

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18929

研究課題名（和文）幹細胞培養上清のセレクトーム解析および浄化濃縮法の開発

研究課題名（英文）Secretome analysis of purified adipocyte-conditioned medium

研究代表者

中川 志保（NAKAGAWA, SHIHO）

自治医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：60784345

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：1. 放射線障害モデルマウスの作成。マウスの背部皮膚に総量40Gyの放射線を照射し、照射1～12か月後までの創傷治癒能の経時変化を調査した。この結果、一時的に治癒が悪化する急性期を越えた後には、創傷治癒能はさらに低下することが明らかにされた。この要因として、組織内の幹細胞が放射線照射により減少していることがわかった。

2. 脂肪幹細胞および浄化濃縮培養上清を用いた再生医療の有効性と安全性の検証。上記モデルマウスに創作成を行い、脂肪幹細胞（ASC）混濁液、未浄化、及び浄化濃縮済み培養上清を局注し、創傷治癒効果を評価した。結果では明らかな有意差がみられず、最適濃度や注入方法について検討をしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療は侵襲の少ない治療法として広く行われているが、その副作用として難治性潰瘍などの皮膚障害があり、その病態や根本的治療法については未だ解明されていない。今回の研究において、脂肪幹細胞が放射線照射により不可逆的に減少していることが病態の一つであることがわかった。

この結果を踏まえ、放射線性皮膚障害の治療および予防方法として、枯渇した脂肪幹細胞の移植、あるいは脂肪幹細胞培養上清の投与により脂肪幹細胞の代わりとなるサイトカインを投与することが有効と考える。とくに培養上清は、細胞を含まないことから汎用性があり、我々は培養上清から有害因子を除去し、有効成分を濃縮した浄化濃縮培養上清を開発している。

研究成果の概要（英文）：1. Creation of irradiated mouse model. The back skin of mice was irradiated with a total dose of 40 Gy and the change in wound healing ability over time was investigated until 1～12 months after irradiation. As a result, it was revealed that after passing the acute phase, when healing temporarily worsens, the wound healing ability is further reduced. As a factor in this, it was found that stem cells in the tissue were reduced by irradiation.

2. Verification of the efficacy and safety of regenerative medicine using adipose stem cells and purified concentrated conditioned medium. To the irradiated mouse model, adipose stem cell (ASC), unpurified and purified concentrated conditioned medium were locally injected, and the wound healing effect was evaluated. As for the results, there is no clear significant difference, and the optimal concentration and injection method are being studied.

研究分野：形成外科

キーワード：確定的放射線障害 創傷治癒能 脂肪幹細胞 培養上清 浄化濃縮培養上清 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

(1) 放射線照射による長期進行性の確定的障害は、組織の萎縮、硬化、硬結、拘縮、冷感や皮膚潰瘍などがあり、いずれも患者 QOL に直結する重要な問題である。放射線治療に際しては、これらの確定的放射線障害に対する予防的治療をカップリングして行うべきと考える。確定的放射線障害の病態解明、および治療法の確立は、今後の放射線治療のさらなる普及のために急務である。

(2) 脂肪幹細胞を用いた再生医療は、治療効果の多くの部分が、分泌される増殖因子や酵素に起因することが分かり、幹細胞が分泌するあらゆる因子が含まれる培養上清を利用した再生医療も、一部医療現場において行われている。しかしながら、培養上清には一方では乳酸やアンモニアをはじめとする細胞に有害となる代謝老廃物も含まれている。培養上清のアンモニア濃度は約 1,500~2,500 $\mu\text{g}/\text{dL}$ で、これは觀賞魚が生息できる水質 (200 $\mu\text{g}/\text{dL}$) をはるかに上回っている。そこで、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、老廃代謝物を除去した浄化済み幹細胞培養上清 (特願 2021-143738) を投与することで、放射線障害を予防する可能性についても併せて考えた。

2. 研究の目的

(1) 確定的放射線障害の病因・病態を幹細胞生物学的に解明すること

(2) その根本的な治療法として、脂肪幹細胞培養上清を使った再生医療を実用化すること

である。そのために、幹細胞および血管内皮前駆細胞の培養上清をセクレトーム解析を通してその組成を科学的に明らかにすること、培養上清に含まれている有害物質を完全に除去するための浄化技術を開発すること、さらに、この浄化・濃縮した培養上清が、組織再生や血管新生に有効であることを、疾患動物モデルを使った実験で明らかにすること、である。

