

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11677

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞の抗炎症作用による創傷治癒促進に関する基礎的研究

研究課題名(英文) A basic study of wound healing promoted anti-inflammatory action of adipose stem cells

研究代表者

倉林 くみ子 (Kurabayashi, Kumiko)

東京大学・医学部附属病院・届出診療員

研究者番号：40586757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜の炎症・潰瘍は、一部では難治性潰瘍として長期化し治療に難渋する。創傷を早期に治癒に導く低侵襲の治療法を開発することは喫緊の課題である。近年、採取に際しての侵襲性や自由度、細胞の特性などの優位性から脂肪由来幹細胞が注目されている。本研究ではASCの抗炎症作用機序および創傷治癒過程における治癒機転促進の機序を明らかにすることを目的とし、また、ASCのハイドロゲルを用いたデリバリーシステムを検討した。さらに、皮膚欠損モデルを用いて、従来の創傷被覆材や薬剤とASC含有ハイドロゲルによる創傷治癒に関する比較検討を行い、ASCの創傷における治療効果を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷疾患は、長期的に改善が認められず、難治性潰瘍として疼痛コントロールに苦慮するケースも依然として多い。創傷部へ有効かつ迅速に作用する治療法の開発が求められている。近年、脂肪幹細胞(ASC)に、旺盛な増殖能、免疫抑制作用、抗炎症作用も報告されており、治療抵抗性の免疫疾患に対する細胞療法剤として注目されている。近年、臨床においてASCやSVFを用いて新鮮自己ASCの投与や、治療などへの臨床研究が報告されているが、いずれも補助的な利用にとどまっているのが現状である。したがって、ASCの機能および作用メカニズムを解明し、創傷治癒を始めとする臨床での細胞療法のさらなる発展に重要である。

研究成果の概要(英文)：The ulcer of the mucosa most heal by conventional treatment, but suffer from treatment as an intractable ulcer in a part. It is an urgent problem to develop a therapy of the low involvement to lead a wound to the healing early. In late years it is reported that mesenchymal stem cells have anti-inflammatory action, healing promotion effects, and stem cells derived from fat attract attention from the superiority such as invasiveness and flexibility on the occasion of the sampling in particular, the characteristics of cells. It was intended to determine an anti-inflammatory action mechanism of ASC and a mechanism of the repair mechanism promotion in the vulnery process in this study and, also, examined a delivery system using the hydrogel of ASC. Furthermore, using an apellous model, we performed comparison about the wound healing with conventional vulnery covering material and drug and the ASC-containing hydrogel and tested the effect of treatment in the wound of ASC.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪幹細胞 創傷治癒 ハイドロゲル デリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

