

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2015

課題番号：15H06079

研究課題名(和文)急性期褥瘡に対する間葉系幹細胞の治療効果

研究課題名(英文)The role of mesenchymal stem cells of cutaneous ischemia-reperfusion injury.

研究代表者

内山 明彦(Uchiyama, Akihiko)

群馬大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90760538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：分泌蛋白質MFG-E8は、アポトーシス細胞貪食の制御や血管新生など様々な機能の制御に関わっている。申請者は皮膚虚血再還流障害(褥瘡)モデルマウスを確立させ、MFG-E8の投与によって、アポトーシス細胞を抑制し、炎症性サイトカインの産生や炎症性(M1)マクロファージを抑制することで組織傷害を軽減すること、すなわち、褥瘡の発生を防ぐことができることを明らかにした。

本研究では、間葉系幹細胞による皮膚虚血再還流障害におけるアポトーシス細胞の抑制や抗炎症作用、血管新生など様々な機能制御の機序および間葉系幹細胞由来の分泌蛋白質MFG-E8の役割を明らかにして、今後の臨床応用への基盤となる研究を行う。

研究成果の概要(英文)：The secreted glycoprotein MFG-E8 has many functions, including accelerating phagocytosis of apoptotic cells by phagocytes and promoting angiogenesis. We previously reported that administration of MFG-E8 suppresses the formation of pressure ulcers induced by cutaneous ischemia-reperfusion(I/R) injury by regulating inflammation and angiogenesis. It has been reported that Mesenchymal stem cells (MSC) has the potential preventing tissue damage caused by I/R injury in several organs including brain, liver and kidney. Furthermore, we recently investigated that MSC produce large amount of MFG-E8, however, the precise mechanism of MSC-derived MFG-E8 in cutaneous I/R injury was not well known.

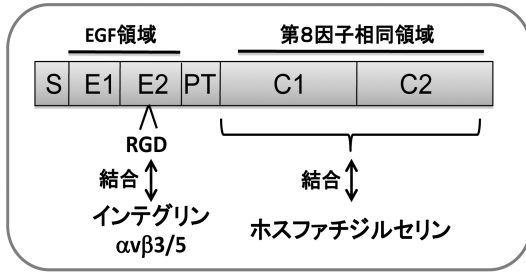
The aim of this study is to elucidate the mechanisms and the roles of MSC in cutaneous I/R injury involving the regulation of apoptotic cells, inflammatory reaction and angiogenesis, and the effect of MSC-derived MFG-E8 on I/R injury.

研究分野：皮膚

キーワード：間葉系幹細胞 MFG-E8 皮膚虚血再還流障害 血管新生 アポトーシス

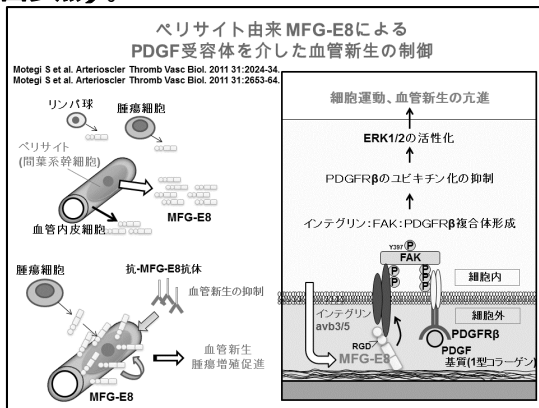
1. 研究開始当初の背景

分泌蛋白質 MFG-E8 は N 末端に 2 つの上皮成長因子様ドメインを持ち、インテグリンとの結合に重要な RGD 配列を含む(下図参照)。

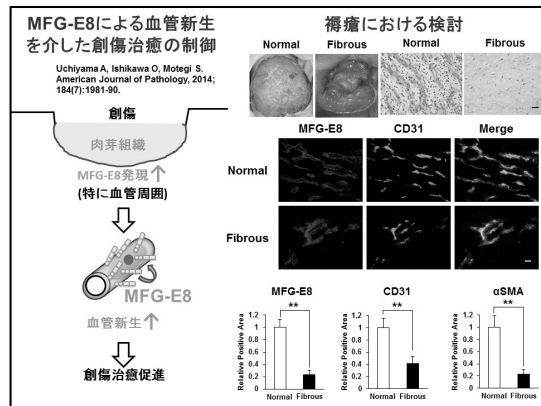


MFG-E8 は RGD 配列を介して、インテグリン $\alpha v \beta 3/5$ と結合する。MFG-E8 は、アポトーシス細胞貪食の制御やコラーゲン代謝能の制御など様々な機能の制御に関わっている。これまでに、申請者のグループは、マウス悪性黒色腫内において、ペリサイトが MFG-E8 の主要な産生細胞であること、そして分泌された MFG-E8 が血管周囲に局在し、腫瘍血管新生を促進させることを明らかにした(Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology 31: 2024-2034, 2011)。

