

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18406

研究課題名(和文) 羊膜由来間葉系幹細胞を用いた糖尿病足病変の感染制御

研究課題名(英文) Controlling infection of diabetic foot lesions using amnion-derived mesenchymal stem cells.

研究代表者

北條 正洋 (Hojo, Masahiro)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：80866666

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)：糖尿病患者は世界的に増加傾向でありその合併症である糖尿病足潰瘍は感染を伴うことで致命的転機をきたすことも多くその対策は重要である。羊膜由来間葉系幹細胞(amnion-derived MSC, AMSC)は感染制御、神経再生促進、抗炎症作用を持ち感染性糖尿病性足潰瘍の治療に役立つ可能性がある。本研究ではAMSC培養上清が細菌増殖を抑制することが確認された。これは抗菌ペプチドLL-37の作用によると考えられる。糖尿病マウスの感染創にAMSC培養上清ゲルを塗布した結果、細菌数が減少し創傷治癒が促進されることが示された。羊膜由来間葉系幹細胞は糖尿病足病変の治療において有望な選択肢となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者数の増加に伴い、足病変合併症は深刻な医療課題となっており、本研究では、羊膜由来間葉系幹細胞(AMSC)の感染制御、抗炎症作用、創傷治癒促進作用を活かした治療法の可能性が示された。この成果は、感染症性糖尿病潰瘍の治療に新たな手法を提供することが期待される。また、LL-37は既存の抗菌薬とは違う作用機序のため、近年世界中で問題になっている薬剤耐性菌にも効果が期待できる。この治療法の実用化によって、患者の生命予後と生活の質の向上、医療費の削減にもつながるため、社会的な意義も大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：The escalating number of global diabetes cases emphasizes the need to address complications such as diabetic foot ulcers. These ulcers frequently become infected, leading to serious or even fatal outcomes. A promising therapeutic option is the use of amnion-derived mesenchymal stem cells (AMSCs), known for their infection-controlling, nerve regeneration-promoting, and anti-inflammatory properties. In our study, we found that AMSC conditioned medium could inhibit bacterial growth, possibly due to the presence of the antimicrobial peptide LL-37. When a gel made from AMSC conditioned medium was applied to infected wounds in diabetic mice, we observed a significant decrease in bacterial counts and an accelerated wound healing process. Our findings suggest that AMSCs could represent a promising therapeutic option for managing diabetic foot ulcers.

研究分野：形成外科学

キーワード：間葉系幹細胞 糖尿病 感染制御 抗菌作用 創傷治癒

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病足病変は WHO の定義により、糖尿病患者の下肢に生じる感染、潰瘍、深部組織の破壊性病変とされ<sup>1)</sup>、難治性で予後不良である。日本における糖尿病患者数は年々増加して約 316 万 6000 人にもなり、毎年約 2 万人が足潰瘍を発症しているが、こちらも増加傾向にある。

足潰瘍は細小血管障害、末梢神経障害、慢性炎症、易感染性など複雑な病態のもとに生じ、再発が多く難治性で 7~20% で下肢切断に至る。特に感染により蜂窩織炎を惹起した症例では大切断を要すことも多く、また敗血症から生命予後を損なうことも珍しくない。下肢切断後の生存率は非糖尿病患者に比べ糖尿病性患者では低く、切断例の死亡率は周術期で 1%、1 年後で 30%、3 年で 50%、5 年で 70% と報告されている<sup>1)</sup>。このため糖尿病足病変の感染制御は非常に重要な課題である。

