

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
分担研究報告

印加による母斑組織内の細胞の不活化確認

研究分担者 国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部部長 馬原淳

研究分担者 関西医科大学 形成外科助教 覚道奈津子

研究要旨

巨大色素母斑は巨大な母斑が存在し治療に難渋する疾患である。母斑が体表面積の数十%以上を占める症例では、移植する皮膚を採取できず治療が断念されることも多い。本研究では、母斑組織を廃棄せず、手術室内で切除した母斑組織内の細胞を完全に不活化し、得られた不活化組織そのものを用いて皮膚再生を行う新規治療法を開発する。

本研究では、加圧処理（0,100,200,500,1000MPa）によってヒト母斑組織の不活化が可能であるか、手術で切除されたヒト母斑組織を用いて検討を行った。不活化の確認は、細胞ミトコンドリア活性アッセイ（WST-8アッセイ）、組織よりの細胞増殖の有無（explant培養）で行った。また、印加した母斑組織をヌードマウス皮下に埋入し、半年後に組織を摘出、母斑細胞の残存、増殖がないことを免疫染色で確認した。これらの結果、200MPa、10分間の加圧処理によって、母斑組織内の細胞が不活化され、ヌードマウスに移植しても不活化された細胞が増殖しないことが確認できた。

A . 研究目的

本プロジェクトでは、母斑組織を廃棄せず、手術室内で切除した母斑組織内の細胞を完全に不活化し、得られた不活化組織そのものを用いて皮膚再生を行う新規治療法を開発することを目的としている。

本研究ではまずヒト母斑組織が、培養細胞を不活化する印加条件、すなわち200MPa、10分間の高圧処理で不活化できることを確認することを目的とした。

B . 研究方法

1. 印加による母斑組織内の細胞の不活化確認

京都大学医学部附属病院形成外科手術で切除されたヒト母斑組織（4症例よりの検体）を用いて検討を行った。

生検トレパンを用いて直径8ミリの円形の全層母斑組織を準備した。0,100,200,500,1000MPa、10分間印加した。不活化の確認

は、細胞のミトコンドリア活性（WST-8アッセイ）、組織よりの細胞増殖の有無（explant培養）で行った。また、1辺15mmの正方形の母斑組織を準備、0,100,200,500,1000MPaで印加した後にヌードマウス背部皮下に埋入、半年後に組織を摘出、母斑細胞の残存、増殖がないことを抗ヒトビメンチン抗体免疫染色で確認する。

（倫理面への配慮）

ヒト検体の採取および動物への移植実験、細胞培養実験については、関西医科大学、京都大学の倫理委員会でのヒト検体採取についての承認、関西医科大学、京都大学、国立循環器病研究センター、大阪工業大学でヒト検体を用いた研究計画（動物実験計画を含む）の承認を各施設で得て研究を実施した。

C . 研究結果

手術で切除されたヒト母斑組織（4検体）を用いて検討を行った。0,100,200,500,1000 MPaで10分間印加し、印加後の母斑組織のWST8アッセイ、組織よりの細胞増殖の有無（explant培養）を確認した。この結果、培養細胞の結果と同様に200MPa以上で細胞の生死を示す母斑組織のWST-8活性がなくなる、すなわち不活化していることを核にした（図1）。また、200MPa以上で印加した組織からは線維芽細胞が遊走せず、母斑組織内の細胞が深部まで不活化されていることを確認した。

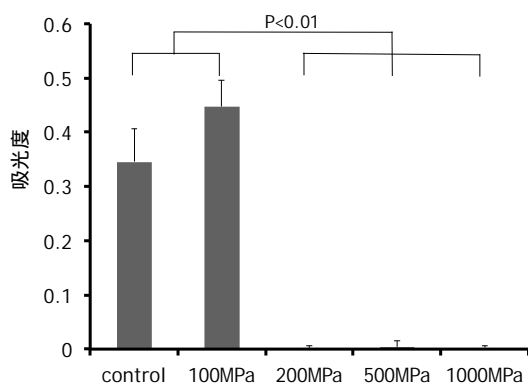


図1. 印加圧力と組織活性（吸光度）

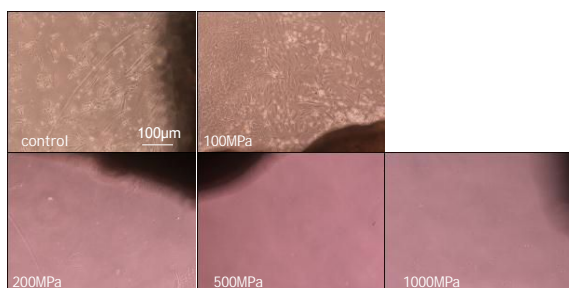


図2. 各印加後組織での遊走細胞を示す。
200MPa以上では細胞は観察されなかった。

次に印加した母斑組織をヌードマウスに埋入し、6ヶ月後に組織を摘出した。ヒト細胞の残存を確認するため、抗ヒトビメンチン抗体を用いて免疫染色を行った。この染色で200MPa以上の印加でヒト細胞の残存がないこと、すなわち印加直後に不活化された母斑組織から細胞が再度増殖はしないことを確認した（図3）。

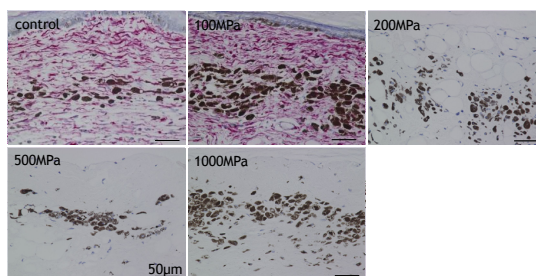


図3. 埋入6ヶ月後の組織
（抗ヒトビメンチン免疫染色）

D. 考察

印加処理と細胞死滅に関して、ヒト臍帯静脈内皮細胞、3T3細胞、ヒト大動脈平滑筋細胞を印加すると、200MPa以上でのWST8活性（ミトコンドリア活性）が無くなり死滅すること、生細胞と死細胞を染め分けるlive and dead染色でも200MPa以上で細胞の死滅することを報告している（Mahara A, Morimoto N, Sakuma T, Fujisato T, Yamaoka T., Complete cell killing by applying high hydrostatic pressure for acellular vascular graft preparation. Biomed Res Int. 2014）。本研究で、培養細胞と同様に母斑組織内の細胞も200MPa以上で死滅することが確認され、高圧処理が組織の深部まで不活化可能な有効な組織の不活化方法であることが示された。今後、印加により不活化された母斑組織に培養表皮を生着させ皮膚全層を再生させることができるかの検討を行う。また、悪性腫瘍細胞をヌードマウスに移植し皮膚癌モデルを作成し、この組織を採取、印加することで細胞が不活化されることも検討する予定である。

E. 結論

200MPa以上、10分間の印加で、母斑組織内の細胞が死滅することが確認された。高圧処理が組織の深部まで、短時間で不活化可能な有効な組織の不活化方法であることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. 総括研究報告書に記載

- 2. 学会発表
 - 1. 総括研究報告書に記載

- 1. 総括研究報告書に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許申請