

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20980

研究課題名（和文）脂肪組織由来間葉系幹細胞由来順化培養液の角膜上皮創傷治癒促進メカニズムの解明

研究課題名（英文）Culture media derived from adipose-derived mesenchymal stem cells promoted human corneal epithelial cell wound healing

研究代表者

三浦 真里亜 (Miura, Maria)

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：50962552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪組織由来間葉系幹細胞順化培養液（CM-ADSCs）と多血小板血漿における生理活性物質の含有量を比較し、培養正常ヒト角膜上皮細胞創傷モデルを用いてCM-ADSCsの角膜上皮創傷治癒促進機構を探索した。CM-ADSCsは、高濃度のEGF含有による細胞増殖の促進と炎症抑制により、角膜上皮細胞創傷治癒を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪組織由来間葉系幹細胞順化培養液（CM-ADSCs）と多血小板血漿における生理活性物質の含有量を比較し、培養正常ヒト角膜上皮細胞創傷モデルを用いてCM-ADSCsの角膜上皮創傷治癒促進機構を探索した。CM-ADSCsは、高濃度のEGF含有による細胞増殖の促進と炎症抑制により、角膜上皮細胞創傷治癒を促進する可能性が示唆された。本研究からCM-ADSCsが難治性角結膜上皮障害に対して有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study determined the molecular mechanisms involved with using cultured media from adipose-derived stem cells (CM-ADSCs) for corneal epithelial cell wound healing compared to platelet-rich plasma (PRP). CM-ADSCs may promote wound healing of human corneal epithelial cells via increased cell proliferation and DNA metabolic process.

研究分野：眼科学

キーワード：間葉系幹細胞 順化培養液 難治性角結膜上皮障害 脂肪組織由来間葉系幹細胞 創傷治癒

### 1. 研究開始当初の背景

移植片対宿主病・角膜移植・シェーグレン症候群や重症ドライアイ等では、難治性の角結膜上皮障害を生じ、疼痛・視力低下・感染性角膜炎・角膜穿孔等を引き起こすことが問題となっている。この難治性角結膜上皮障害に対して、人工涙液、自己血清 (Autologous serum, AS)、さらに近年では多血小板血漿 (Platelet-rich plasma, PRP) による点眼治療が行われているが、これらの治療が奏功しない難治性角結膜上皮障害 (図 1) が依然として存在し、新規治療薬開発の必要性がある。

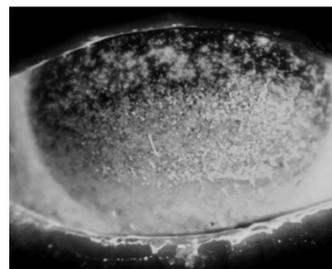


図 1 難治性角膜上皮障害

その開発アプローチとして細胞の増殖・分化・炎症の制御が考えられる。間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells, MSC) は、骨髄、脂肪、臍帯血、口腔組織等から分離された多能性細胞であり、創傷治癒に関与する多様なサイトカインや成長因子を産生・分泌する。その中でも特に、脂肪組織由来の間葉系幹細胞 (Adipose tissue-derived stem cells, ADSCs) は、パラクリングナリングによる細胞の分化や増殖の誘導や炎症の抑制作用を有する。この ADSCs は人体中に豊富に存在し、採取が容易という長所がある一方、組織への生着率の低さが原因となり期待した結果が得られない問題がある (McBride C, Cytotherapy, 2003)。

申請者はこの問題に対して、ADSCs から分泌される成長因子、サイトカイン等が含まれた上清である「順化培養液」を用いて新しい治療法を開発する。しかしながら、ADSCs 由来の順化培養液 (CM-ADSCs) の角結膜上皮障害への投与は新着想であり、実際に創傷治癒促進効果を有すのか、その作用機序は何かについては明らかになっていない。つまり、CM-ADSCs の角結膜上皮細胞に対する増殖・分化誘導や炎症制御機構を解明することが、本研究における CM-ADSC の臨床応用に向けた学術的課題である。