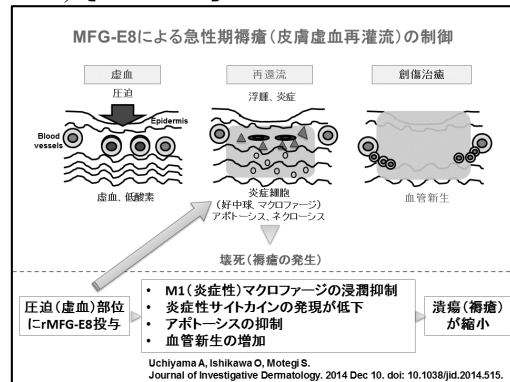
さらに、MFG-E8 によるペリサイトを介した血管新生制御のメカニズムも明らかにした。MFG-E8 はペリサイト様細胞 10T1/2 cell より産生、分泌され、細胞膜上のインテグリン αv と結合する。そして、PDGF 刺激によりリン酸化された PDGFR β は FAK を介して、インテグリン αv と複合体を形成する。そして、PDGFR β のユビキチン化が抑制されることにより、PDGFR β シグナルが増強することを明らかにした(Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology 31: 2653-2664, 2011) (下図参照)。



さらに、申請者は皮膚創傷治癒過程において、MFG-E8 が肉芽組織内において発現が亢進し、特に血管周囲に強く発現が亢進すること、また MFG-E8 が血管新生を介して皮膚創傷治癒を制御していることを明らかにした(American Journal of Pathology 184: 1981-1990, 2014) (右上図参照)。この成果より、MFG-E8 が通常の創傷(外傷等)に効果を示すことが示唆された。次に、申請者は褥瘡(圧迫によって生じる創傷)における MFG-E8 の役割に着目した。しかし、MFG-E8

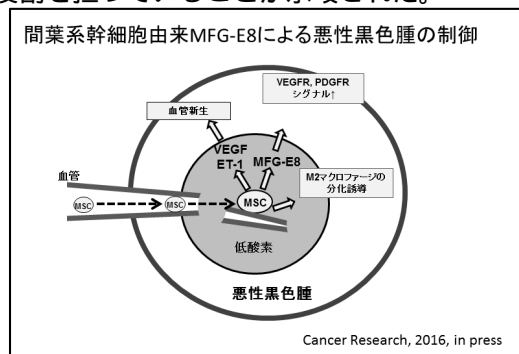


による皮膚虚血再還流障害の制御機構についてはこれまでに明らかとなっていなかった。申請者は皮膚虚血再還流障害(褥瘡)モデルマウスを確立させて、MFG-E8 の投与によって、アポトーシス細胞を抑制し、炎症性サイトカインの産生や炎症性(M1)マクロファージを抑制することで組織傷害を軽減すること、すなわち、褥瘡の発生を防ぐことができることを明らかにした(Journal of Investigative Dermatology 135: 1157-1165, 2015) (下図参照)。



近年、間葉系幹細胞と虚血再還流障害に関する様々な研究がなされている。過去の報告ではラット脳、肝臓、腎臓などの臓器を用いた虚血再還流障害モデルにおいて間葉系幹細胞がアポトーシス細胞や酸化ストレス、一酸化窒素合成酵素などを抑制することが知られている。また、我が国においては、脳梗塞患者に対する間葉系幹細胞による臨床治験が既に行われており、今後、様々な医療分野において、間葉系幹細胞を用いた研究が進むことで臨床応用への可能性が期待されている。しかし、皮膚の虚血再還流障害における間葉系幹細胞の役割に関してはこれまでに明らかとなっていない。また、以前に我々はマウス悪性黒色腫内において MFG-E8 の主要な産生細胞がペリサイトであることを明らかにした。ペリサイトは間葉系幹細胞由来の細胞であることから、皮膚虚血再還流障害において間葉系幹細胞が重要な役割を担っている可能性が高く、さらに間葉系幹細胞による機能制御には間葉系幹細胞が産生する MFG-E8 が重要である可能性が考えられた。また、我々は近年マウス悪性黒色腫において、間葉系幹細胞由来 MFG-E8 が血管新生や腫瘍随伴性マクロファージの M2 マクロファージ

への分化を促進することで腫瘍増殖を制御するメカニズムを明らかにした（**Cancer Research, 2016, in press**）（**下図参照**）。この成果により、間葉系幹細胞による血管新生やマクロファージの機能制御に MFG-E8 が重要な役割を担っていることが示唆された。



そこで、今回、間葉系幹細胞による皮膚虚血再還流障害の機能制御について、また間葉系幹細胞による MFG-E8 を介した皮膚虚血再還流障害の機能制御について研究を着想した。

