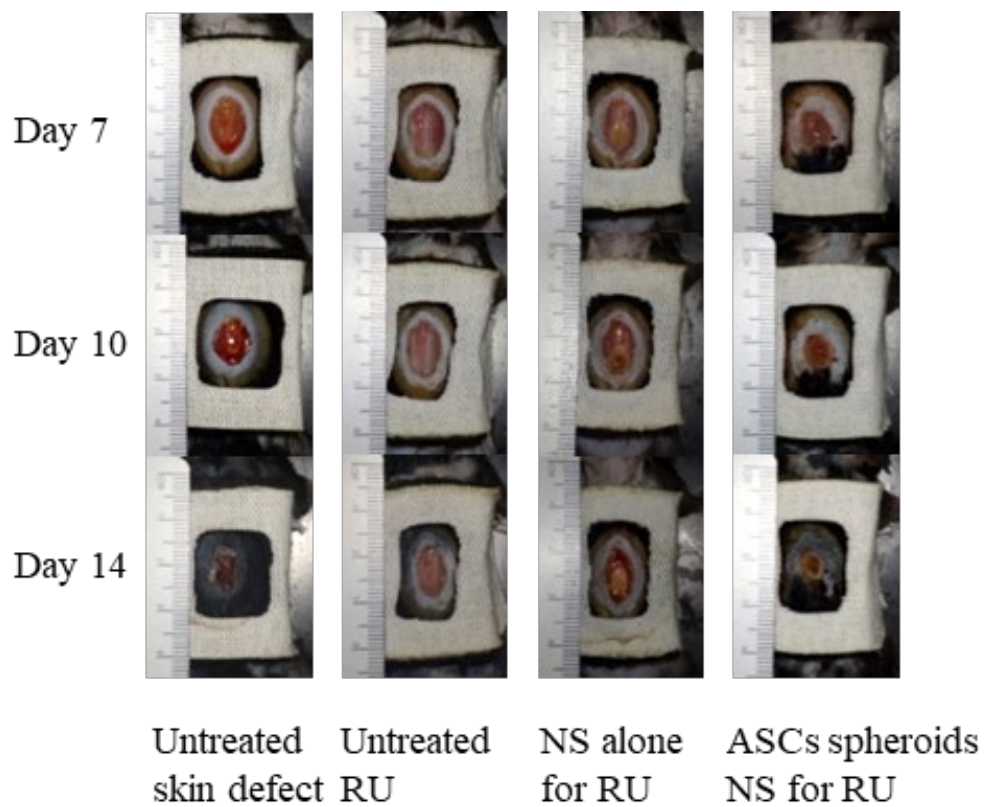


図 12 創面積の経時的な変化

4つの各実験群の創部の経時的変化（被写体との撮影距離は一定でスケールの長さを参考に創面積を ImageJ ソフトウェアで解析）

ASCs spheroids NS for RU 群の潰瘍サイズが最も小さかった。

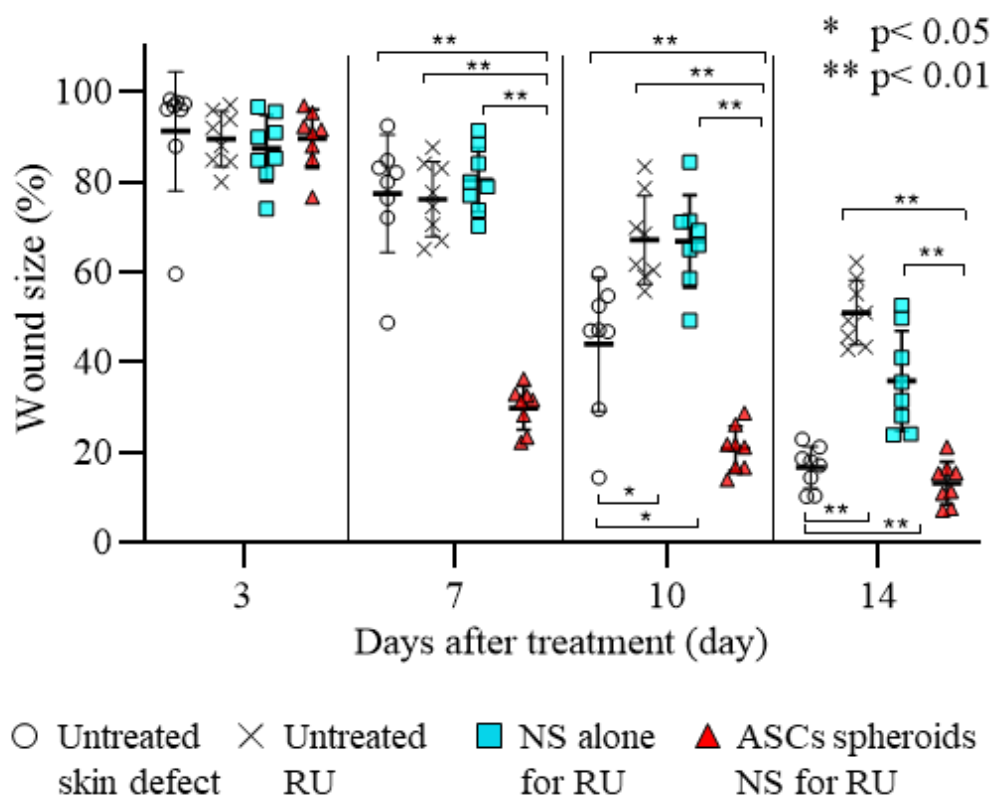


図 13 各実験群の創面積の経時的変化の比較（全群 N=8）

術後 3 日の時点で各実験群に潰瘍サイズの有意差はみられなかったが、それ以降の時点では、ASCs spheroids NS for RU 群の潰瘍サイズは他の群と比較して有意に小さかった。術後 14 日目の時点で ASCs spheroids NS for RU は Untreated RU よりも創面積の平均が約 1/4 の大きさとなった。