### 2. 研究の目的

CM-ADSCs の角結膜上皮細胞に対する創傷治癒促進効果、およびその作用機序の解明

### 3. 研究の方法

目標 1: CM-ADSCs 点眼の創傷治癒促進効果の検証

目標 2: CM-ADSCs 点眼の創傷治癒促進機構の解明

#### (1) CM-ADSCs 点眼、PRP 点眼、血清点眼の作製

CM-ADSCs は、ヒト脂肪組織由来幹細胞懸濁液 (株式会社フコク, 埼玉, 日本) を基礎培地 (ダルベッコ改変イーグル培地に 10% 濃度の fatal bovine serum, 100 U/ml Penicillin G, 100mg/ml Streptomycin を添加) を  $4 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、37°C 5%CO<sub>2</sub> の条件下で 5 日間培養する。その後、上清液を無菌フィルターで濾過し回収する。PRP は、健康人から静脈血 20mL 採取し、MyCells PRP 作製キット (Kaylight Ltd, Ramat-Hasharon, Israel) を用いて遠心分離し作製する。血清は、静脈血 20mL を採取し遠心分離し作製する。

#### (2) CM-ADSCs 点眼と PRP 点眼における成長因子の比較

(1) で作製した CM-ADSCs 点眼と PRP 点眼に含有される EGF、TGF- $\beta$ 1、VEGF、Fibronectin といった成長因子を ELISA にて定量化する。

#### (3) 培養正常ヒト角膜上皮細胞の創傷治癒促進効果の検証 (in vitro)

培養正常ヒト角膜上皮細胞 (PCS-700-010, ATCC, VA, USA) を 96well プレートに  $4 \times 10^4$  cells/well の密度で播種する。24 時間培養し 100% confluent になったところで、96-pin wound maker (Essen Bioscience, Ann Arbor, USA) にて幅 700um の均一な創傷を作成する (図 2)。その後、CM-ADSCs、PRP、血清、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を基礎培地に添加し、3 時間毎に変化を撮影する。創傷面積を ImageJ で定量化する。

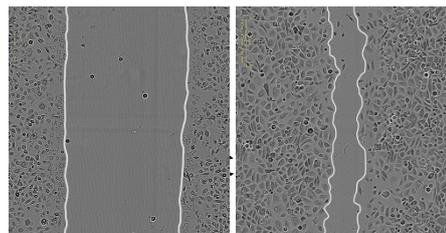


図 2 培養正常ヒト角膜上皮細胞創傷治癒モデル

#### (4) CM-ADSCs 点眼による発現変動遺伝子の解析

(2) のヒト角膜上皮細胞サンプルを採取し、RNAseq を実施し、発現変動遺伝子を特定する。さらに遺伝子オントロジー解析を駆使し、CM-ADSCs の創傷治癒メカニズムを解明する。

#### (5) CM-ADSCs 点眼による遺伝子発現変化の解析

(2)のヒト角膜上皮細胞サンプルを採取し、RNA を抽出する。増殖・分化・炎症に関与する TGF- $\beta$ 1、EGF、Fibronectin、Ki67、Caspase9、IFN- $\gamma$ 、IL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  等の発現を RT-PCR 法により定量化する。

#### 4. 研究成果

##### (1) CM-ADSCs 点眼、PRP 点眼、血清点眼の作製

CM-ADSCs は、ヒト脂肪組織由来幹細胞懸濁液(株式会社フコク, 埼玉, 日本)を基礎培地(ダルベッコ改変イーグル培地に 10%濃度の fatal bovine serum, 100 U/ml Penicillin G, 100mg/ml Streptomycin を添加)を  $4 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、37°C 5%CO<sub>2</sub> の条件下で 5 日間培養した。その後、上清液を無菌フィルターで濾過し回収した。PRP は、健康人から静脈血 20mL 採取し、MyCells PRP 作製キット (Kaylight Ltd, Ramat-Hasharon, Israel) を用いて遠心分離し作製した。血清は、静脈血 20mL を採取し遠心分離し作製した。

##### (2) CM-ADSCs 点眼と PRP 点眼における成長因子の比較

(1)で作製した CM-ADSCs 点眼と PRP 点眼に含有される EGF、TGF- $\beta$ 1、VEGF、Fibronectin といった成長因子を ELISA にて定量化した(図 3)。CM-ADSCs は PRP と比較して、EGF、VEGF の有意な増加、TGF- $\beta$ 1、Fibronectin の有意な減少が明らかになった。

