

令和 5 年 6 月 26 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：20K09851

研究課題名(和文) 難治性皮膚潰瘍に対するヒト脂肪由来血管内皮前駆細胞を利用した治療法の開発研究

研究課題名(英文) Research of treatment for intractable skin ulcers using human adipose-resident microvascular endothelial progenitor cells

研究代表者

齋藤 夏美 (Saito, Natsumi)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：70638246

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)：糖尿病性潰瘍などの虚血性疾患に対する血管新生再生医療を目指して基礎研究を行った。ヒト脂肪組織常在性微小血管内皮前駆細胞(Adipose-resident microvascular endothelial progenitor cell: AEPC)の調製法確立と特性解析(Saito N., et al., Scientific Reports, 12(1):1775 2022)、及び放射線障害潰瘍マウスモデルに対するAEPC投与による創傷治癒能の改善効果(Mori M., et al., Plastic and Reconstructive Surgery, accepted)を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性下肢病変は、糖尿病合併症の一つで、神経障害と抹消血流障害が生じ、重症化すると皮膚潰瘍や組織壊死を起こして切断に至ることも多い。糖尿病患者は世界的に増加しており、厚生労働省の「H28年国民健康・栄養調査」によると我が国の糖尿病有病者数は1,000万人に上る。うち足潰瘍の発症率は約0.3%で、年間8,000例以上の足・下肢切断が行われている。従って、糖尿病性下肢病変を根本的に治療する方法の開発は、今後予想される患者数の増加と医療費の削減といった観点から、社会的要請の高い課題である。本研究では、糖尿病性潰瘍の新たな治療ツールとなりうるAEPCの調製法の確立、治療効果の検証を実施した。

研究成果の概要(英文)：We aimed at angiogenic regenerative medicine for ischemic diseases such as diabetic ulcers. We established a method for the isolation and characterization of human adipose tissue-resident microvascular endothelial progenitor cells (AEPC)(Saito N., et al., Scientific Reports, 12(1):1775 2022), and reported the effect of AEPC administration on wound healing in a mouse model of radiation-induced ulceration (Mori M., et al., Plastic and Reconstructive Surgery, accepted).

研究分野：再生医療

キーワード：血管内皮前駆細胞 間葉系幹細胞 脂肪幹細胞 難治性潰瘍 糖尿病合併症 放射線障害性潰瘍 糖尿病性潰瘍 脂肪組織常在性微小血管内皮前駆細胞

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性潰瘍は、糖尿病、放射線障害、血管病変などにより、血流障害から皮膚および皮下組織が虚血状態に陥り、壊死する疾患である。現行では、保存的治療や外科的治療が行われているが、いずれも姑息的であり、再発を繰り返す。健常組織であれば、損傷部辺縁の幹細胞、前駆細胞(血管内皮前駆細胞)が患部へ動員され、失った血管は速やかに新生されうるが、難治性潰瘍を呈する病的組織では、幹細胞、前駆細胞が枯渇しており、根治には、幹細胞・前駆細胞を外から補充すること(組織の肥沃化)が不可欠である。この観点から、血管新生再生医療では、骨髓や末梢血に由来する自家 EPC 投与治療の臨床研究が複数実施され、虚血改善効果が報告された。しかし、その効果は EPC 投与数に依存し、実用化には EPC の大量獲得が必要であることも報告された。また、EPC は分かっているだけで複数の臓器の血管壁にも常在していることが報告されているが、臓器から血管を採取することは困難である。こうした状況から、EPC 投与治療は、有力視されながら実用化されていない。

脂肪組織は、全身に余剰に存在し、脂肪吸引術により容易に採取可能であるため、脂肪組織由来間葉系幹細胞(adipose-derived stem cell; ASC)は、すでに再生医療の有力な次世代治療ツールとして注目されている。脂肪組織は、毛細血管網にも富み、血管内皮細胞と血管内皮前駆細胞を合わせた数は ASC と同等数ある。しかし、これまで血管内皮(前駆)細胞は、培養過程で混在する ASC に容易に駆逐されるという脆弱性から純化の方法が確立していなかった。我々は、2020年3月までの3年間の研究課題(科研費、若手研究(B)、課題番号17K17026)において、脂肪組織常在性微小血管内皮前駆細胞(adipose-resident microvascular endothelial progenitor cell; AEPC)の純化・大量培養の方法の確立に挑戦し、AEPCの大量獲得に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪組織常在性微小血管内皮前駆細胞(adipose-resident microvascular endothelial progenitor cell; AEPC)の再生医療への導入の可能性を検証する。

