

形成外科領域におけるヒト間葉系幹細胞移植を用いた瘢痕形成抑制の実現ならびに問題点の抽出と改善

独立行政法人国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部

梅澤 明弘

We have recently reported that implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells significantly inhibits dermal scar formation in rats and pigs. Human mesenchymal stem cells can be isolated by aspiration of bone marrow without difficulties. Dermatoscopic analysis revealed that this novel approach ensures safety and efficacy: There was a significant decrease in the percentage of scar formation. Thus, mature scar was reduced in a quantity and distribution of scar was altered during the repair process. These results suggest that implantation of marrow-derived mesenchymal stem cells decreases visible scar formation. It is also noteworthy that usage of somatic stem cells does not have ethical problem unlike human embryonic stem cells. After approval of Institutional Review Board, we aim to perform a clinical trial of cell-based therapy using mesenchymal stem cells.

1. 緒言

これまで、骨髄由来の間葉系幹細胞は骨、筋、神経、軟骨、脂肪細胞などに分化し、生体に移植するとその環境に合わせて分化することが報告されてきた。ヒトに近い皮膚構造を有するブタの皮膚縫合創に骨髄由来間葉系幹細胞を自家移植することでも同様の効果が確認されており、ヒトでも同様の効果が得られる可能性が高いと考えられる。現段階では骨髄由来間葉系幹細胞移植により移植細胞がどのような細胞に分化したのか、周囲の組織にどのような影響を与えて皮膚構造が再生したのかが不明であり、本研究では2年間で実験動物を用いてそのメカニズムを明らかにし、ヒトへの臨床応用を試みヒト間葉系幹細胞移植の評価を行う。

本研究は、ヒト間葉系幹細胞を生体外で培養・増殖させ、それを投与する「細胞治療」と、縫合創の「瘢痕化抑制」を目指す。これまでラット、ブタにおいて効果が認められており、そのメカニズムを解明しヒトに応用することで先天性疾患の治療や美容形成手術に大きく貢献する。

形成外科領域においてScarless wound healingは長年の研究課題とされており、実際の臨床現場でも手術手技や創傷被覆剤、成長因子の投与などの工夫により、瘢痕の軽減が試みられてきた。しかし、瘢痕の質を改善することはできても、消失させるまでには至っていない^{1,2)}。

一方、骨髄由来の間葉系幹細胞(MSC: Mesenchymal stem cell)は再生医療の細胞源として有用性が高いと考えられている³⁾。特に自家移植が可能であるため、感染症や

免疫拒絶の心配がなく、実際に臨床応用に使用されている細胞である^{4,5)}。MSCは、間葉系への多分化能を有するだけでなく、生体移植によって周囲の環境に合わせて分化・再生することも報告されており^{6,7)}、皮膚創傷の再生にも関与する可能性を示唆している。著者らはこのMSCの能力に注目し、MSCが皮膚創傷治療に与える影響を研究してきた。その結果、ラットとブタにおいて、MSC投与により皮膚の急性創傷瘢痕形成が抑制され、正常に近い皮膚構造が再生された^{8,9,10)}。これまでの基礎的知見を中心に紹介する。

2. 実験

2.1 ヒト間葉系幹細胞移植後組織の経時的变化(創治癒過程)の観察

実験動物(ラット)の骨髄液からMSCを単離する。また、骨髄液を採取したラットを創傷モデル動物とし、得られた細胞の自家移植を行う。皮膚切開創作成後早期から、経時的に細胞移植を行った組織を採取し、免疫組織化学を用いて比較検討を行う。

2.2 細胞マーカーの検討および細胞の規格設定

細胞移植に用いる細胞の規格設定を行う。得られた細胞に対する網羅的遺伝子発現解析と免疫不全動物への移植を並行して行うことで、in vivoとin vitroの相関を判定する。

3. 結果

3.1 MSCがラットの急性皮膚創傷に与える影響

ラットの大腿骨より骨髄血を採取し、培養皿に接着する細胞をMSCとして使用した。ラットの背部4ヶ所の真皮内にMSCを局注し、直後に1cmの皮膚全層切開を加えた。皮膚全層切開創へのMSC移植後7日目の肉眼的観察結果では、コントロールにおいてわずかに創を認識できるが、MSC移植創では創は認識しにくくなっていた。14日目のコントロールの組織像では創の範囲に一致して膠原線維の