一方、近年注目されている間葉系幹細胞は、幹細胞としての分化・増殖能に加え、パラクライン効果による免疫調整、抗炎症、抗線維化、血管新生など様々な作用があることが示されており、様々な疾患に応用すべく研究が行われている。創傷治癒が遅延する糖尿病モデルの皮膚潰瘍においても、間葉系幹細胞が創傷治癒を促進することが報告されている<sup>2)</sup>。また *in vitro* の実験では、骨髄血由来の間葉系幹細胞が黄色ブドウ球菌および大腸菌の増殖を抑制したという効果も報告されている<sup>3)</sup>。間葉系幹細胞は骨髄、脂肪、軟骨など様々な組織から樹立可能だが、近年は臍帯や羊膜など胎児由来のものが注目されている。これらの作用は間葉系幹細胞が放出する種々の生理活性物質によることが明らかになっており、これらが含まれた培養上清 (Conditioned Medium, CM) が細菌抑制作用をもつ可能性がある。また、間葉系幹細胞は低酸素環境下で生理活性物質の放出が増加することが知られている。従って、羊膜由来間葉系幹細胞 (amniotic-derived MSC, AMSC) は糖尿病足病変の感染制御にも効果を発揮でき、その作用は低酸素培養によって増強する可能性があるが、それに関する研究は殆どないのが現状である。

### 2. 研究の目的

羊膜由来間葉系幹細胞 (AMSC) の抗菌作用を明らかにし、感染性糖尿病性潰瘍モデルマウスにおける細菌抑制効果について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) AMSC の培養と培養上清の作成

AMSC を subconfluent まで培養した後に培養液を取り除き、洗浄し血清と抗生物質を除去した。これに  $\alpha$ -MEM を加え 21% もしくは 1% 酸素下で 48 時間培養した。それぞれの培養上清を 0.2  $\mu$ M のフィルターで濾過した。21% 酸素下で培養した培養上清 (SCM)、1% 酸素下の培養上清 (HCM) を作成する。また、コントロールとして  $\alpha$ -MEM を濾過したもの (CtM) を作成した。また、各培養上清中の抗菌物質である LL-37 量を ELISA で評価した。

#### (2) 培養上清の細菌抑制効果

上記の HCM、SCM、CtM をトリプティックソイ液体培地と混合した。これにトリプティックソイ液体培地で培養した細菌を加えた。37°C で 2 時間培養し、トリプティックソイ寒天培地にプレーティングした。37°C で 16~18 時間し、コロニー数を計測した。

#### (3) 糖尿病マウスの作成

オス、5 週齢の ICR マウスを 1 週間予備飼育した後に、ストレプトゾトシンを 180mg/kg 腹腔内投与し糖尿病を誘導した。投与後 4 週間で血中グルコースが 300mg/dL 以上のものを実験に用いた。

#### (4) 潰瘍作成と感染の成立

イソフルラン麻酔下にマウスの背部および腹部の体毛を除毛した。マウス皮膚を消毒し、清潔下にメスを用いて直径 8mm の皮膚全層欠損創を 2 ヶ所ずつ作成した。これに黄色ブドウ球菌を接種し、滅菌フィルムを貼付した。48 時間後に排膿、発赤の出現をもって感染成立を確認した。

#### (5) 感染性糖尿病性潰瘍への培養上清の作用

各培養上清にカルボキシメチルセルロースを混合しゲル状にして使用する。マウスを CtM ゲル、SCM ゲル、HCM ゲル塗布群の 3 群にわけた。感染成立日を day1 とし、day1, 3, 5, 7, 9 に潰瘍の写真撮影し、各ゲルを 0.05mL ずつ塗布し、滅菌フィルムを貼付した。day10 で潰瘍を採取し、PBS でホモジナイズ、ベアードパーカー寒天培地にプレーティングした。37°C、24 時間培養し、コロニー数を計測した。また、潰瘍面積を算出し、経時的変化を観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ELISA による AMSC 培養上清中の LL-37 の評価

コントロール群 (CtM) では抗菌活性物質である LL-37 は検出されなかったが、通常酸素培養群 (SCM) では LL-37 が 0.108ng/mL の濃度で見られた。また、低酸素培養群 (HCM) では 0.247 ng/mL と SCM より増加していた。AMSC は抗菌活性物質である LL-37 を放出し、低酸素環境下でその量を増加させることが示された。(図 1)

##### (2) AMSC 培養上清の細菌抑制効果

黄色ブドウ球菌に各培養上清を 2 時間作用させると、HCM はコントロールと比較して細菌数が 47.4% と増殖を抑制した。SCM も CtM の 71.4% と増殖を抑制したが、その差は HCM より小さかった。(図 2) AMSC 培養上清は *in vitro* において細菌増殖を抑制することが示された。

