

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09801

研究課題名(和文)末梢血由来表皮幹細胞による糖尿病性潰瘍での皮膚再生・破綻機構の解明

研究課題名(英文)Effect of peripheral blood-derived epidermal stem cells in diabetic wound repair and its underlying mechanism

研究代表者

大森 愛 (Oomiri, Ai)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：60897156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病下腿潰瘍治療の1つとして再生医療に大きな期待が寄せられている。申請者は健常ヒト末梢血液から単離した単核球(MNC)を独自開発した生体外増幅培養法を適用し、表皮幹細胞マーカー発現(MNC-EK)細胞を調整する方法を考案した。本研究では糖尿病皮膚潰瘍治療のため、創傷における表皮幹細胞の供給の機序解明を目的とする。

ヒト末梢血液より採取したMNCからMNC-EK細胞を調整し、表皮細胞へ分化誘導するとMNC-EK細胞は表皮細胞コロニーを多く形成した。このMNC-EK細胞を免疫不全糖尿病性潰瘍モデルマウスへ移植し治療効果を検証すると、移植早期から潰瘍が縮小し最終的に90%近くまで治癒を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、皮膚再生には末梢血由来細胞が関与し糖尿病患者由来末梢血液細胞から再生能力の高い細胞を培養できる方法を確立したことは、皮膚潰瘍治療における革新的皮膚再生治療法へ期待が高まった。糖尿病患者由来末梢血液に含まれる血管再生や皮膚再生に関与する細胞は健常者よりもその機能や数が著しく低下していることが報告されている。この新しい培養法の確立により、少量の末梢血液から再生機能の高い細胞を生み出すため、患者に対しても低侵襲であることから下肢救済への躍進と患者QOL向上に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：Regenerative medicine is expected to play a key role in the treatment of diabetic leg ulcers. The applicant has devised a method to prepare epidermal stem cell marker-expressing (MNC-EK) cells by applying a proprietary ex vivo expansion and culture method to mononuclear cells (MNC) isolated from the peripheral blood of healthy humans. In this study, the aim is to elucidate the mechanism of epidermal stem cell supply in wounds for the treatment of diabetic skin ulcers. When MNC-EK cells were prepared from MNC collected from human peripheral blood and induced to differentiate into epidermal cells, the MNC-EK cells formed many epidermal cell colonies. When these MNC-EK cells were transplanted into immunodeficient diabetic ulcer model mice to examine the therapeutic effect, the ulcers shrank early after transplantation, and eventually healed to nearly 90%.

研究分野：形成外科

キーワード：表皮幹細胞 糖尿病性潰瘍 創傷治癒 皮膚再生

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性潰瘍の多くは難治性であり、特に治療抵抗性のある下腿潰瘍は最終的に下肢切断に至ることが多く、下肢切断後の5年生存率は35%前後と予後不良である。既存の皮膚潰瘍治療法として、物理的刺激手段を用いる物理療法(持続陰圧閉鎖療法、熱、光線、極超短波、電気、超音波、振動など)やbFGF投与方法などがあり、これらの既存治療法に対して抵抗性のある症例は一定数存在する。皮膚潰瘍治療の一つとして再生医療に大きな期待が寄せられているが、糖尿病患者では本質的に血管幹細胞(EPC)や表皮幹細胞の機能や再生能力が低下しているという問題があるため、十分な移植治療効果を得られていない。より非侵襲であり簡便な方法で細胞移植治療ができる効果的な再生治療技術が求められている。そこで申請者は採血のみでできる自己末梢血単核球生体外増幅培養法(MNCQQc)を確立し(Masuda H et al, 2014)、少量の血液から単核球を単離し生体外で増幅培養することでEPCの数と質を向上させ更には抗炎症性マクロファージや免疫寛容、創傷治癒促進作用をもたらす細胞も含むハイブリッド型のMNCQQ細胞を誕生させた。難治性四肢潰瘍疾患に対するMNCQQ細胞移植臨床試験を実施し、その有効性と安全性を得ている(Tanaka R et al, 2022)。非臨床研究における検証ではMNCQQ細胞は血管内皮細胞の血管形成能を促進し(Tanaka R et al, 2021)、線維芽細胞の細胞遊走能を向上させることを解明した(Jiang S et al, 2022)。一方、表皮細胞/表皮幹細胞に対するMNCQQ細胞の細胞生物学的研究は未だ明らかにされていない。表皮細胞/表皮幹細胞は皮膚再生に関わる様々な細胞の中のひとつであり、これらの細胞とMNCQQ細胞の関わりを探求することで皮膚再生組織環境下にて生じている細胞間の作用機序を解明し皮膚再生の科学的根拠を証明することに繋げる。

