

主論文の要約

Ex-vivo Prefabricated Skin Flap Using Cell Sheets and an Arteriovenous Vascular Bundle as a Vascular Carrier in Rats

(細胞シートと動静脈付き血管床を用いた生体外における皮弁作製の試み)

東京女子医科大学大学院
先端生命医科学系専攻再生医工学分野
(指導：大和雅之教授、清水達也教授)
藤澤大輔

Plastic and Reconstructive Surgery Global Openにて査読中

【目的】皮膚の再生医療の分野において培養表皮・真皮の臨床応用は進んでいるが、厚みを持ち、移植直後から血流再開する“再生皮弁”の作製は未だ研究途上である。そこでラットを用いて、移植可能な皮弁を生体外で作製することを目的とした。

【対象および方法】 ①表皮細胞シートの極性および灌流培養中の動態を調べるために、細胞シート裏表移植モデルとして6匹のSDラットの腹部皮下脂肪弁を浅後腹壁血管と共に採取し、バイオリアクター内で灌流した。同時にGFP(+)新生仔SDラット背部皮膚由来の培養表皮細胞シートを、1枚は通常通りに、もう1枚は裏返しに移植した。灌流開始3日後に各々10か所ずつ蛍光観察し、GFP(+)細胞の生存領域を画像解析ソフトを用いて測定した。その後、組織染色を行った。②再生皮弁を作製する実験としてSDラットの大腿血管と浅筋膜を挙上し、I型コラーゲンスポンジ(Pelnac®)と共に樹脂製チャンバーに収めた。3週間後に組織(血管床)を取り出し、バイオリアクター内で体外灌流を開始した。同時に血管床上にGFP(+)新生仔SDラット背部皮膚由来の培養表皮細胞シートを移植した。灌流開始3-10日後に組織切片を作製し観察した(n=15)。

【結果】 ①表皮細胞シートを裏表逆に移植したものでは、通常通り移植したもの(68.9±9.1%)と比較し、有意(p<0.05)にGFP(+)領域が少なかった(41.9

±6.8%)。逆向き移植群では、HE 染色にて表皮細胞シートの生着不良を確認した。通常通り移植したものでは、細胞シートの基底側にラミニン 332 を確認できた。逆向き移植群では、細胞シートの両面に断片的ながらもラミニン 332 を確認した。②体外灌流の期間が長くなるにつれて、表皮細胞シートの角化が進行した。10 日間経過したものでは顕著であった。剥離した落屑物は角質層に特異的な抗フィラグリン染色陽性であった。基底細胞層は抗 Ki67 染色陽性であった。細胞シートの基底側にはラミニン 332、コラーゲンⅣといった表皮特異的な基底膜蛋白が確認できた。透過型電子顕微鏡にて基底膜、デスモゾーム、ヘミデスモゾーム、ケラトヒアリン顆粒等の構造物が、生体皮膚と同様に認められた。

【考 察】 実験①にて、表皮細胞シートの灌流培養が可能であることが分かったが、その際には細胞シートの基底側に産生される細胞外マトリクスが、移植床への生着のために重要であると考えられた。逆向きに移植した表皮細胞シートの、両面にラミニン 332 が発現していたのは、3 日間の灌流中に細胞極性が変化した可能性が考えられた。②動静脈にコラーゲンスポンジを組み合わせた血管床は、安定した体外灌流が可能であり、再生皮膚において表皮の分化能、基底膜蛋白の発現に寄与したと考えられた。

【結 論】 生体外における、移植用あるいは薬剤試験用の再生皮膚の作製に向けた、基盤的技術を確立した。