

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：32202
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K10012
研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞および血管内皮前駆細胞の浄化濃縮培養上清による糖尿病足病変の治療

研究課題名(英文) Treatment of diabetic refractory ulcer by conditioned medium of adipose stem cells and adipose endothelial progenitor cells

研究代表者
井上 啓太(Keita, Inoue)

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80618520
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Endothelial progenitor cells (EPCs) are one of important cell populations to play pivotal roles in angiogenesis and wound healing. In this study, adipose-resident EPCs, adipose-derived stem cells, and their conditioned mediums were prepared, and their properties were analyzed.

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞の培養上清は、そのまま臨床応用が一部で始まっているが、これを浄化、濃縮して、治療に応用しようという試みは、我々が知る限り例がなく、有効性が検証できれば、より良い治療が可能となる。また、ヒト脂肪組織由来の血管内皮前駆細胞は、新しく調製した細胞集団であるため、全ての研究成果が新規結果となる。血管内皮前駆細胞の培養上清も利用価値があることを確認できれば、再生医療分野において非常に価値が高いと言える。

研究成果の概要(英文)：細胞投与による再生医療において、その分泌因子(増殖因子やサイトカイン)の効能が大きいことが注目されている。分泌因子の効能に期待して、幹細胞培養後に得られる培養上清を投与する方法が、一部では臨床導入が始まっている。本研究では、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞、及び血管内皮前駆細胞の培養上清から、乳酸アンモニア等の代謝産物を除去し、増殖因子等の有効成分を濃縮した浄化濃縮培養上清を調製した。分泌因子を抗体アレイ法などにより同定し、それぞれの細胞に由来する培養上清の特性を検証した。疾患マウスモデル(2型糖尿病難治性皮膚潰瘍モデル)の創部へ浄化濃縮培養上清を局所投与する事による創治癒効果の促進を指標として有効性を確認する試験を行ったが、いくつかの理由により再試験を行う予定である。

研究分野：形成外科学

キーワード：再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は、生体中でも培養環境でも、その細胞自身や周囲の細胞が正常機能を維持するための生理活性物質(サイトカイン、増殖因子、酵素など)を放出していることが知られている。特に幹細胞や前駆細胞では、その細胞に特異的な生理活性物質が放出され、臓器の再生や恒常性維持において重要な働きをしていることが明らかにされている。これまでに行われてきた細胞投与医療においても、細胞が分化して臓器の構成単位として取り込まれることよりも、その細胞が分泌する因子による効能が大きいことも徐々に明らかにされてきた。本研究では、細胞自体を投与するのではなく、有効成分を濃縮するとともに、老廃代謝物を除去する方法を開発し、浄化濃縮された幹細胞培養上清を投与することで、細胞投与に匹敵する組織の再生や機能回復を目指す。

2. 研究の目的

ヒト脂肪組織由来の細胞より調製した幹細胞培養上清が、糖尿病性難治性皮膚潰瘍の創治癒を加速させるか、について以下の手順で検証する。

- (1) ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞の培養上清、および血管内皮前駆細胞の培養上清の調製
- (2) 培養上清に含まれる分泌因子の同定
- (3) 培養上清の浄化濃縮法(有効成分の濃縮と代謝老廃物の除去)の開発
- (4) 疾患マウスモデルを使用した浄化濃縮培養上清の有効性の検証

3. 研究の方法

(1) ヒト脂肪組織血管内皮前駆細胞の培養上清、および間葉系幹細胞の培養上清の調製

(1-1) 自治医科大学附属病院にて、倫理委員会の承認を得て、患者の同意の下、従来は破棄されていた残余の吸引脂肪組織の提供を受ける。

(1-2) ヒト吸引脂肪から、一般に知られているコラゲナーゼ酵素法により間葉系幹細胞を純化し大量培養する。

(1-3) 同時に、ヒト吸引脂肪から血管内皮前駆細胞も純化し大量培養する。

(1-4) ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞、および血管内皮前駆細胞から培養上清を回収する。

(2) 培養上清中に分泌された因子の同定

(2-1) 2種類の幹細胞培養上清に含まれる分泌因子(サイトカイン等)を抗体アレイ法で同定する。

(2-2) 抗体アレイ法により同定した分泌因子を個別に ELISA 法により定量する。

(3) 培養上清の浄化濃縮法(有効成分の濃縮と代謝老廃物の除去)の開発

(3-1) 培養上清を限外ろ過により浄化濃縮する。

(3-2) 上記(2)で同定した浄化濃縮培養上清中の分泌因子が、限外ろ過の過程で失っていないか、代謝産物が除去されているかを ELISA 法などにより定量解析する。