2. 研究の目的

申請者は健常ヒト末梢血液から単離した単核球(MNC)を独自開発した生体外増幅培養法を適用することで、皮膚再生に必要な表皮幹細胞マーカー発現細胞(MNC-EK細胞)の調整及び創傷移植へ供する方法を考案した。本研究では、糖尿病性皮膚潰瘍治療のため、創傷における表皮幹細胞の供給源・再生抑制の機序解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 創傷皮膚の細胞再生ソースを解明するため parabiosis モデル(2匹の生きた動物が手術的に結合され、血液、血管、心臓などの循環系を共有するようになった状態をいう)を用いて分析を行う。正常マウスの背部 wound エリアに parabiosis した GFP マウスや Krt1-15crePR マウス由来表皮幹細胞が検出されることにより、皮膚再生過程において末梢血液が再生細胞ソースを提供することを追跡する。GFP や Krt1-15crePR マウス側が糖尿病の場合、parabiosis した wound マウスの皮膚は GFP+/K15+細胞の低下が予想される。

(2) 末梢血由来表皮幹細胞調製方法の確立。ヒト末梢血液から MNC を単離し、共培養法と生体外培養法でそれぞれ分化誘導を行い、表皮幹細胞の特性を評価する。細胞遺伝子解析では、MNC と MNC-EK 細胞の表皮幹細胞関連遺伝子やシグナル遺伝子の解析を行う。末梢血由来表皮幹細胞の機能と特性はコロニーアッセイを用いて評価する。細胞分化誘導させた後に、FACS 法を用いて、表皮幹細胞を sorting し細胞を回収する。次に、6cm の細胞培養ディッシュに回収した細胞を播種し、14 日間培養を行い、培養後表皮幹細胞のコロニー数及び面積が 7mm 以上のコロニーの割合をカウントする。末梢血由来表皮幹細胞コロニー数と各コロニー面積の増大の観察により幹細胞としての自己複製特性を解明する。特性の評価より、糖尿病患者由来の MNC を分化誘導するための培養法が確立できる。

(3) 潰瘍への細胞移植による皮膚創傷治癒効果の評価。BALB/cAJcl-nu/nu マウスへ streptozotocin (STZ) を投与することで 1 型糖尿病を作成する。その後、背部皮膚にステント潰瘍を作製して評価に用いる。MNC-EK 細胞を潰瘍の筋膜下へ移植し、移植後 0 時間、6 時間、1, 3, 7, 14 日目の皮膚潰瘍部位の面積測定と組織回収を行う。皮膚細胞再生する時期の変化を免疫染色法を用いて可視化し、糖尿病性潰瘍での皮膚細胞の局在及び局在量を検討する。

