

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                        |    |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|---------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 博士（ 医学 ）                                                                                                                                               | 氏名 | 仲 野 孝 史 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Development of a Self-Assembled Dermal Substitute from Human Fibroblasts Using Long-term Three-Dimensional Culture<br>(長期三次元培養によるヒト皮膚線維芽細胞を用いた培養真皮の開発) |    |         |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                        |    |         |
| <p>広範囲皮膚欠損に対する標準治療は自家皮膚移植であるが、自家皮膚は利用できる量に限界がある。したがって皮膚再生療法の確立は喫緊の課題であり、表皮再生には自家培養表皮が臨床応用されている。しかし、その母床となる真皮の再生方法はいまだ確立されていない。足場として異種コラーゲンをを用いた人工真皮や他家由来の凍結保存皮膚が利用されているが、既存材料で再構築された真皮様組織には自家培養表皮の生着率が低い。そこで本研究では、コラーゲンなどの足場を使用せずに立体的な細胞構造体を生成可能なネットモールド法に焦点を当てた。本法は、100 <math>\mu</math>m 間隔で配置された鋼線の鋳型（ネットモールド）内でスフェロイドを培養し凝集させる三次元培養法で、皮膚線維芽細胞から三週間で厚みのある細胞構造体が作製できると報告されている。本研究では、ネットモールド法を用いて皮膚線維芽細胞を三週間以上培養し、細胞外マトリックス（ECM）を豊富に含む力学的強度のある細胞構造体（培養真皮）が形成可能であるかを検証した。まず、2 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月の長期培養を行い、培養真皮を作製し、in vitro で比較評価した。そして、適切な培養期間で作製した培養真皮の創傷治癒効果を免疫不全マウスの皮膚欠損モデルを用いて既存の人工真皮と比較して検証した。</p> <p>まず、ヒト皮膚線維芽細胞 <math>2 \times 10^7</math> 個をシリコンディンプルプレート上に播種し、直径約 200 <math>\mu</math>m のスフェロイド約 4500 個を作製した。これらを縦横 6mm、厚さ 1mm のネットモールドに移し、10%FBS 添加 FKCM 培地で培養した。培養期間は 2 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月とし、作製した培養真皮の組織学的評価と乾燥重量、コラーゲンおよびグリコサミノグリカン（GAG）の含有量、糸引張強度、生細胞数を測定し、各時点で比較評価した（N=3）。次に、免疫不全マウス（7 週、雄）に背部全層皮膚欠損を作成し、以下の 3 群に分けて移植実験を行った：①4 ヶ月培養した培養真皮を移植した培養真皮群、②既存の Pelnac Gplus®を貼付した人工真皮群、③創面にシリコンシートを載せたコントロール群。術後 7 日目と 14 日目に組織を採取し、創中央断面での新生上皮長、新生肉芽面積、新生血管数および面積を計測し、群間で比較評価した（N=3）。</p> <p>各時点で約 1mm 厚の培養真皮が作製できた。組織学的評価では、培養真皮の内部は ECM が疎である一方で、上面と下面には ECM が濃密に染まる領域が確認された。特に 4 ヶ月の培養真皮では、約 400 <math>\mu</math>m 厚の二層で ECM が濃密に染まることが観察された。乾燥重量と生細胞数には有意な変化は見られなかったが、コラーゲン含有量は 2 ヶ月時点で最も多く、4 ヶ月と 6 ヶ月で有意差は見られなかった。また、GAG の含有量は 2 ヶ月と 4 ヶ月で有意差がなく、6 ヶ月で 2 ヶ月と比較して有意に低下した。糸引張強度は 4 ヶ月と 6 ヶ月が 2 ヶ月に比べて有意に強く、これは ECM の構造が変化した可能性を示唆している。栄養や酸素の拡散限界によって、培養真皮の内部が疎になり、上下に二層の ECM が豊富な組織が形成された可能性がある。ECM を豊富に含む強度のある 4 ヶ月の培養真皮を上層・下層に分割して移植実験に用いた。この培養真皮は皮膚欠損部の創縁に縫合固定でき、14 日目の組織学的評価では培養真皮群が最</p> |                                                                                                                                                        |    |         |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>も長い新生上皮長と最も大きい新生血管面積を示した。この結果から、4 ヶ月培養した培養真皮が皮膚欠損創において上皮化と血管新生を促進し、創傷治癒効果が高いことが示された。</p> <p>本研究では、ネットモールド法を用いてヒト皮膚線維芽細胞から ECM を豊富に含む縫合可能な強度を持つ培養真皮が開発できた。この培養真皮は免疫不全マウスの皮膚欠損創に移植することで高い創傷治癒効果を示し、真皮再生の有効な方法として期待される。</p> <p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>広範囲皮膚欠損に対する標準治療は自家皮膚移植であるが、自家皮膚には利用できる量に限界があり、皮膚再生療法の確立が求められている。表皮再生には自家培養表皮が臨床応用されているが、その母床となる真皮の再生方法は未だ確立されていない。本研究では、コラーゲンなどの足場を使用せずに立体的な細胞構造体を生成可能なネットモールド法を用いて皮膚線維芽細胞を三週間以上培養し、細胞外マトリックス（ECM）を豊富に含む力学的強度のある培養真皮の形成を検証した。</p> <p>2 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月の長期培養を実施し、作成した培養真皮の比較評価を行った。その結果、4 ヶ月の培養真皮は ECM を豊富に含み、力学的強度が高いことが確認された。次に、免疫不全マウスの皮膚欠損モデルを用いて、培養真皮の移植実験を行い、既存の人工真皮と比較して生着の有無を検証した。その結果、培養真皮は皮膚欠損部の創縁に縫合固定でき、組織学的評価において上皮化と血管新生が認められ、創面に生着することが確認された。</p> <p>本研究により、ネットモールド法を用いてヒト皮膚線維芽細胞から ECM を豊富に含む力学的強度のある培養真皮が開発された。この培養真皮は、真皮再生の有効な方法として期待される。また、今回の研究は自家培養表皮の母床となる真皮再生方法の確立に貢献し、新たな皮膚再生療法の展開に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 6 年 10 月 7 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|