

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09850

研究課題名（和文）幹細胞培養上清の浄化濃縮法の開発と再生医療への応用

研究課題名（英文）A method for detoxifying and concentrating the mesenchymal stem cells' conditioned media and its application in regenerative medicine

研究代表者

呉 雲燕（Wu, Yunyan）

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：40636586

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、限外ろ過法（Ultrafiltration）によるヒト間葉系幹細胞由来培養上清の浄化・濃縮が成功し、さらに浄化濃縮幹細胞培養上清による細胞・組織への修復再生効果について検証した。具体的に、ヒト脂肪由来幹細胞（adipose-derived stem cells, ASCs）の培養上清を限外ろ過法にて、サイトカインや増殖因子など有用因子を濃縮し、アンモニアを含む小分子有害物質を取り除いた。次に、体外実験にて浄化濃縮幹細胞培養上清の細胞増殖能・移動能・内皮細胞血管新生促進能について検証した。さらに、難治性潰瘍モデルマウスを用いて、幹細胞培養上清の創傷治癒促進効果について確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療において、移植幹細胞の定着・分化よりは、細胞が分泌するサイトカインや増殖因子などの効果が期待される。我々は、ヒト脂肪由来幹細胞（human adipose-derived stem cells, ASCs）の培養上清に注目し、独自で開発された浄化濃縮法を通して培養上清の浄化・濃縮が成功した。培養上清には細胞成分が含まれていないため、他家由来の培養上清でも投与可能となり、製剤化も容易である。世界中の実験室で毎日廃棄されている培養上清の量は膨大であり、廃棄物を再利用して治療に使えることができれば、その総量と恩恵は膨大である、エコロジーという観点からも画期的な研究計画である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we successfully detoxified and concentrated human mesenchymal stem cell-derived conditioned medium using a membrane-mediated ultrafiltration method. The detoxified and concentrated conditioned medium (dt-CCM), characterized in enriched cytokines and growth factors, but less in metabolite secreted by the mesenchymal stem cells, is a potential therapeutic tool in regenerative medicine. In vitro experiments demonstrated that dt-CCM promoted the cell proliferation, cell motility, and the tube-formation of the vascular endothelial cells. Moreover, application of dt-CCM promoted the wound healing in refractory ulcer mice.

研究分野：再生医療

キーワード：幹細胞培養上清 浄化濃縮幹細胞培養上清 脂肪由来幹細胞 ASC 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

ヒト皮下脂肪組織に存在する間葉系幹細胞 (adipose-derived stem cells, ASCs) は、骨髄由来幹細胞 (BM-MSC) とほぼ同様の性質を有する。さらに脂肪組織は、低侵襲かつ大量に採取可能であり、再生医療において有用な細胞供給源として注目される。

これまでに行われた細胞投与治療において、幹細胞そのものだけでなく、幹細胞の分泌因子による治療効果が大きいことが明らかになり、幹細胞培養上清を利用した再生医療も、すでに臨床応用が始まっている。しかし、申請者らは、培養上清の成分を詳細に調べた結果、細胞増殖因子や血管新生因子などの有益因子が有するが、その量が僅かである。一方、細胞が放出した数多くの代謝老廃物 (アンモニア、乳酸など) が蓄積されている (図1、図2)。すなわち、培養上清をそのまま使用した場合は却って組織や細胞に危害を与えてしまうことが明らかになった。

有効で安全な臨床治療を行うためには、有害物質を取り除く (浄化) 豊富な有益因子 (濃縮) を有する幹細胞培養上清が望ましい。ただし、これまでに培養上清の浄化濃縮方法については全く研究されていない。さらに、臨床応用に向けて、*in vitro*、*in vivo* 法にて浄化濃縮培養上清の有効性および安全性についての検証も必要である。