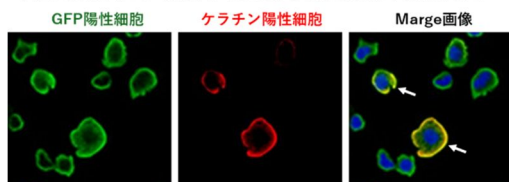
4. 研究成果

(1) 創傷皮膚の細胞再生ソースの解明

健常マウスと GFP マウスで parabiosis(パラバイオーシス)モデルを作成し、健常マウスの背部皮膚をパンチバイオプシーにてくり抜き、皮膚潰瘍モデルを作成し皮膚再生過程を観察した。皮膚再生中の組織を採取し皮膚組織解析を実施したところ、再生部位に GFP 陽性細胞が多く集積していることが観察された。更に、潰瘍部位組織をコラゲナーゼ処理により細胞をバラバラにし単離し細胞表面マーカーを測定した結果、GFP 陽性でありかつケラチン陽性の細胞を検出した(図1)。Parabiosis した GFP マウスの末梢血液由来の細胞が血液・血管を共有し健常マウスの皮膚再生に必要な細胞を供給していることが示唆された。更に、GFP マウスを糖尿病モデルに施し同様の検証を行ったところ、皮膚再生組織中の GFP 陽性細胞の集積低下を確認し、糖尿病発症に

より皮膚再生に必要な細胞機能低下や細胞供給能力が衰退したと考えられた。

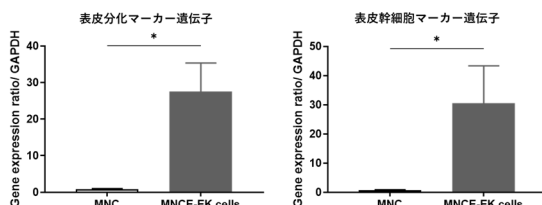
図1. 皮膚再生に供給されたGPF陽性細胞の細胞特性



(2) 末梢血由来表皮幹細胞調製方法の確立

健常者と糖尿病患者の末梢血液から MNC を単離し、MNC-EK 細胞の調整を検証した。単離した MNC を生体外増幅培養法にて培養し、その後表皮幹細胞分化誘導処理を行い MNC-EK 細胞を作成した。細胞遺伝子解析において健常者 MNC では表皮幹細胞関連遺伝子の発現は僅かに検出できるのみであり、糖尿病患者由来 MNC に至っては表皮幹細胞遺伝子や関連シグナル遺伝子の発現は極限に少なく、皮膚再生に関与する細胞の数と質が低下していることが示唆された。培養した MNC-EK 細胞を解析すると、表皮幹細胞遺伝子と表皮分化遺伝子の発現が 20 倍以上に増加し(図 2)、糖尿病患者由来 MNC-EK 細胞も同等に発現しており機能低下した MNC から健常者と同等の MNC-EK 細胞を培養することができた。また、培養期間中の細胞の遺伝子変化を経時的に解析したところ、培養日数により遺伝子発現の増減変化が見られた。このことにより、表皮幹細胞分化培養には培養日数も非常に重要であることが示唆された。次に、MNC-EK 細胞の表皮幹細胞分化能および細胞特性をコロニーアッセイで定量した。MNC からはコロニー検出がほとんど見られなかったに対し、MNC-EK 細胞では多くのコロニーが出現し、またその表皮幹細胞遺伝子発現は大幅に増加した。我々が独自開発した生体外増幅培養法は、糖尿病患者由来の細胞の質や表皮細胞分化機能を回復させる培養法であることに期待が広がった。

図2. 表皮幹細胞関連マーカーの遺伝子発現



(3) 潰瘍への細胞移植による皮膚創傷治癒効果の評価

免疫不全糖尿病性マウスに皮膚潰瘍を作成し、末梢血液から調整した MNC-EK 細胞を移植し皮膚創傷治癒効果を検証した。細胞比較として control (PBS) 群を設けた。その結果、細胞移植群では細胞移植後早期から潰瘍の縮小が観察され、14 日目の潰瘍縮小率は control 群が 20%程度に対し、MNC-EK 細胞移植群は 90%近くまで治癒を認めた。MNC-EK 細胞は健常者と糖尿病患者由来共に移植効果を検証し、糖尿病患者由来 MNC-EK 細胞は健常者の MNC-EK 細胞と同様に皮膚創傷治癒効果を認めた。更に潰瘍組織を回収し免疫染色法により皮膚再生過程を解析すると、皮膚再生が最も促進されている時期では特に潰瘍部位と皮膚再生部位の境界部において表皮幹細胞(ケラチン陽性細胞)を多く検出した。MNC-EK 細胞は皮膚再生治療効果の高い細胞であることが示唆された。

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