Inhibition of dermal scar formation by cell-based therapy using human mesenchymal stem cells

Akihiro Umezawa

Department of Reproductive Biology,
National Research Institute for Child
Health and Development

乱れと皮膚付属器の欠損を認めた。MSC移植創では創の範囲の判別が困難であり、正常組織に近い状態で治癒していることが確認された。これらの瘢痕を評価するために、Singerらによる組織像のスコアリング¹¹⁾を応用した。その結果、MSC移植創が有意に高得点となり、正常組織に近い状態であるという結果が得られた。

GFPラットの培養細胞を用いた研究では、創に移植したGFPラットのMSCは創の肉芽底面と周囲の真皮直下に分布していることが確認され、創傷治癒に影響を与えていると考えられている。そして、MSCは創に移植されると大部分がビメンチン陽性となり、線維芽細胞様の細胞に分化していた。また、筋線維芽細胞に分化していないことから、瘢痕拘縮抑制に有利に働いていると考えられた。さらに、MSCの培養段階では陰性だったCD31が、MSC移植後に陽性化していることが確認され、創周囲の血管形成に何らかの影響を与えている可能性が示唆されている。

Western blottingを行ったところ、ラットのMSCはHGF (Hepatocyte growth factor) を強く発現していることが確認された。HGFには、TGF β 1 (Transforming growth factor) を抑制する作用があり、TGF β 1は創の線維化・瘢痕化を引き起こす代表的な成長因子として知られている。そのため、MSCに含まれるHGFがTGF β 1の作用を抑制することで瘢痕化が抑制されたことが予測される。また、炎症反応が線維化を促進することも知られているが、MSC移植創では有意に炎症細胞の数が減少していた。つまり、MSCを移植することで、創傷治癒の炎症期の炎症細胞浸潤が抑制され、瘢痕形成抑制に寄与している可能性が考えられた。

3.2 MSCがブタ皮膚創傷治癒に与える影響

次に著者らは、よりヒトと皮膚構造が似ているとされるブタ皮膚における研究も行った。ラットと同様にブタ皮膚全層切開創へMSCの自家移植を行ったところ、移植後28日目の時点でコントロールに比して肉眼的に瘢痕は目立たず、組織学的にも有意に正常皮膚に近い状態に創が治癒していることが確認された。また、MSC移植創では筋線維芽細胞の出現が抑制され、弾性線維が出現していることが観察された。

3.3 ヒト間葉系幹細胞移植後組織の経時的変化(創治癒過程)の観察

国立成育医療センターで得られる様々な組織から単離されるヒト間葉系細胞を用いて実験動物への移植を行い、創傷治癒効果を判定した。皮膚全層切開層へのMSC移植後7日目の肉眼的観察結果では、コントロールにおいてわずかに創を認識できるが、MSC移植層では創は認識しにくくなっていた。14日目のコントロールの組織像では創の

範囲に一致して膠原繊維野乱れと皮膚付着器の欠損を認めた。これらの瘢痕を評価するために、Singerらによる組織像のスコアリングを応用した。その結果、MSC移植層が優位に高得点になり、正常組織に近い状態であるという結果が得られた。

3.4 細胞マーカーの検討および細胞の規格設定

MSCは創に移植されると大部分がビメンチン陽性となり、繊維芽細胞様の細胞に分化していた。また、筋繊維芽細胞に分化していないことから、瘢痕拘縮抑制に有利に働いていると考えられた。さらにMSCの培養段階では陰性だったCD31が、MSC移植後に陽性化していることが確認され、創周囲の血管形成に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

