

# 論 文 要 旨

The sustained release of basic fibroblast growth factor accelerates angiogenesis and the engraftment of the inactivated dermis by high hydrostatic pressure  
(塩基性線維芽細胞増殖因子の徐放による高圧不活化した真皮の血管新生と生着の促進)

関西医科大学形成外科学講座  
(指導：楠 本 健 司 教授)

**Le Minh Tien**

## 【はじめに】

近年、化学的、生物学的、物理学的など多種多様な脱細胞化の方法が報告され、得られた脱細胞組織は、元の構造や特性を残し、組織工学や再生医療に理想的な組成や足場となり、免疫原性が無いか低いとされる。中でも高压(HHP)処理は、新しい脱細胞法で、化学的薬剤を使用せず、短時間で細胞や組織を不活化できる物理的手法である。我々は、200MPa、10分間を超すと、ミトコンドリア活性を不活化させて細胞死を導き、ヒト皮膚、ヒト母斑組織や豚皮膚を細胞外マトリックス(ECM)に損傷を与えず不活化することを既に報告した。これを基盤に、自己培養表皮と HHP により不活化した巨大色素性母斑の再利用による皮膚再生の新規治療を我々は発展させている。しかし、不活化した皮膚の移植後1週より12週で線維芽細胞の浸潤は多かったが、不活化皮膚の厚みを減じ、臨床的な癒痕拘縮に起因すると推察された。本研究では、マウスの皮膚を200MPa、10分間の HHP で不活化し、ヒト遺伝子組み換え塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を含浸させた CGS をマウスの皮下に埋植し、血管新生関連遺伝子の発現や不活化した皮膚の生着を組織学的に評価し、HHP 処理した皮膚の移植に bFGF を含浸させた CGS を有効に使用できるかを検討した。

## 【研究方法】

本研究では、HHP で不活化した皮膚に bFGF を徐放するコラーゲン/ゼラチンスポンジ(CGS)を血管新生を促進させるために併用した。10尾の C57BL/6Jcl マウス(8週齢、雄)の背部で生検パンチを用いて120片の8mm径の全層皮膚片を採取し、10% glycelol と 5% fructose solution を満たした凍結保存ボトルに準備した。それぞれのボトルを特製の HHP device により 200MPa、10分間の HHP を行い、移植まで-80°Cで凍結保存した。これらの皮膚片への HHP の影響を評価するため、HHP 前後と凍結4週後の HE 染色、Azan 染色で検討した。移植皮膚片を被覆する CGS は、厚み3mm、長さ10×10mm で準備した。生理食塩水(NSS; normal saline solution)群(n=20; graft n=40)では 100  $\mu$ l の NSS を、bFGF 群(n=20; graft n=40)では 70  $\mu$ g/ml の bFGF 溶液を含浸させた CGS をそれぞれ準備した。動物の処置と手術操作は、isoflurane による麻酔の導入と維持で行った。NSS 群、bFGF 群共に1週用8尾、2週用8尾、8週用4尾とし、合計40尾の同系マウスを用いた。背部の両側の筋膜上に HHP 処理した移植皮膚片の真皮側を下に、上の表皮面の上に CGS を乗せて、CGS と移植片を下部の筋膜に縫着し、創周囲の皮膚で被覆して縫合閉鎖した。埋入1、2、8週後に移植皮膚片を採取し、その生着を組織学的に評価し、血管新生関連遺伝子(FGF-2、PDGF-A、VEGF-A の mRNA)の発現を RT-PCR で調べた。

## 【結果】

皮膚移植の組織の HHP 処理前後や凍結保存4週の HE 染色標本の顕微鏡所見では、表皮層や真皮のコラーゲン線維、細胞核、他の付属器の構造に目立った

差を認めなかった。移植 1 週後では、表皮が真皮から外れ、移植片の遺残した細胞は吸収された。移植 2 週後では、供与部の細胞が筋膜から移植片に浸潤し、表皮は完全に脱落し、真皮のコラーゲン線維の著明な炎症反応や劣化を認めなかった。組織切片で、NSS 群に比較して bFGF 群で、抗 vimentin 免疫染色で真皮の線維芽細胞密度が多く、抗 CD-31 免疫染色で新生血管を多く認めた。

真皮の血管新生を評価するために、FGF-2、PDGF-A、VEGF-A の mRNA の発現を RT-PCR で調べた。移植後 1 週で、bFGF 群の mRNA の発現を NSS 群と比較すると、FGF-2 は有意に高く 17 倍で ( $p<0.001$ )、PDGF-A と VEGF-A は、それぞれ 38 倍、44 倍と高かった ( $p<0.01$ )。しかし、2 週後では bFGF 群の FGF-2 の発現は、NSS 群に比べ大きく下がり ( $p<0.01$ )、NSS 群に比較して bFGF 群では PDGF-A では 2 倍高く維持していたが ( $p<0.05$ )、bFGF 群の PDGF-A の発現もまた 2 週後で減じていた。

HHP 処理後の皮膚移植 8 週後の組織所見より、bFGF 群は真皮の占める領域と厚さは、NSS 群に比較し、共に有意に大きかった ( $p<0.05$ )。

#### 【考察】

200MPa、10 分間の HHP による不活化皮膚の移植では、bFGF を含侵させた CGS の応用で、術 1、2 週で不活化皮膚の中の線維芽細胞数や血管新生を促進していた。術 8 週では、不活化皮膚の真皮の領域と厚みを増やし、生着の改善を示した。bFGF の徐放により、不活化した移植皮膚片の線維芽細胞を増加させ、血管新生を誘導させたことは、bFGF を含侵させた CEA を応用することで、HHP により不活化した移植皮膚片の生着の改善に有効であることを示唆した。