(4) 疾患マウスモデルを使用した浄化濃縮培養上清の有効性の検証

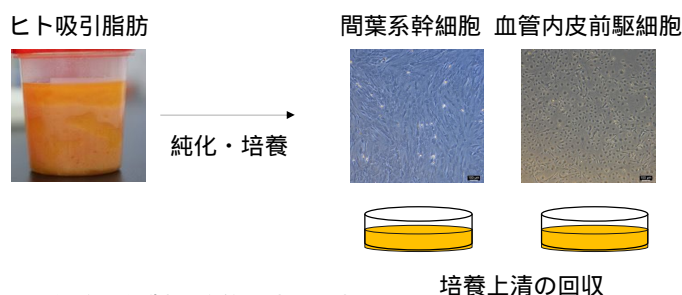
(4-1) 2型糖尿病マウスに糖尿病性難治性皮膚潰瘍を作製する。培養上清を創近傍皮膚へ局所投与し、非投与群と創治癒効果を比較検証する。

(4-2) 創傷治癒部を含む皮膚を回収し、組織学的に治療効果を解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト脂肪組織血管内皮前駆細胞の培養上清、および間葉系幹細胞の培養上清の調製

脂肪由来の血管内皮細胞、および間葉系幹細胞を調製し、それぞれの幹細胞培養上清を回収した(図1)。培養上清は、至適な細胞播種密度、および培地組成等の検討を行って回収した。脂肪由来の血管内皮前駆細胞の調製法は、磁気細胞分離により調製する方法で、所属研究室の独自の手法である。2022年に調製法と細胞の特性解析の結果を論文発表している(Saito N *et al.*, *Scientific Reports*, 12: 1775, 2022)。



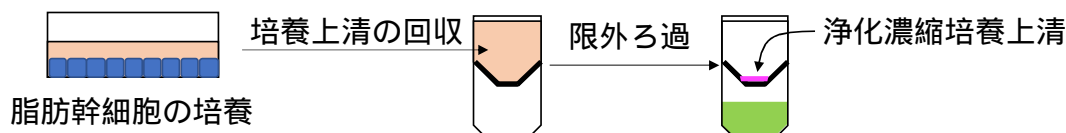
(図1) 細胞の調製と培養上清の回収

(2) 培養上清中に分泌された因子の同定

上記(1)で調製した間葉系幹細胞の培養上清、および血管内皮前駆細胞の培養上清を抗体アレイ(サイトカインアレイ)により、細胞が培地中に分泌した因子を半定量解析した。間葉系幹細胞の培養上清に含まれる因子は、複数のグループがすでに論文発表している内容と概ね一致していたが、一部新規の分泌因子を同定することができた。また、血管内皮前駆細胞の培養上清は、脂肪組織由来の血管内皮前駆細胞自体が新しく純化培養された細胞集団であるため、論文報告は無いが、一般的な血管内皮細胞で分泌が報告されている因子を中心に複数の分泌因子を同定することができた(具体的な分泌因子の種類、分泌量に関しては、知財の関係で非開示とします)。

(3) 培養上清の浄化濃縮法(有効成分の濃縮と代謝老廃物の除去)の開発

浄化濃縮培養上清の調製法の検討は、限外ろ過条件(ろ過膜のポアサイズ、温度、濃縮率など)を検証し、至適条件をある程度確立することができた(図2)。



(図2) 浄化濃縮培養上清の調製法の概略

この成果は、特許申請中のため、非開示とします。特許出願の状況:(出願番号)特許願 2020 - 148193、(発明の名称)細胞培養の上清浄化・濃縮法およびその製造物、(提出日)2020年9月3日

(4) 疾患マウスモデルを使用した浄化濃縮培養上清の有効性の検証

2型糖尿病マウスの皮膚全層をバイオプシーパンチで切除して、創傷治癒効果を検証した。本試験では、いくつかの問題が実験計画の不備が発生し、2022年度中に再試験を実施する予定である。

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

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞培養の上清浄化・濃縮法およびその製造物	発明者 吉村浩太郎、齋藤夏美、白土タカ子、Wu Yunyan	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-148193	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉村 浩太郎 (Kotaro Yoshimura)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------