

論 文 要 旨

学 位 論 文

表 題 慢性放射線皮膚障害に対する血管内皮血管内皮前駆細胞を用いた再生医療

申 請 者 氏 名 森 正徳

担当指導教員氏名 吉村 浩太郎 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学系
専攻分野 機能形態外科学
専攻科 形成外科学

使用文字数 3193 字

論文要旨

氏名 森 正徳

表題

慢性放射線皮膚障害に対する血管内皮血管内皮前駆細胞を用いた再生医療

1 研究目的

患者の QOL が重視される現代医療において放射線治療を受ける患者数は増加傾向であるが、副作用である放射線障害に悩む患者もまた増加している。慢性放射線障害の実態は、組織の萎縮、線維化、虚血であり、それらに伴う組織予備能の低下である。皮膚では最終的には慢性放射線皮膚潰瘍として顕在化する。

放射線潰瘍に対しては、現在のところ根本的な治療法は存在しておらず、軟膏処置などの保存療法が延々と続けられるか、採取部位の犠牲を伴う皮弁手術などにより切除再建が行われている。こうした中で近年、放射線潰瘍に対する自家脂肪組織移植による良好な臨床結果や、動物実験での脂肪組織由来幹細胞 (ASC) 移植による良好な結果が報告されてきている。また、ASC と血管内皮細胞 (EC) を併用投与することによりさらなる治療効果が得られたとの報告もある。しかしながら、EC はこれまで血管や骨髄からしか採取する方法が確立されておらず、これらの貴重な組織を再生医療の原料として用いることは難しかった。

そこで当研究室では脂肪組織から脂肪組織由来血管内皮前駆細胞 (AEPC) を純化培養する方法を確立した。これにより、今後は脂肪組織というひとつのドナーから ASC と AEPC の両方を同時に獲得することが可能となった。

私たちは、AEPC 投与が放射線潰瘍に対して治療効果を示すこと、および AEPC と ASC の併用投与により ASC 単独投与よりも高い治療効果を示すことを仮定した。本研究は、ヌードマウスモデルを用いてこれらの評価を行うことを目的とした。

2 研究方法

7 週齢オスのヌードマウスを使用し、コントロール群を含めて 7 つの実験群 (非照射群：放射線非照射、細胞投与なし、6 匹／ビークル群：40 Gy 照射、ビークル投与、7 匹／ASC 群：40 Gy 照射、ASC (1×10^5) 投与、4 匹／AEPC-1 群：40 Gy 照射、AEPC (2×10^5) 投与、4 匹／AEPC-2 群：40 Gy 照射、AEPC (5×10^5) 投与、5 匹／AEPC/ASC-1 群：40 Gy 照射、AEPC (2×10^5) + ASC (1×10^5) 投与、4 匹／AEPC/ASC-2 群：40 Gy 照射、AEPC (5×10^5) + ASC (1×10^5) 投与、5 匹) に分けて実験を行った。ASC と AEPC は、当科にて脂肪吸引の手術を行った女性から採取された吸引脂肪組織から純化培養したものを使用した。イソフルラン吸入麻酔下に背部皮膚に 1 回あたり 5 Gy を週に 2 回、合計 40 Gy を照射した。非照射群では、放射線照射を行わずに同条件にてイソ

フルラン吸入麻酔のみを行った。一連の放射線照射が終了して 12 週間後に、放射線照射部皮膚から 6 mm 径の生検パンチを用いて皮膚を採取し、径 6 mm の皮膚欠損創を作成した。非照射群以外のマウスでは、創縁皮下に 4 方向に分けて計 100 μL の試料（細胞を 0.2%ヒアルロン酸含有 DMEM:F-12 培地に懸濁。ビークル群では培地のみ）を 30 G 針にて注射した。1 週間に 2 回創部の写真を撮影し、写真の画像解析を行って創傷面積を算出した。創部が上皮化するまでに要した日数も記録した。創傷面積と上皮化日数は、ビークル群・AEPC-1 群・AEPC-2 群間および ASC 群・AEPC/ASC-1 群・AEPC/ASC-2 群間でそれぞれ比較を行った（Tukey 多重比較検定）。創傷作成後 28 日目にすべてのマウスを安楽死させ、8 mm 径の生検パンチを用いて創部皮膚を採取した。

創傷作成時の皮膚サンプルを用いて、放射線非照射皮膚と放射線照射皮膚の表皮層、真皮層、皮下脂肪層それぞれの厚みの比較を行った（t-test）。創傷作成後 28 日目の皮膚サンプルに対して、ヒトゴルジと von Willebrand 因子に対する DAB 染色を行った。創部組織の血管密度を、ビークル群をコントロールとして Dunnett 多重比較検定を行った。