1. 研究の学術的背景

外傷や熱傷、あるいは感染や放射線治療などの外的刺激により生じる皮膚や粘膜創傷疾患の治療は、原因除去とともに創傷の軽減を認めるケースが一般的である。一方で、長期的に改善が認められず、難治性潰瘍として疼痛コントロールに苦慮し、また肥厚性瘢痕を惹起するケースも依然として多い。難治性潰瘍の背景には、炎症性サイトカインの過剰産生、反対に細胞増殖因子の減少などにより、正常な創傷治癒メカニズムの機能崩壊がある。これに対し、創傷部へ有効かつ迅速に作用する治療法の開発が求められている。近年、間葉系に属する細胞への分化能をもつ MSC に抗炎症作用、治癒促進作用を有することが報告されている。形成外科領域では、B-MSC 含浸したコラーゲンマトリックスの貼布による創傷治癒などが研究されている[Shigeru Ichioka 2005 BR J PLAST SURG]。近年、脂肪組織に大量の MSC を含むとともに、旺盛な増殖を示すことが注目を集めている。脂肪細胞は脂肪組織の体積の 90% 以上を占めているが、細胞数自体はごく少数であり、血管内皮細胞や周皮細胞、ASC などほかの細胞が数多く存在する。これらの脂肪細胞以外の有核細胞の集合体は間質血管細胞群(stromal vascular fraction[以下 SVF])と呼ばれ、脂肪組織を酵素処理することにより、効率よく分離することができる。また近年では、免疫抑制作用、抗炎症作用も報告されてきていることから治療抵抗性の免疫疾患に対する細胞療法剤として有望視されている[Gonzalez 2009 Gastroenterology]。現在、臨床においては、ASC や SVF を用いて骨欠損に対するフィブリン糊と混合した新鮮自己 ASC の投与[Lendeckel 2004 case report.Craniomaxillofac Surg]や、豊胸術や乳房再建、顔面脂肪萎縮症などに対して新鮮自己 ASC と吸引脂肪組織を移植した組織の増大や[Yoshimura 2008 Dermatol Surg]、ヒアルロン酸と自己 ASC を用いた皮下移植による若返り[Stillaert 2008 Biomaterials]、急性心筋梗塞、前立腺切除後の緊張性尿失禁に対する治療などへの臨床研究が報告されている。しかし、これらは、細胞単独での治療も行われているが、むしろ補助的な利用を目的としていることが現状である。また研究機関ごとにプロトコルなどで多くの相違点があり、安全性、有効性などの検証は喫緊の課題である。したがって、ASC の機能および作用メカニズムを解明することにより、ASC の有効かつ確実な利用が可能となり、創傷治癒を始めとする臨床での細胞療法のさらなる発展に重要であると考えらる。

2. 研究の目的

外傷、熱傷、感染あるいは放射線治療などにより生じる皮膚・粘膜の炎症、潰瘍は、要因除去、洗浄、軟膏塗布などによる治療で多くは治癒するが、一部では難治性潰瘍として治療に難渋する。創傷を早期に治癒に導く低侵襲の治療法を開発することは喫緊の課題である。近年、間葉系幹細胞(MSC; mesenchymal stem cell)が抗炎症作用、治癒促進作用を有することが報告され、特に採取に際しての侵襲性や自由度、細胞の特性などの優位性から脂肪由来幹細胞(ASC)が注目されている。本研究では ASC の抗炎症作用機序および創傷治癒過程における治癒機転促進の機序を明らかにすることを目的とする。また、ASC のハイドロゲルを用いたデリバリーシステムを検討する。さらに、皮膚欠損モデルを用いて、従来の創傷被覆材や薬剤と ASC 含有ハイドロゲルによる創傷治癒に関する比較検討を行い、ASC の創傷における治療効果を検証する。

3. 研究の方法

ASC の機能・特性評価をおこなうためには純化培養した ASC を効率的に単離し、特に抗炎症に強い関与が示唆される因子を特定する。この因子の発現を抑制する shRNA を用いて loss of function の系を立ち上げ、in vitro における ASC の幹細胞特性を検証する。同時に、in vivo における ASC の作用を検証するため C57BL/6JHamSlc-ob/ob マウスを用いて皮膚全層欠損モデルを作製し、ASC の抗炎症作用、また創傷治癒過程における ASC の作用機序を検証する。これらの情報を元に、ASC の機能を最大限に活用できるようなデリバリーシステムをヒアルロン酸、アテロコラーゲン、PuraMatrix を用いて比較検討を行い、最終的に最適なデリバリーシステムを確立。

4. 研究成果

ASC は 6 週齢の C57BL/6J マウスの鼠径部より脂肪組織を摘出し、2~3mm 大に細切した後、0.075% コラーゲナーゼを含む PBS 中で 37℃、30 分間分解をおこない、遠心分離後に脂肪細胞と線維性組織をペレットから分離し、ペレットのみを再懸濁する。100µm のフィルターに通したのち、抗体染色。FACS Aria Fusion (BD Bioscience 社)にて、CD31、45 陰性、CD34 陽性で分画される集団を ASC として採取し、10% FBS 含有 DMEM 培地にて 10cm ディッシュに播種する(初代培養、P0)。また、骨髓組織における CD31、45、Ter119 陰性、Sca-1、CD140a で分画される細胞集団(P-S あるいは MSC)をコントロ