3. 研究の方法

(1) 放射線照射マウスにおける確定的放射線障害の経時的变化の解明

マウスの背部皮膚に総量 40Gy (10Gy \times 4 回、または 2Gy \times 20 回) の放射線照射を行う。

照射 1 か月後、3 か月後、6 か月後、9 か月後、12 か月後に放射線照射部位の皮膚を直径 6 mm のバイオプシーパンチ (Kai industries 社) にて全層でくり抜き、創を作成する。また、コントロールとして放射線非照射群の同週齢マウスに関しても同様に創を作成を行う。創収縮を予防するために創周囲皮膚をシリコンリングにて固定する。創傷部の経過を一眼レフカメラで撮影し、画像解析にて潰瘍面積を算出することにより創傷治癒能を評価する。また、組織の細胞の組成変化、細胞外マトリックス (ECM) の変化、血管構築の変化などを免疫組織学的に調べるとともに、皮膚血流量・速度、Hb 量、酸素飽和度、酸素分圧、組織弾性度についても経時的变化を測定する。

(2) 幹細胞培養上清のセクレトーム解析および浄化濃縮法の開発：難治性疾患に対する浄化濃縮培養上清による再生医療の研究

① 培養上清のセクレトーム解析、および培養環境による成分変化の分析

通常酸素分圧 (20% O_2)、組織内酸素分圧 (6% O_2)、低酸素分圧 (1% O_2) におけるヒト ASC の培養上清を回収し、増殖因子 (VEGF、HGF)、酵素および各種有害物質の濃度を定量する。ASC の継代数、分化期/増殖期、培養日数など培養上清の回収条件の違いによる物質濃度の変化を調べ、培養上清の調整方法の最適化を図る。

培養上清から有害物質の除去、および有用因子の濃縮方法を開発し、最適化する

1 で検討した条件で回収した培養上清から、細胞の代謝で蓄積された有害物質を除去するため、限外濾過膜法などの処理を行う。低分子量の有害物質 (乳酸やアンモニアなど) は除去され、高分子の有用因子は濃縮される。新鮮培地をカラムに追加し、濾過を繰り返すことで、有害物質

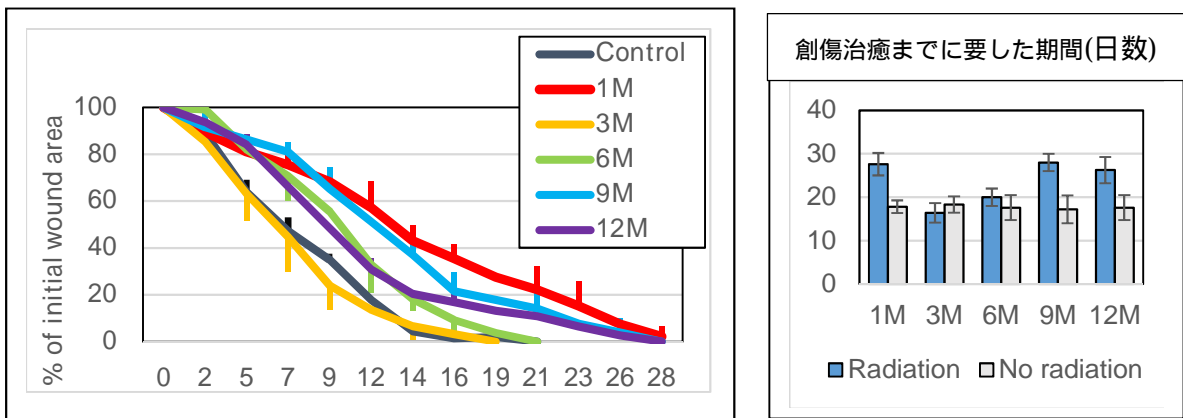
の大半が除去されることを確認する。有害物質の定量には iSTAT の GC4 カートリッジ (アボット社) アンモニア-テストワコー (和光純薬工業株式会社) などの測定キットを用いる。濃縮培養上清中の VEGF、HGF の量は ELISA 法により測定する。