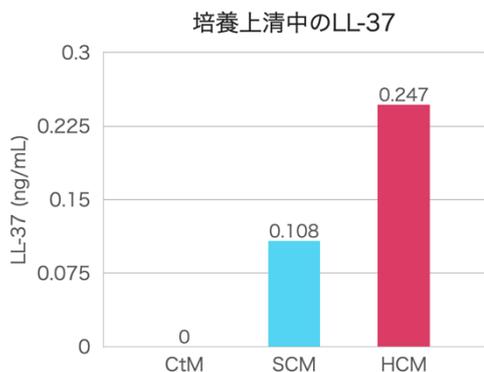


図 1 AMSC 培養上清は LL-37 を含み、低酸素環境で増加する

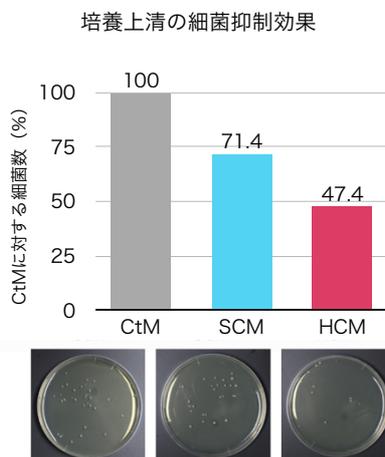


図 2 HCM は黄色ブドウ球菌の増殖を抑制する

##### (3) 感染性糖尿病性潰瘍での細菌抑制効果

糖尿病マウスの背部皮膚全層欠損に黄色ブドウ球菌を接種し感染性糖尿病性潰瘍モデルマウスを作成した。これに HCM ゲルと CtM ゲルを塗布したところ、感染 5 日目時点で HCM ゲル塗布群の潰瘍の細菌数はコントロール群の 7.55% と減少していた。(図 3)

AMSC 培養上清は *in vivo* でも細菌増殖を抑制することが示された。

##### (4) 感染性糖尿病性潰瘍での創傷治癒促進効果

上記において HCM ゲル塗布群は、潰瘍の縮小率が大きかった。(図 4) AMSC は感染創の治癒を促進することが示された。

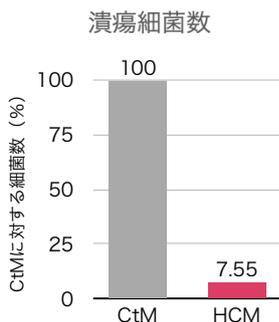


図 3 HCM は DM マウスの感染性潰瘍の細菌数を減少させる

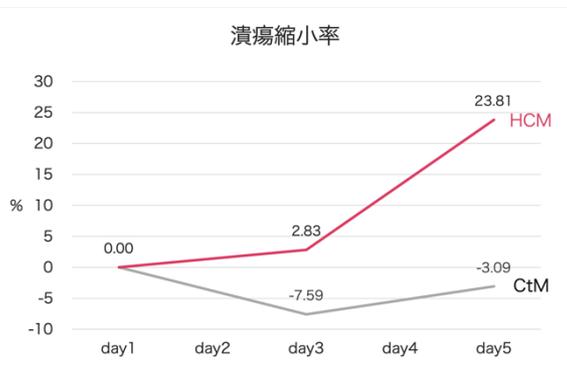


図 4 HCM は DM マウスの感染性潰瘍の治癒を促進する

- 1) IWGDF: IWGDF Guidelines on the prevention and management of diabetic foot disease. 2019.
- 2) Takahashi, H., Ohnishi, S., Yamamoto, Y., et al.: Topical Application of Conditioned Medium from Hypoxically Cultured Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes

Wound Healing in Diabetic Mice. **147**: 1342-1352, 2021.

3) Krasnodembskaya, A., Song, Y., Fang, X., et al.: Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. **28**: 2229-2238, 2010.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 北條正洋、石井陸
2. 発表標題 羊膜由来間葉系幹細胞を用いた糖尿病足病変の感染制御
3. 学会等名 第44回北大形成外科アカデミー
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------