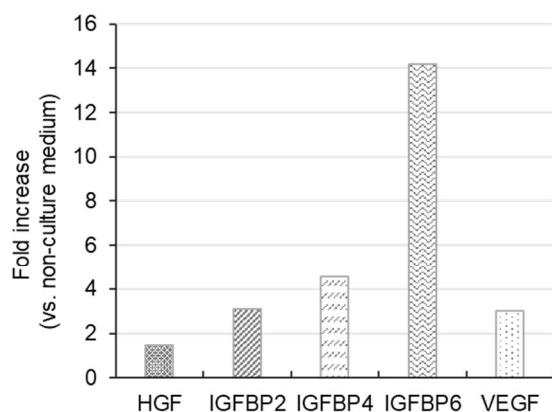


図1 脂肪由来幹細胞培養上清中細胞因子解析

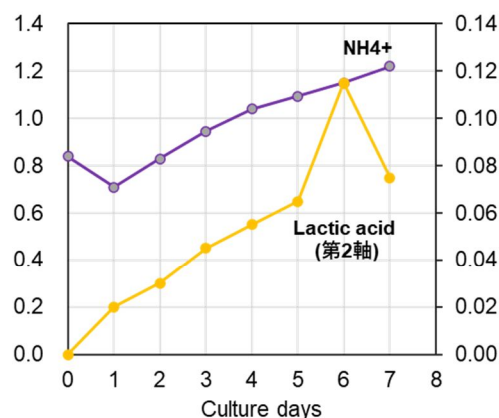


図2 脂肪由来幹細胞培養上清に代謝廃物が蓄積される

2. 研究の目的

前述背景に基づいて、本研究の目的では、高機能培養上清を回収するための最適な幹細胞 (主に ASCs) 培養法を確立する。次に、回収した培養上清を、独自で開発された方法により浄化濃縮を行い、浄化濃縮後幹細胞培養上清の有効性について体外実験にて評価する。さらに、疾患動物モデル (糖尿病潰瘍モデル) を用いて、浄化濃縮培養上清による創傷治療への有効性と安全性を評価することにより臨床研究用の治療プロトコルを確立する。

3. 研究の方法

1) 有用因子を最大限に含む培養上清を得るための最適な ASCs 培養条件の確立

異なる酸素環境 (20%、6%、1% O₂) 下で、継代数が (Passage 2, 3, 4) の ASCs 細胞を 30 日間培養し、3 日ないし 4 日ごとに培養上清を回収した。培養上清中有用因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、有害物質 (アンモニア) の定量分析を行う。

2) 培養上清中有害物質を取り除く、有益因子を濃縮する方法の開発および最適化

培養上清の浄化濃縮について：限外ろ過法を用いて培養上清から低分子有害物質 (乳酸やアンモニアなど) を取り除く、さらに増殖因子などの有用成分を濃縮する。高機能浄化濃縮培養上清を調製するため、最適な限外濾過膜の選択について検討する。

浄化能の評価：浄化・濃縮後培養上清から有害な物質であるアンモニアが除去できたかについて確認する。サンプルは、培養上清、浄化濃縮後の培養上清、および浄化濃縮廃液、コントロールとして新鮮未培養培地を用いる。アンモニア濃度の測定では、富士ドライケム NX10N (富士フィルムメディカル株式会社) にて行う。

濃縮能の評価：浄化濃縮後培養上清から、有用因子が濃縮されているかを確認する。浄化濃縮液および廃液を用いて、有用成分候補のうち肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) を ELISA 法にて定量し、濃縮能および回収率について評価する。

3) 浄化濃縮培養上清による細胞増殖効果の検証

培養上清、浄化濃縮培養上清を用いて ASCs やヒト皮膚由来角化細胞、線維芽細胞を培養し、細胞増殖能を CCK-8 assay にて評価する。血管新生促進能を内皮細胞管腔形成実験にて解析する。細胞遊走能を scratch wound healing assay にて測定する。

4) 疾患動物モデルを用いて浄化濃縮培養上清による組織再生効果・血管新生効果の検証

浄化濃縮培養上清が創傷治癒をどの程度促進するのか、組織再生、血管新生にどのような効果があるか、疾患動物モデル(糖尿病マウス)に、未浄化ないし浄化濃縮培養上清を局注し、創傷治癒効果を評価し比較する。