 (12.8±4.7% vs 49.1±7.89%、p<0.01)

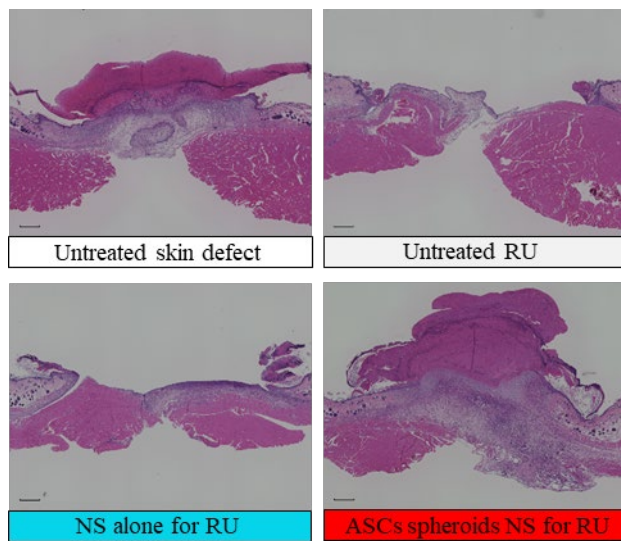


図 14 創傷治癒の組織学的評価

術後 14 日目の時点での創部の組織学的画像（HE 染色、scale bar= 500 μ m）

Untreated skin defect 群では正常な創傷治癒を反映して肉芽形成と再生上皮の伸長がみられる。Untreated RU 群と NS alone for RU 群では肉芽形成が抑制され、再生上皮の伸長がほとんど見られなかった。一方 ASCs spheroids NS for RU 群では Untreated skin defect 群と同様の肉芽形成と再生上皮の伸長が観察された。

