

主論文要旨

論文提出者氏名：武内 嵩幸

専攻分野：形成外科学

指導教授：梶川 明義

主論文の題目：

培養表皮の色素調節技術の開発 整容的応用のための基礎的検討

共著者：

梶川 明義、住江 玲奈、鍋島 諒大、宮野竜太郎、市田美緒、館下 亨、井上 肇

緒言

白斑の治療に培養表皮を用いる際、従来の方法では培養時に混入していた色素細胞が維持されることで、培養表皮細胞の色調が保たれていたと考えられる。表皮細胞の培養環境は、必ずしも色素細胞の増殖に適する培養環境ではないため、表皮細胞の増殖と色素細胞の増殖が同調せず、継代操作を重ねるにつれて、色素細胞数の減少と培養表皮細胞の色調の低下が起きると推察される。

そのため白斑の治療の際には、白斑部位周囲の比較的類似した色調の皮膚を採取する必要がある。すなわち採皮部位が限られ、移植予定面積を考慮したある程度広い面積の採皮が必要になることがある。

これらの問題点を解決するため、培養表皮の色調を調節する技術の開発

について、基礎的研究を行った。

方法・対象

聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会(臨床試験部会)における承認(承認番号第 1548 号)の下、書面同意を得た患者から採取した正常皮膚を酵素処理し、得られた細胞浮遊液から培養表皮の作成と、色素細胞の単離培養法の検討を行った。色素細胞の単離は、細胞浮遊液を市販の色素細胞培養用特異培地を用いて培養し、試薬を用いて表皮細胞と線維芽細胞を除去する方法、F12 改変培地で選択的に色素細胞を培養する方法とで検討した。

ヒト正常色素細胞に色素合成促進薬として Endothelin-1(ET-1)、ProstaglandinF2 α (PGF2 α) を添加し、DOPA 染色による細胞の着色の変化および Tyrosinase (TYR) 活性、色素細胞特有の遺伝子発現を Real-time PCR で測定し、有意差検定に t 検定を用いた。

結果

位相差顕微鏡を用いて初代培養表皮細胞中に色素細胞が存在することが確認された。色素細胞培養用特異培地を用い、色素細胞の選択的な培養を試みたが、長期の培養はできなかった。Dispase を用いて表皮細胞の選択的除去を行い、F-12 改変培地を用いて培養することで色素細胞の単独培養が可能であった。

さらに培養表皮の継代時に単離した色素細胞を加えて培養し、共存させて培養することができた。また、その際に色素細胞数の増加を認めた。ヒト正常色素細胞に色素合成促進剤を添加すると、細胞レベルで着色が亢進した。この時、TYR 遺伝子発現を ET-1 は増加させ(P=0.0069)、PGF2 α は抑制させた(P=0.0353)。Tyrosinase 関連蛋白質-1(TRP-1) 遺伝子に関しては、両者とも発現に影響を与えなかった。ET-1、PGF2 α を添加した培養表皮シートでは TYR 活性の増強は認めた(P<0.0001)が色素細胞

数には有意な差を認めなかった。

考察

培養表皮の色素を調節する方法では、色素合成促進薬として ET-1、PGF2 α を培養時に添加し TYR 活性に及ぼす影響を検討した。色素細胞自体の増殖に及ぼす影響はほとんど認めなかったが、DOPA 染色陽性細胞数は増加した。ET-1 は色素細胞の増殖を促進するとされるが、今回用いた培養環境では、明確な差を認めることはできず、今後検討の必要性が考えられた。

色素合成促進薬で、色調の調節を行うには限界があると考えられた。そこで、表皮細胞の培養と色素細胞の培養とを独立して行い、移植前に共培養を行う方法を検討した。

細胞浮遊液を市販の色素細胞用特異培地を用いて培養し、色素細胞の特異的培養を試みた。すると表皮細胞の増殖が顕著になるとともに、線維芽細胞の増殖も見られ、色素細胞の増殖が阻害され、培養が困難と考えられた。そこで、線維芽細胞に特異的に作用し、線維芽細胞を殺菌的に除去することが可能とされる抗生物質である Geneticin を用いて線維芽細胞の除去を試みた。すると、線維芽細胞の除去は可能であったが、色素細胞への細胞毒性が出現し、その後の継代操作が困難と考えられた。表皮細胞の混在は最終的な移植には問題にならないが、培養過程で表皮細胞の増殖が優勢となり、色素細胞の増殖が阻害する。そこで、Dispase により、表皮細胞の選択的除去を行うことで、色素細胞培養純度を上げる方法を試みた。すると、一定の効果を認めたが色素細胞のみの単離はできず、表皮細胞の増殖の盛り返しを認めた。そこで、採取した皮膚に Dispase を用いて、表皮細胞を選択的除去することで、繊維芽細胞を除去した色素細胞、表皮細胞を選択的に含有する細胞浮遊液を作製した。それを F12 改変培地で培養することで、色素細胞を特異的に培養する事ができた。別に培養している表皮細胞の培養過程に、この培養

色素細胞を播種して共培養する技術の確立を試みたところ、表皮細胞の継代時に、表皮細胞播種後 48 時間以内に色素細胞を播種することで、共培養が可能であった。得られた培養表皮は DOPA 染色によって、色素細胞の播種濃度に応じて色素細胞が維持されていることが確認された。

今回の検討において、自家培養色素細胞と自家培養表皮細胞を独立して培養維持し、共培養し、色素細胞を表皮細胞の培養環境下で維持し、培養表皮シート内の色素細胞数を調節する技術を確立した。すなわち色素調節が可能な培養表皮シートを作成することができた。

結語

正常皮膚から色素細胞を単離培養し、さらに表皮細胞と共培養する技術を確立した。色調調節可能な培養表皮シートの実現は、採皮部位の制限を無くし、採皮面積を小さくし、よりカラーマッチのすぐれた治療を提供できる可能性がある。