4. 研究成果

肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor, HGF)は、細胞増殖、血管新生、組織の修復において重要な増殖因子の一つであり、近年再生医療領域において大きな注目が集まっている。これに基づいて、我々は、高機能幹細胞培養上清、すなわち HGF に富む・低アンモニア(またはアンモニア不含有)幹細胞培養上清の獲得に着目した。

幹細胞培養上清の組成では、基礎培地や添加物、培養環境(酸素濃度)、継代数などによって大きく変動することが知られている。

(1) ヒト脂肪由来幹細胞(ASCs)を異なる酸素環境(21%、6%、1% O₂)で30日間培養し、3日或いは4日ごとに培養上清を回収し、培養上清中 HGF 濃度を ELISA 法にて解析した。

1% O₂ 培養環境と比較して、正常酸素(21% O₂)条件下培養した ASCs では、HGF 分泌能が高かったことが確認された。一方、正常酸素と比較して短期間(Day 6 まで)低酸素(6% O₂)培養において、培養上清中 HGF 濃度が高かったが、長期間(Day 9 から)にわたって、正常酸素にて培養した ASCs が HGF の分泌能が高いことが示唆された。(図3、Day 6-13 まで一部結果を提示)

ASCs の HGF 分泌能は、ドナーによって大きな個人差が示唆された。

培養上清中アンモニアの濃度では、細胞数と正の相関を示した。

(2) 培養上清から有害物質除去および有用因子の濃縮法を開発し、最適化する。

限外濾過法を用いて幹細胞培養上清の「濃縮」及び「浄化」を実現することができた。また、限外濾過工程に使われる限外ろ過膜の材質、公称分化分子量(normal molecular weight limit, NMWL)について検討し、浄化濃縮幹細胞培養上清の作製における最適な限外ろ過膜を確定し、実験室スケール浄化濃縮培養上清の製造が可能となった。

さらに、体外実験にて浄化濃縮培養上清による細胞増殖へ効果を検証する。

浄化濃縮した培養上清では、ヒト表皮角化細胞(normal human epidermal keratinocyte, NHEK)、正常ヒト皮膚線維芽細胞(normal human dermal fibroblast, NHDF) ASCs の増殖を促進することが示した。(図4)さらに、NHEK および NHDF の遊走能も促進した。