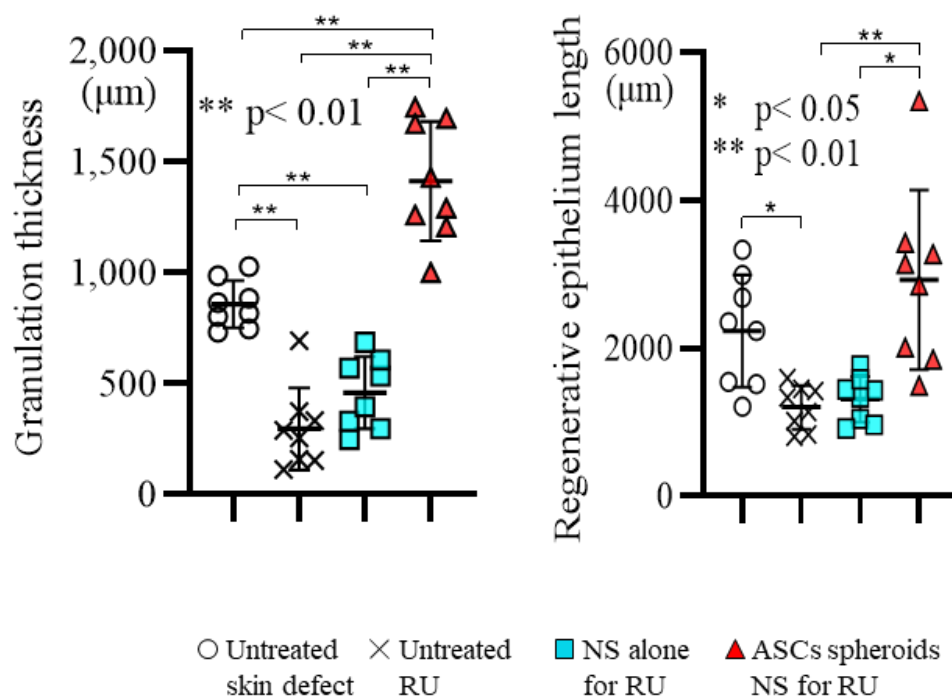


図 15 各実験群の肉芽形成（左図）と再生上皮長（右図）の比較（全群 N=8）
術後 14 日目の Untreated RU 群と比較した ASC spheroids NS for RU 群の肉芽形成の厚さは有意に厚かった（ 1.41 ± 0.27 vs 0.29 ± 0.18 mm、 $p < 0.01$ ）。同様に再生上皮長も Untreated RU 群と比較して ASC spheroids NS for RU 群の方が有意に増加していた（ 2.92 ± 1.21 mm vs 1.12 ± 0.30 mm、 $p < 0.01$ ）。

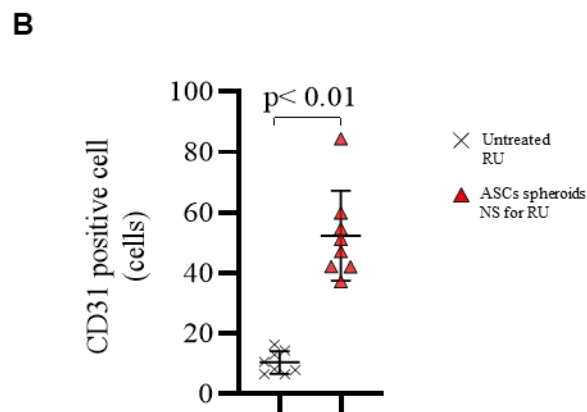
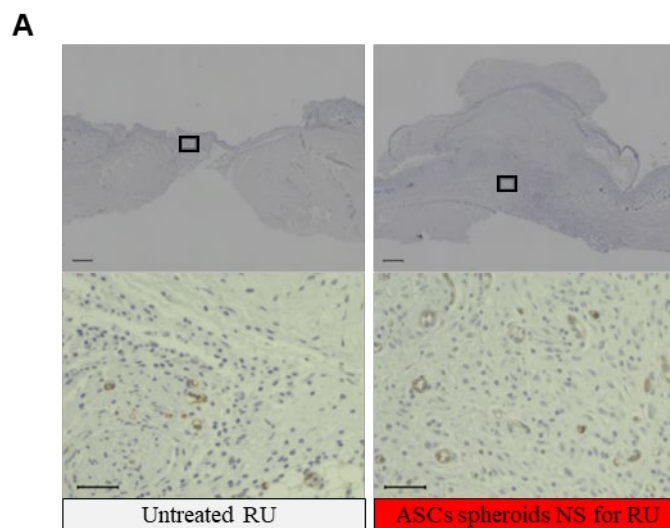


図 16 各実験群の免疫組織化学染色 (CD31) の代表的画像と CD31 陽性細胞数の比較 (両群 N=8)

A. 上段: scale bar= 500 μ m、下段: scale bar=50 μ m

B. ASCs spheroids NS for RU 群の CD31 陽性細胞数は Untreated RU 群と比較して有意に多かった (52.3 ± 14.9 vs 10.8 ± 3.7)。

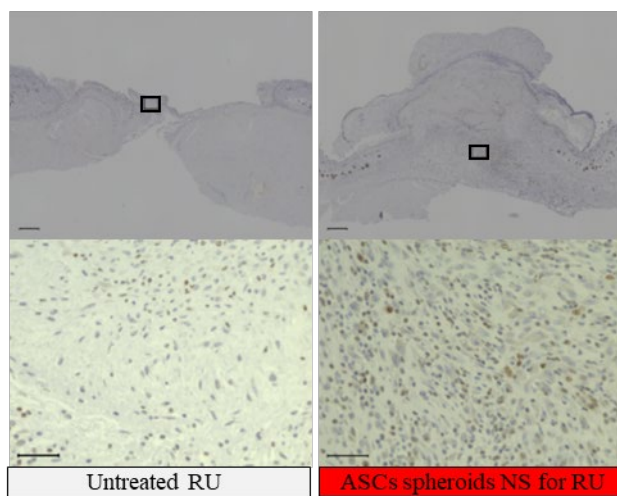
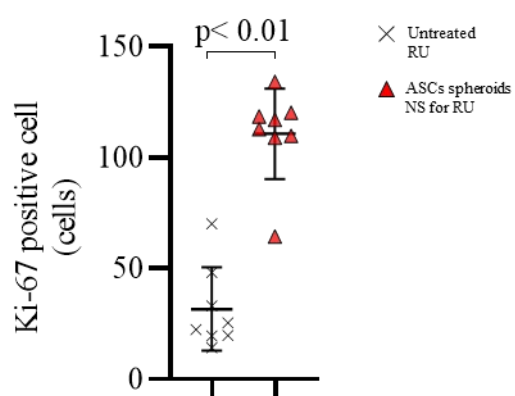
A**B**