放射線照射マウスモデルを使った浄化濃縮培養上清による創傷治癒能改善効果の検証

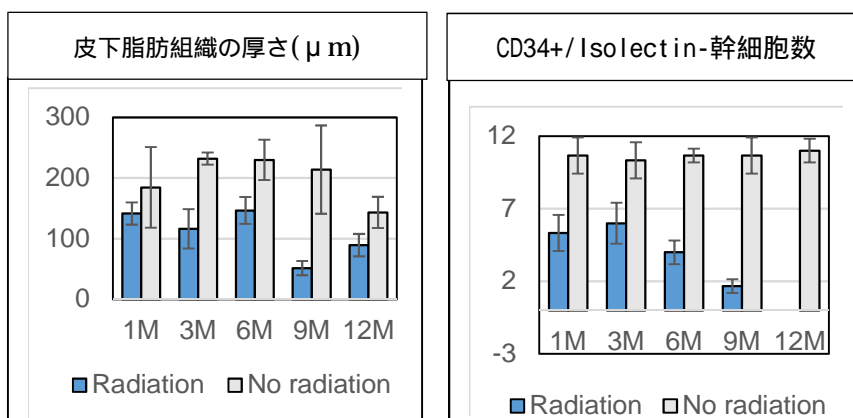
上記放射線照射マウスモデルを用いて実験を行う。治療群として、放射線照射が終了2か月後に背部皮膚に即作成を行い、創作成の3日、6日、9日後の3回、創部にネガティブコントロール、脂肪幹細胞 (ASC) 移植、ASC 培養上清、および浄化濃縮済み ASC 培養上清を局注する。創部の画像解析にて潰瘍面積の推移を算出し、創傷治癒能の改善効果を評価する。また、組織の細胞の組成変化、細胞外マトリックス (ECM) の変化、血管構築の変化などを免疫組織学的に調べるとともに、皮膚血流量・速度、Hb 量、酸素飽和度、酸素分圧、組織弾性度についても測定し、放射線障害皮膚の組織学的、機能的な予防的治療効果を評価する。

4. 研究成果

(1) 創傷治癒までに要した平均日数は、照射1か月後群で 27 ± 2 日、照射3か月後群で 16.4 ± 2.2 日、照射6か月後群で 20 ± 2 日、照射9か月後群で 28 ± 2 日、照射12か月後群で 26.3 ± 3 日であった。非照射群では 17.7 ± 2.6 日で、週齢間に統計学的有意差は認められなかった。

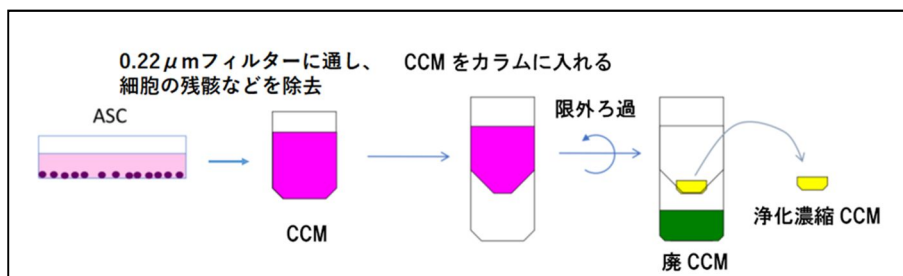


皮膚酸素飽和度は、照射6, 9, 12か月後群において、非照射群より低く ($p=0.0388$, $p=0.0227$, $p=0.0009$)、経時的に悪化していくことがわかった。組織学的検査では、皮下脂肪組織の厚さが照射3, 6, 9, 12か月後群において、非照射群よりも薄かった ($p=0.0039$, $p=0.0155$, $p=0.0357$, $p=0.0475$)。免疫組織学的検査では、皮下脂肪組織内の任意の視野における CD34+/Isolectin-幹細胞数を測定した結果、すべての照射群において減少がみられたが、経時的により減少していく傾向があった (対非照射群: 照射1か月後群 $p=0.0129$ 、照射3か月後群 $p=0.0314$ 、照射6か月後群 $p=0.0006$ 、照射9か月後群 $p=0.0007$ 、照射12か月後群 $p<0.0001$)。



(2) 幹細胞培養上清のセレクトーム解析および浄化濃縮法の開発

【治療ツール】ASC と AEPC は我々がすでに確立した方法で単離、培養する。ASC 浄化濃縮培養上清は、培養上清から細胞の代謝で蓄積された有害物質を除去するため、限外濾過膜法による処理を 2 回行う。低分子量の有害物質（乳酸やアンモニアなど）は除去され、高分子の有用因子は濃縮される。HGF 濃度は 505pg/ml から 11591pg/ml に濃縮され、アンモニア濃度は 256 μg/dl から 189 μg/dl に減少された。



放射線照射マウスモデルを使った浄化濃縮培養上清による創傷治癒能改善効果の検証

創傷治癒までに要した平均日数は、コントロール群（DMEM 培地）で 25.4 ± 2 日、ASC 投与群（10 万 cells）で 22.3 ± 1.3 日、培養上清投与群で 25.4 ± 2 日、浄化濃縮培養上清投与群で 26.2 ± 1.6 日であった。改善効果がみられなかったことから、投与方法や濃縮濃度の最適化を検討している。

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〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------