具体的には、(1) AEPC 調製法の改良、AEPC の細胞特性の解析に関する基礎的研究を行うとともに、(2) AEPC を用いた治療の有効性・安全性を動物実験で検証する。疾患マウスモデル(糖尿病、放射線障害)へ難治性潰瘍を作製し、AEPC 単独、および ASC との併用で局所投与を行い、創傷治癒能の改善効果を評価する。

3. 研究の方法

(1) AEPC 調製法の改良、AEPC の細胞特性の解析に関する基礎的研究

・ AEPC の調製

ヒト吸引脂肪組織を酵素処理して得られた間質血管細胞群(stromal vascular fraction; SVF)を血管内皮細胞マーカー抗体ビーズで標識し、磁気細胞分離(magnetic-activated cell sorting; MACS)と短期接着培養を繰り返す方法で AEPC の純度を段階的に上げてゆく手順で、恒久的な純化(92%以上)と長期培養を達成した。

・ AEPC 調製法の改良

SVF 調製時に吸引脂肪組織の酵素消化に適した条件(酵素等バッファー組成、およびその濃度)を検証し、AEPC の回収に有利な条件を選定した。

・ AEPC の細胞特性の解析

AEPC の特性解析は、本研究課題の前段階で一部を実施していたものの、結論を出すための n 数が不足していた。本研究課題では n 数を追加する実験を中心に実施した。具体的には、培養 AEPC (P=5) と基礎データの蓄積が多い臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cell; HUVEC、P=5)について、コロニー形成能、管腔形成能、血管内皮細胞・幹細胞マーカーによるフローサイトメトリー解析、血管内皮細胞マーカーによる細胞免疫染色の比較試験を実施した。加えて、培養 AEPC、および培養 HUVEC について、前駆細胞マーカーとして近年に他グループから報告された CD157 と CD200 の発現プロファイルをフローサイトメトリー解析で検証した。

(2) AEPC を用いた治療の有効性・安全性の検証

・ 疾患マウスモデルの作製

1 型糖尿病性難治性潰瘍マウスモデルは、免疫不全 SCID マウスの腹腔内へストレプトゾトシンを投与して薬剤誘導し、尾静脈血の血糖値測定により糖尿病を確認した。2 型糖尿病 *db/db* 難治性潰瘍マウスモデルは、単一劣性遺伝により糖尿病を自然発症するマウスであるが、念のため尾静脈血の血糖値測定により糖尿病を確認した。放射線障害性難治性潰瘍マウスモデルは、免疫不全 nude マウスの背部皮膚組織へ合計 40Gy の放射線局所照射(毎週 10Gy1 回を 4 週間)を行い作製した。

・ 創傷治癒試験

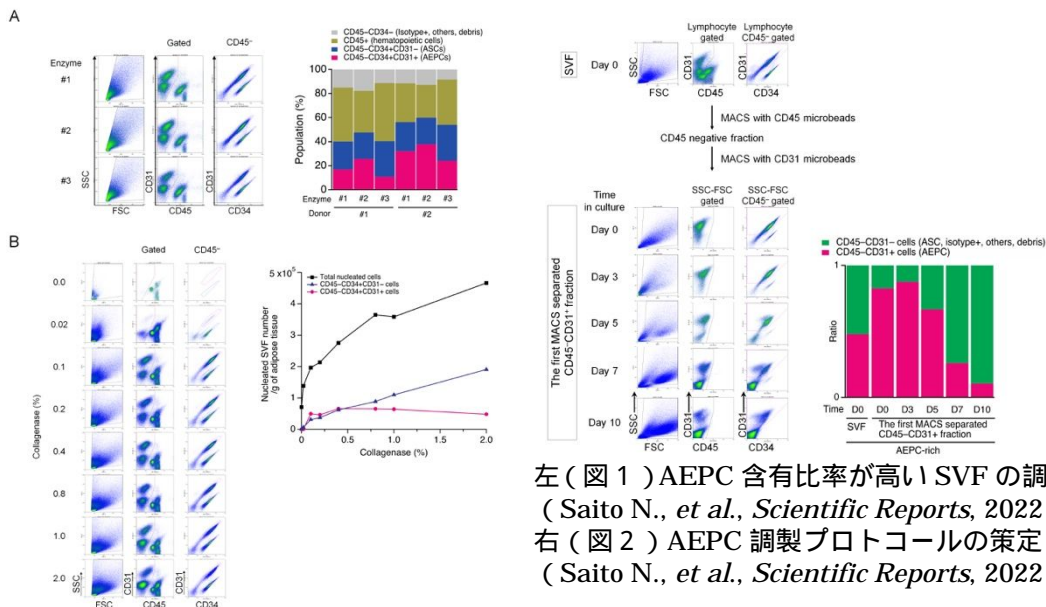
難治性潰瘍モデルマウス(1 型糖尿病誘導 SCID、2 型糖尿病 *db/db*、放射線障害 nude)の創近傍へ培養 AEPC、培養 ASC を局所皮内投与し、創傷治癒能を Vehicle 群と比較検証した。