ールとして用いる。

特性評価は、採取した ASC 1.0×10^3 細胞を 10cm ディッシュに播種し、10 日後のコロニー形成能を評価する CFU-F アッセイ、初代培養 (P0) ~P8 までの細胞増殖率を評価。細胞増殖能、骨、軟骨、脂肪の間葉 3 系統誘導培地による分化能を評価することで確認し、ASC の抗炎症作用の *in vitro* 検証に関しては、ASC を培養した際の培養上清 (コンディショナルメディアム、CM) を 6-well plate に RAW264.7 細胞 8.0×10^5 cells/well の細胞濃度で播種し、10%FBS を添加した D-MEM で 24 時間培養し上清を吸引除去し PBS で洗浄。Control 群と LPS 刺激群は無血清の MEM-alpha に、CM 添加群は CM に培地を入れ替え LPS 100 ng/ml を添加し 24 時間後に RAW264.7 細胞の mRNA およびタンパクを抽出。

in vitro での ASC の特性を *in vivo* での評価法として、C57BL/6JHamSlc-ob/ob マウスを用いて皮膚全層欠損モデルを作製する。作製法として、6週齢の雄マウスに対し、創作製前日に背部の剃毛をおこない、翌日、背部左右に 10×10 mm の全層欠損創を作製する (Day 0)。創部にはフィルムドレッシング (Tegaderm, 3M社) を貼付し、創縁を縫合またはドレッシングにより湿潤環境を維持する。創作製後 4, 7, 10, 14 日後、創閉鎖時、創閉鎖後 1 週間、1 か月で組織採取をおこない、形態学的、組織学的、生化学的に評価をおこなう。コントロールとして、C57BL/6J 野生型マウスを用いる。作製した皮膚欠損に対して $1.0 \times 10^6-8$ cells/mL の GFP 標識 C57BL/6J マウス由来 ASC 懸濁液を塗布し、フィルムドレッシングを貼付する。ASC 塗布後 4, 7, 10, 14 日後、創閉鎖時、創閉鎖後 1 週間、1 か月での ASC の生着状態および創傷治癒過程における ASC の作用を二光子顕微鏡によって、ASC を GFP で、コラーゲン線維を第 2 次高調波発生 (Second harmonic generation: SHG。コラーゲンなどの非線形光学結晶により入射波長の半分の光を発生する現象。染色不要) で観察し、ASC の分布と SHG シグナルの分布の関連を検討。その後、マウスを犠牲死させたのち、創部の形態、創幅の計測 (収縮)、新生上皮長の計測 (上皮化) をおこない、ASC の局在、炎症性細胞および線維芽細胞の浸潤を組織学的、免疫組織学的に評価する。また、組織より mRNA および蛋白質を採取し、炎症反応の指標である IL1b, IL2, IL6, IL8, TNFa, MMP2, MMP8, MMP9、また肉芽形成・収縮の指標である COL1a1, TGFb, SMA (ACTA2)、さらに上皮化の指標である LAMA5, FN1, COL4a2 をリアルタイム RT-PCR、western blotting によって生化学的に評価をおこなう。作製した shRNA により発現抑制された ASC を用いて比較検討することで、ASC が創傷治癒に関与することを実証するとともに、創傷治癒の各過程における ASC が分泌する治癒促進に効果的な因子の同定し、ASC による治癒作用機序を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし
6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：疋田 温彦
ローマ字氏名： HIKITA ATSUHIKO
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名： 特任准教授
研究者番号（8桁）：60443397

研究分担者氏名：藤原 夕子
ローマ字氏名： FUJIHARA YUKO
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名： 助教
研究者番号（8桁）：50466744

研究分担者氏名：米永 一理
ローマ字氏名： YONENAGA KAZUMICHI
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名： 届出診療員
研究者番号（8桁）：60756774

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。