4. 考 察

これまでに皮膚創傷に対するMSCの作用に関する報告はあるが、創傷の治癒期間を早める目的の研究が多く、瘢痕を目立たなく治癒させるための研究は胎仔を利用したものに散見されるのみである。本方法は瘢痕を消失させることを究極の目的としており、そのために一次治癒の創を対象とし、真皮縫合を行うなどの瘢痕を抑制するための良好な条件を整えることに留意した。通常行われている瘢痕形成術や腫瘍切除術にMSC移植を加えることで、皮膚創傷の瘢痕化を抑制できる結果となった。形成外科領域においてScarless wound healingは長年の研究課題であり、これまでは主に手術手技や創傷被覆剤の工夫、成長因子の投与などが試みられてきた。ラット、ブタにおいて効果が認められており、そのメカニズムを解明しヒトに応用することで、今後、口唇裂や合多指症などの先天性疾患の術後の瘢痕抑制や、乳房再建等の美容手術などでも同様に瘢痕を目立たなくする治療に貢献でき、それらを求める患者は相当数存在と考えられることから、今後臨床に広い範囲で貢献する時期も近いことが期待される。

本方法は、通常の腫瘍切除術とほぼ同様に、患者に身体的負担を最小限とするよう配慮して計画されている。骨髓採取が必要であること、培養細胞が必要量に達するまでの期間を予測して待機するということが負担として考えられるが、実際には骨髓採取に困難はなく、手術日の設定も通常の手術申し込みの場合と大きく変わることはなかった。骨髓採取とMSC移植は当院で、細胞培養は成育医療センターで行う、と2施設間での細胞の搬送が必要であるが、連携はスムーズで、培養や手術に支障を生じることはなかった。

移植による瘢痕抑制の評価であるが、中央の腫瘍再発部を除くと、肉眼的所見に加えてマイクロスコープ(スカラ、30倍)上でも瘢痕は相当目立たなくなっている。それは、

同一患者のMSC移植を行わなかった他の瘢痕と比べても同様の結果を認めた。

これまでに、皮膚創傷に対するMSCの作用に関する報告はあるが¹²⁾、創傷の治癒期間を早める目的の研究が多く、瘢痕を目立たなく治癒させるための研究は胎仔を利用したものに散見されるのみである¹³⁾。本方法は、瘢痕を消失させることを究極の目的としており、そのために1次治癒の創を対象とし、真皮縫合を行うなど瘢痕を抑制するための良好な条件を整えることに留意した。私たちが通常行っている瘢痕形成術や腫瘍切除術にMSC移植を加えることで、皮膚創傷の瘢痕化を抑制することが可能であれば、今後、先天性疾患の治療や形成外科的美容学的手術に大きく貢献することが期待される。

引用文献

- 1) Spyrou GE, Naylor IL.: The effect of basic fibroblast growth factor on scarring. *Br. J. Plast. Surg.*, 55, 275-282, 2002.
- 2) Akita S, Akino K, Imaizumi T, et al.: The quality of pediatric burn scars is improved by early administration of basic fibroblast growth factor. *J. Burn Care Res.*, 27, 333-338, 2006.
- 3) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147, 1999.
- 4) 永谷憲蔵, 北村惣一郎: 臨床応用－再生医療の実際－心血管 心不全, *日本臨牀*, 66, 978-983, 2008.
- 5) Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, et al.: Tissue engineered ceramic artificial joint-ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, 26, 4654-4661, 2005.
- 6) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41-49, 2002.
- 7) Kamiya K, Fujinami Y, Hoya N, et al.: Mesenchymal stem cell transplantation accelerates hearing recovery through the repair of injured cochlear fibrocytes. *Am. J. Pathol.*, 171, 214-226, 2007.
- 8) Satoh H, Kishi K, Tanaka T, et al.: Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. *Cell Transplant.*, 13, 405-412, 2004.
- 9) 中島龍夫, 佐藤博子, 貴志和生, ほか: 臨床応用への道 形成外科領域での再生医療の最近の動向. *ティッシュエンジニアリング*, Jun:163-168, 2007.
- 10) 落合博子, 貴志和生, 中島龍夫, ほか: 創傷治癒. *病理と臨床*, 27, 364-366, 2009.
- 11) Singer AJ, Thode HC Jr, McClain SA.: Development of a histomorphologic scale to quantify cutaneous scars after burns. *Acad. Emerg. Med.*, 7, 1083-1088, 2000.
- 12) Yoshikawa T, Mitsuno H, Nonaka I, et al.: Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. *Plast. Reconstr. Surg.*, 121, 860-877, 2008.
- 13) Kishi K, Ohyama K, Satoh H, et al.: Mutual dependence of murine fetal cutaneous regeneration and peripheral nerve regeneration. *Wound Repair Regen.*, 14, 91-99, 2006.