4. 研究成果

(1) AEPC 調製法の改良、AEPC の細胞特性の解析に関する基礎的研究

・ AEPC の調製、および改良法の策定

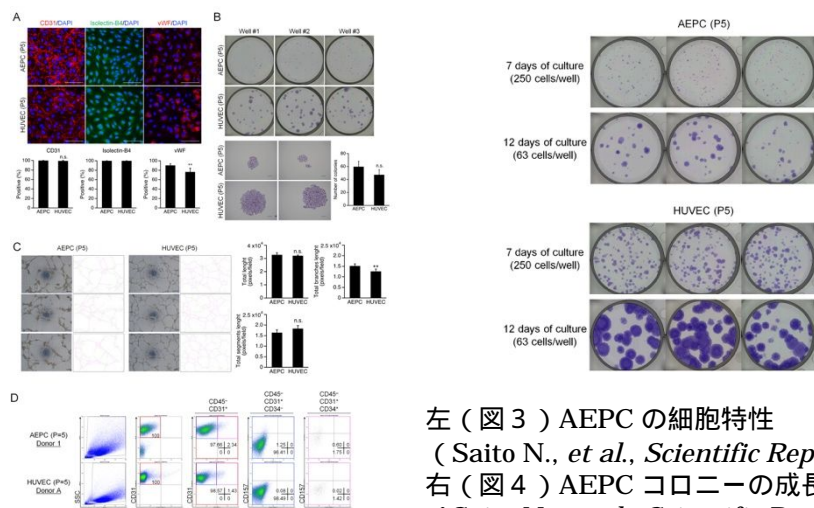
AEPC の含有比率が高い SVF を得るための酵素組成についてフローサイトメトリー解析による評価を行った。酵素反応液 (0.2%(w/v) crude collagenase, 1000 U/mL crude DNase 1, 3 mM CaCl₂, HBSS) で調製することに決定した (図 1)。また、この酵素条件で得た SVF の 1 回目 MACS 分画後の AEPC-rich (CD45-CD31+) 細胞集団を短期接着培養した後、2 回目の MACS 分画を行うタイミングが 4~4.5 日であることを確認した (図 2)。



左 (図 1) AEPC 含有比率が高い SVF の調製 (Saito N., et al., Scientific Reports, 2022) 右 (図 2) AEPC 調製プロトコルの策定 (Saito N., et al., Scientific Reports, 2022)

・ AEPC の細胞特性の解析

培養 AEPC (P=5) は、培養 HUVEC (P=5) と同等の血管内皮細胞としての性質、幹細胞性、増殖性を保持していることを確認した。細胞免疫染色により、AEPC は血管内皮マーカー CD31 陽性、vWF 陽性、IsolectinB4 結合能ありで、血管内皮細胞の発現プロファイルを示すことを確認した (図 3A)。コロニー形成能試験により、AEPC は、コロニー形成能があること (図 3B)、HUVEC よりもゆっくりとしたコロニーの成長速度であること (図 4) を確認した。管腔形成能試験により、血管内皮細胞の特性の 1 つである管腔形成能を確認した (図 3C)。血管新生能を持つヒエラルキー上位の組織常在性 EPC マーカーとして CD157 が知られており、ヒト培養 AEPC (P=5; CD45-CD31+CD34±) では、CD157+ の細胞集団 (CD157+CD200-) が 1.1~2.7% 存在し、血管新生能を持つヒエラルキー上位の EPC を含むことが示唆された (図 3D)。



左 (図 3) AEPC の細胞特性 (Saito N., et al., Scientific Reports, 2022) 右 (図 4) AEPC コロニーの成長速度 (Saito N., et al., Scientific Reports, 2022)

(2) AEPC を用いた治療の有効性・安全性を動物実験で検証

論文文化までが完了した成果としては、放射線障害性難治性潰瘍マウスモデルに対する AEPC 投与による創傷治癒能の改善効果に関する内容がアクセプトされた (Mori M., et al., Plastic and Reconstructive Surgery, accepted)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 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 and 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 脂肪由来血管内皮（前駆）細胞を含む細胞集団を含む医薬組成物	発明者 吉村浩太郎、齋藤夏美、森正徳、三木章伍	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-177798	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

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
研究分担者	吉村 浩太郎	自治医科大学・医学部・教授	
	(Yoshimura Kotaro)		
	(60210762)	(32202)	

6. 研究組織（つづき）

	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	白土 タカ子 (Shirado Takako) (50790391)		

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