図 17 各実験群の免疫組織化学染色 (Ki-67) の代表的画像と Ki-67 陽性細胞数の比較 (両群 N=8)

C. 上段: scale bar= 500 μ m、下段: scale bar=50 μ m

D. ASCs spheroids NS for RU 群の Ki-67 陽性細胞数は Untreated RU 群と比較して有意に多かった (110.8 ± 20.4 vs 31.6 ± 18.8)。

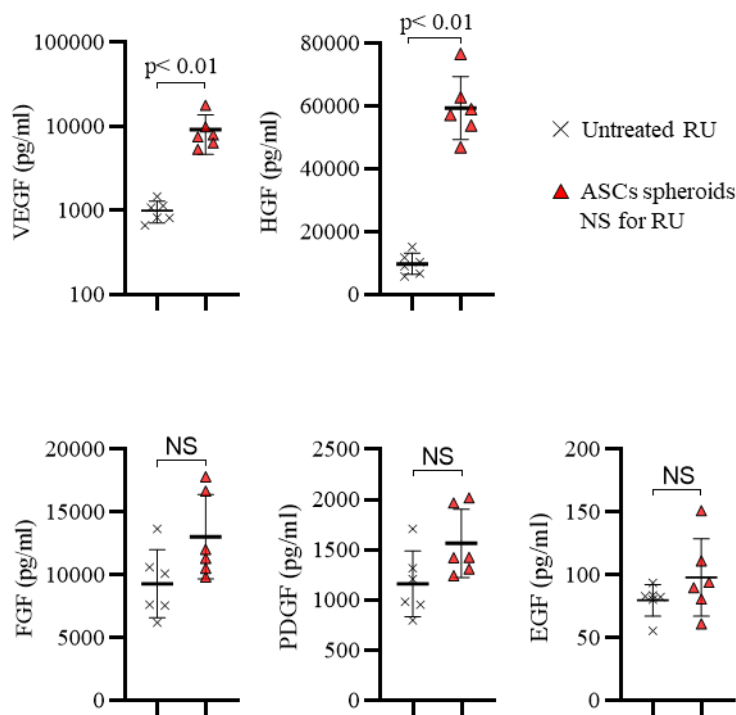


図 18 術後 7 日目の創傷中の成長因子解析（両群 N=6）

ASCs から分泌されうる代表的な 5 つの成長因子の濃度を測定した。それぞれの群で 6 匹のマウスからサンプルを回収し、ELISA 法で各濃度を測定した。

VEGF と HGF 濃度は ASCs spheroids NS for RU 群の方が Untreated RU 群よりもそれぞれ 9 倍と 6 倍高かった。FGF、PDGF、EGF は 2 群間で有意差がみられなかった。

実験群	サンプル数	処置		
		マイトマイシンC*1	スフェロイド*2	ナノシート*3
1. Untreated skin defect	8	—	—	—
2. Untreated RU	14	+	—	—
3. NS alone for RU	8	+	—	+
4. ASCs spheroids NS for RU	14	+	+	+

表 1. 動物実験の各群の内訳

1. Untreated skin defect

マイトマイシン C 処理しない単純皮膚欠損群。創収縮を阻害した野生型マウスの創傷治癒を反映している。

2. Untreated RU (Untreated refractory ulcer)

マイトマイシン C 処理することで作製した難治性潰瘍群。マイトマイシン C によって細胞増殖が停止し 2 週間以上治癒しない重篤な難治性潰瘍となる。

3. NS alone for RU (Nanosheet alone for refractory ulcer)

マイトマイシン C による難治性潰瘍作製後にナノシートのみで治療したグループ。

4. ASCs spheroids NS for RU (ASCs spheroids nanosheet for refractory ulcer)

マイトマイシン C による難治性潰瘍作製後に ASCs スフェロイドを担持したナノシートで治療したグループ。

*1: マウスの皮膚欠損部にマイトマイシン C を局所塗布

*2: 200 個のスフェロイドを皮膚欠損部に移植

*3: ナノシートを皮膚潰瘍部に貼付