2. 研究の目的

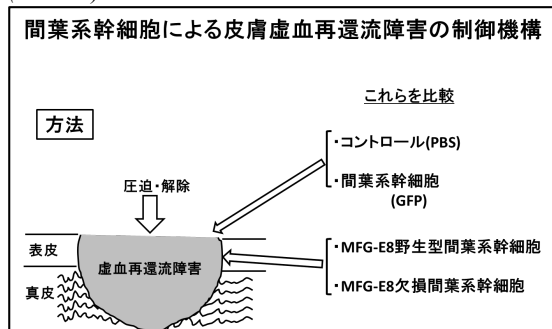
皮膚虚血再還流障害（褥瘡）に対する間葉系幹細胞の治療効果について明らかにする。

皮膚虚血再還流障害（褥瘡）に対する間葉系幹細胞の治療効果における MFG-E8 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

皮膚虚血再還流障害（褥瘡）に対する間葉系幹細胞の治療効果について明らかにする。

(*in vivo*)



我々がこれまでに確立しているマウスを用いた皮膚虚血再還流障害モデル（褥瘡）を用いる。間葉系幹細胞投与群とコントロール（PBS）投与群における虚血再還流障害後に生じる潰瘍形成に対する影響を検討する。虚血再還流した部位に生じる潰瘍の面積を連日撮影し、解析ソフトを用いて潰瘍面積を計測し両者の違いについて比較、検討する。

また、間葉系幹細胞による制御機構を解明するため、虚血再還流後の潰瘍部を含む皮膚組織を用いて炎症細胞浸潤（好中球、マクロファージ）炎症性サイトカインの発現アポトーシス細胞数、血管傷害などについて間葉系幹細胞投与群とコントロール群で免疫染色法や real time PCR 法を用いて比較、検討を行う。

さらに、虚血再還流障害で重要な因子である低酸素領域に対する間葉系幹細胞の影響や酸化的 DNA 損傷の程度について、皮膚虚血再還流後の潰瘍部を含む皮膚組織を用いて免疫染色法を用いた検討を行う。

また、我々は生体の酸化ストレス応答を担う活性酸素の生成源として重要因子である Nox ファミリー（Nox1～5）に着目した。正常状態と皮膚虚血再還流後の皮膚組織において Nox ファミリーの発現の比較、検討を行う。さらに、皮膚虚血再還流後により生じる Nox ファミリーの発現量の変化における間葉系幹細胞投与の与える影響を比較、検討する。

さらに、局所注入した間葉系幹細胞がどの部位に分布し、どのくらいの期間生着しているのかを検討するために、GFP マウスより作成した間葉系幹細胞を用いて検討を行う。GFP 陽性間葉系幹細胞の分布、生着期間 MFG-E8 の発現を調べる。

皮膚虚血再還流障害（褥瘡）に対する間葉系幹細胞の治療効果における MFG-E8 の役割を明らかにする。

C57BL/6 マウスを用いて MFG-E8 野生型マウスと MFG-E8 遺伝欠損マウスから申請者のグループが独自に作成した骨髄由来間葉系幹細胞を用いた検討を行う。皮膚虚血再還流障害を生じさせた部位に間葉系幹細胞を局注する。その後虚血再還流した部位に生じる潰瘍の面積を連日計測し、両者の違いについて比較、検討する。さらに、その違いについて組織学的及び生化学的な検討を行う。

また、*in vitro* の検討としてマウスマクロファージ様細胞 (Raw 264.7 cells) を用いた検討を予定している。間葉系幹細胞が産生するサイトカインが与えるマクロファージの分化への影響について *in vitro* での検討を行う。マクロファージ様細胞に MFG-E8 野生型マウスと MFG-E8 遺伝欠損マウスそれぞれから作成した間葉系幹細胞を培養して、その培養液を用いて刺激を行う。その後に細胞から RNA を回収してマクロファージの分化傾向 (M1 マクロファージもしくは M2 マクロファージへの分化) の違いについて比較、検討を行う。

4. 研究成果

現在は虚血再還流後に生じる潰瘍に関して実験数を増やして検討を行っている。間葉系幹細胞投与群では、コントロール群と比較して虚血再還流後に生じる潰瘍が縮小する傾向がみられた。

また、間葉系幹細胞における皮膚虚血再還流障害の制御機構についても検討を行っている。血管新生や炎症細胞浸潤の程度及び炎症性サイトカインの発現量に対する間葉系幹細胞の影響を免疫染色やリアルタイム PCR 法を用いた検討を継続して行う。

さらに、虚血再還流後の皮膚組織を用いて、虚血再還流障害で重要とされる低酸素領域や活性酸素種の産生量、酸化的 DNA 損傷などに対する間葉系幹細胞の影響についても

検討も予定している。

さらに、今後 MFG-E8 遺伝子欠損マウスから作成した間葉系幹細胞を用いて皮膚虚血再還流障害における、間葉系幹細胞由来 MFG-E8 の有無による影響に関する検討を順次進めていく。

さらに、*in vitro* におけるマクロファージの分化能に対する影響についても比較、検討を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

内山 明彦 (Uchiyama, Akihiko)

群馬大学・医学部付属病院・医院

研究者番号：90760538

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：