浄化濃縮幹細胞培養上清では、血管内皮細胞の管腔形成能を誘導することが確認された。

図3

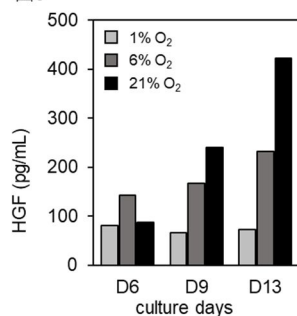
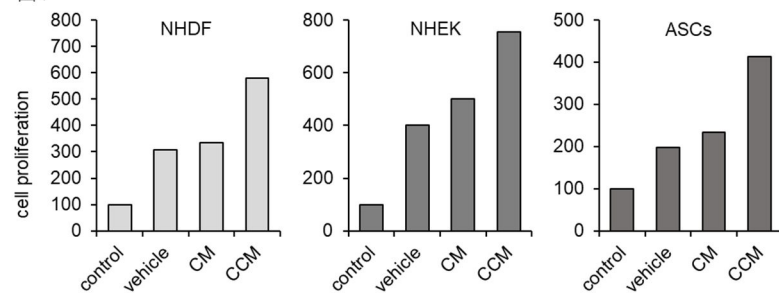
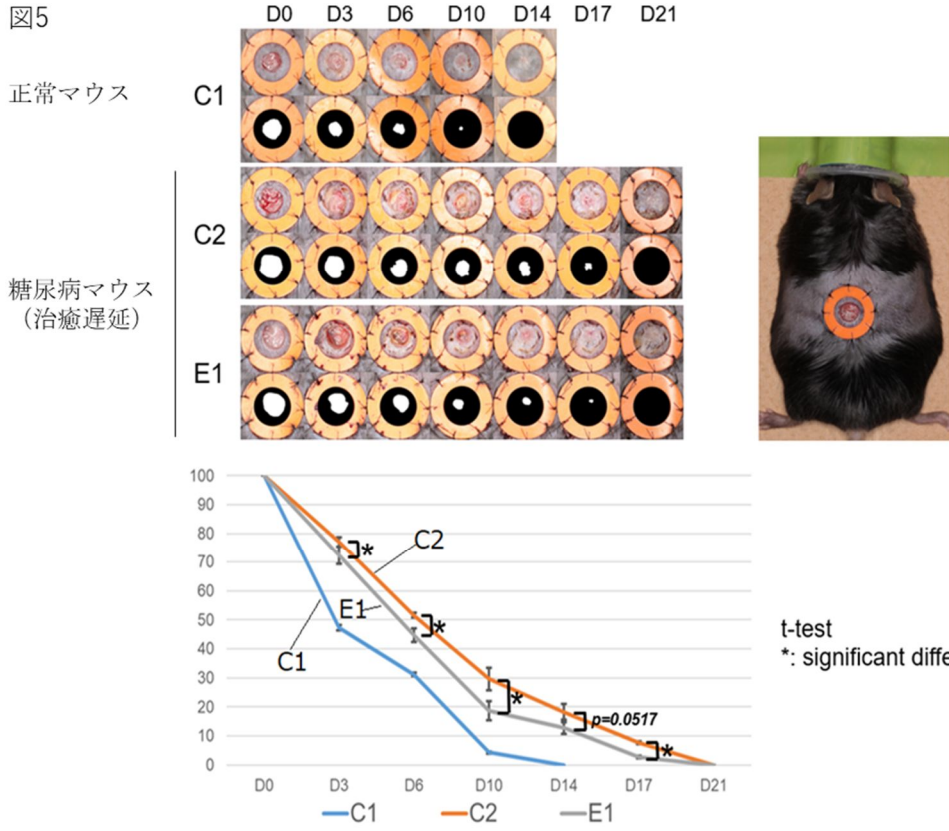


図4



(3) 糖尿病マウス(創傷治癒遅延モデル)を用いて、浄化濃縮幹細胞培養上清の創傷治癒へ有効性および安全性について評価した。糖尿病マウス群において、幹細胞培養上清未浄化群(C2群)と比較して、浄化濃縮幹細胞培養上清投与群(E1群)では、糖尿病マウスの創傷治癒を有意に促進した。(図5)

図5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mori Masanori, Saito Natsumi, Shirado Takako, Wu Yunyan, Asahi Rintaro, Yoshizumi Kayo, Yamamoto Yoshihiro, Zhang Bihang, Yoshimura Kotaro	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Human Adipose-Derived Endothelial Progenitor Cells Accelerate Epithelialization of Radiation Ulcer in Nude Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plastic & Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PRS.00000000000010756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saito Natsumi, Shirado Takako, Funabashi-Eto Hitomi, Wu Yunyan, Mori Masanori, Asahi Rintaro, Yoshimura Kotaro	4. 巻 12
2. 論文標題 Purification and characterization of human adipose-resident microvascular endothelial progenitor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05760-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Bihang, Wu Yunyan, Mori Masanori, Yoshimura Kotaro	4. 巻 -
2. 論文標題 Adipose-Derived Stem Cell Conditioned Medium and Wound Healing: A Systematic Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part B: Reviews	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEB.2021.0100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Masanori, Asahi Rintaro, Yamamoto Yoshihiro, Mashiko Takanobu, Yoshizumi Kayo, Saito Natsumi, Shirado Takako, Wu Yunyan, Yoshimura Kotaro	4. 巻 18
2. 論文標題 Sodium Alginate as a Potential Therapeutic Filler: An In Vivo Study in Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 520 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md18100520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yunyan Wu, 吉村浩太郎
2. 発表標題 浄化濃縮幹細胞培養上清の再生医療への応用展望
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔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、白土たか子、Wu Yunyan	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願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
研究分担者	吉村 浩太郎 (Yoshimura Kotaro) (60210762)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

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