3 研究結果

AEPC-1 群（11 日目： $6.0 \pm 3.6\%$ 、14 日目： $1.5 \pm 3.3\%$ ）と AEPC-2 群（11 日目： $9.6 \pm 2.2\%$ 、14 日目： $0.5 \pm 0.4\%$ ）は、創傷作成後 11 日目と 14 日目の時点でビークル群（11 日目： $14.8 \pm 1.5\%$ 、14 日目： $6.9 \pm 2.4\%$ ）と比較して有意に創傷面積が小さかった（全て $p < 0.01$ ）。AEPC/ASC-2 群は、創傷作成後 7 日目の時点で ASC 群と比較して有意に創傷面積が小さかった（ 25.8 ± 9.8 vs $41.2 \pm 6.2\%$, $p = 0.04$ ）。創傷作成後 18 日目にはビークル群以外の群のマウスはすべて上皮化が完了しており、25 日目にビークル群のマウスもすべて上皮化が完了した。AEPC-1 群（ 15 ± 2 日）と AEPC-2 群（ 17 ± 2 日）はビークル群（ 23 ± 3 日）と比較して上皮化日数が有意に短かった（すべて $p < 0.01$ ）。また、AEPC/ASC-1 群（ 14 ± 0 日）と AEPC/ASC-2 群（ 14 ± 0 日）も ASC 群（ 17 ± 2 日）と比較して有意に短かった（すべて $p < 0.01$ ）。AEPC-1 群と AEPC-2 群の間（ $p = 0.34$ ）および AEPC/ASC-1 群と AEPC/ASC-2 群の間（ $p = 1$ ）には有意差はみられなかった。

放射線照射皮膚の皮下脂肪層の厚み（ $128 \pm 60 \mu\text{m}$ ）は、放射線非照射皮膚の皮下脂肪層の厚み（ $350 \pm 80 \mu\text{m}$ ）と比較して有意に薄くなっていた（ $p < 0.01$ ）。表皮層の厚み（非照射： $26.7 \pm 7.9 \mu\text{m}$ 、照射： $29.8 \pm 6.4 \mu\text{m}$ ）と真皮層の厚み（非照射： $214 \pm 49 \mu\text{m}$ 、照射： $184 \pm 36 \mu\text{m}$ ）には有意差は見られなかった（表皮層： $p = 0.21$ 、真皮層： $p = 0.17$ ）。ヒトゴルジに対する DAB 染色では、いずれのサンプルでも陽性細胞はみられなかった。Von Willebrand 因子に対する DAB 染色では、非照射群（ $0.99 \pm 0.18 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2$ ）のみがビークル群（ $0.47 \pm 0.09 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2$ ）と比較して有意に血管密度が高かった（ $p = 0.02$ ）。

4 考察

本実験では、ヌードマウス背部の放射線照射皮膚（合計 40 Gy）における直径 6 mm の創傷治癒において、AEPC 単独投与（ 2×10^5 もしくは 5×10^5 ）はビークル投与と比較して有意に創傷治癒を早めた。また、AEPC（ 2×10^5 もしくは 5×10^5 ）と ASC（ 1×10^5 ）の併用投与は ASC 単独投与（ 1×10^5 ）と比較して有意に創傷治癒を早めた。いずれも、AEPC の投与量の違い（ 2×10^5 もしくは 5×10^5 ）による有意差はみられなかった。本モデルにおいて、AEPC の投与量は 2×10^5 で十分以上であり、これ以上 AEPC の細胞数を増加させても治療効果は向上しないものと推測する。

本実験にて細胞投与後 28 日目の時点で創部に投与細胞の生着を確認することができなかったことは、本実験が異種移植実験であることが原因のひとつであると考ええる。また、本実験では移植床が放射線照射部であったことも、生着を確認することができなかった理由であると考ええる。

本実験において投与細胞の生着が確認できなかったにもかかわらず創傷治癒促進がみられたのは、投与細胞が分泌した液性因子による効果であると推察した。本実験において創傷組織の血管密度は、ビークル群と比較して非照射群のみが有意に高く、細胞投与群ではいずれも有意差はみられなかった。この結果については、いずれのサンプルも上皮化完了後の組織標本であり、創傷組織の血管密度と創傷治癒における血管新生スピードは必ずしも関連しないと考ええる。細胞投与群では、投与細胞により分泌された液性因子が消費されながら創傷治癒促進がもたらされたものの、投与細胞自体は生着できなかったために創傷組織の質の改善はそれほど得られなかったと推察する。一方、非照射群で創傷組織の血管密度が高かったことは、組織における幹細胞の機能差が創傷組織の質にも影響を与えることを示唆する。

本実験の結果をふまえると、AEPC や ASC の放出する液性因子のみでも創傷治癒促進を期待できることから、細胞投与だけではなく液性因子投与という治療方法も有効であると考ええる。実臨床において、液性因子治療は細胞治療と比較して、規制や製造上の問題やコストの面も含めて数多くの利点を有する。

本研究の次のステップはブタなどのより大きな実験動物を用いた自家移植実験であると考ええる。最終的な目標が臨床応用であることを考慮すると、採取脂肪から AEPC および ASC を純化培養するプロセスに用いるすべての薬品は、動物由来製剤を用いない GMP グレードに準拠したものを使用する必要がある。また、細胞治療と液性因子治療をそれぞれ最適化した上での比較検討も必要であると考ええる。

5 結論

本研究の結果から、放射線潰瘍に対して AEPC 投与、特に ASC との併用投与により創傷治癒が促進されることが分かった。本実験における創傷治癒促進は、投与細胞の生着によってではなく投与細胞が分泌する液性因子によってもたらされたものであることが示唆され、液性因子投与によっても同様の治療効果が得られる可能性もあると考えられた。