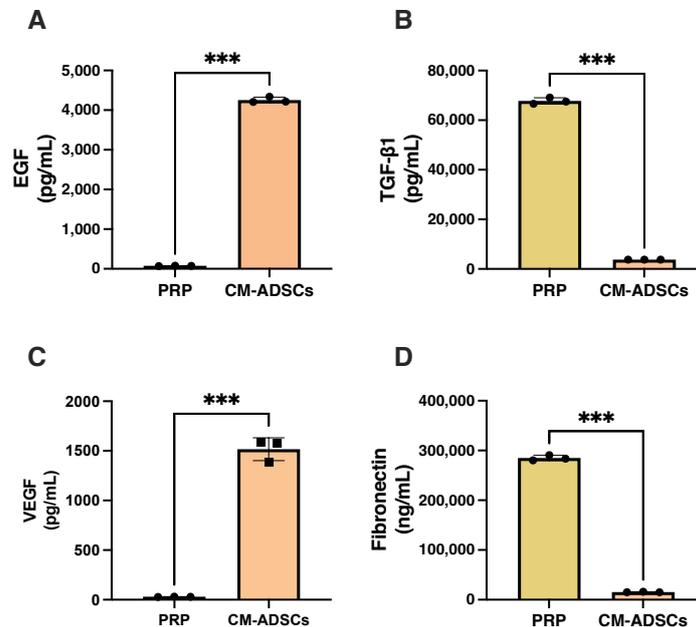


図 3 CM-ADSCs 点眼と PRP 点眼における成長因子の比較

##### (3) 培養ヒト角膜上皮細胞の創傷治癒促進効果の検証 (in vitro)

培養正常ヒト角膜上皮細胞 (PCS-700-010, ATCC, VA, USA) を 96well プレートに  $4 \times 10^4$  cells/well の密度で播種し、24 時間培養し 100%confluent になったところで、96-pin wound maker (Essen Bioscience, Ann Arbor, USA) にて幅 700 $\mu$ m の均一な創傷を作成した。その後、CM-ADSCs、PRP、血清、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を基礎培地に添加し、3 時間毎に変化を撮影し創傷面積を ImageJ で定量化した。PRP と比較して、CM-ADSCs の有意な創傷治

癒促進効果が明らかとなった(図 4)。

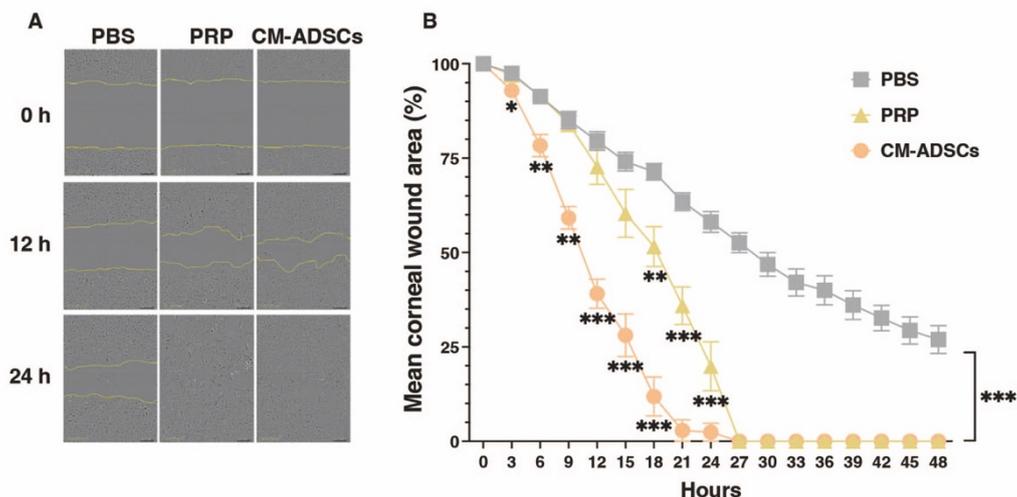


図 4 CM-ADSCs による培養正常ヒト角膜上皮細胞の創傷治癒の促進

(4) ADSCs 由来順化培養液点眼による遺伝子発現変化の解析

(2)のヒト角膜上皮細胞サンプルを採取し、RNAseq を実施し、発現変動遺伝子解析(図 5)ならびに遺伝子オントロジー解析を実施した。CM-ADSCs 点眼は PRP 点眼と比較して、2,920 の変動発現遺伝子を特定した。そのうち 1,503 遺伝子の発現の上昇と、1,417 遺伝子の発現の低下を認めた。

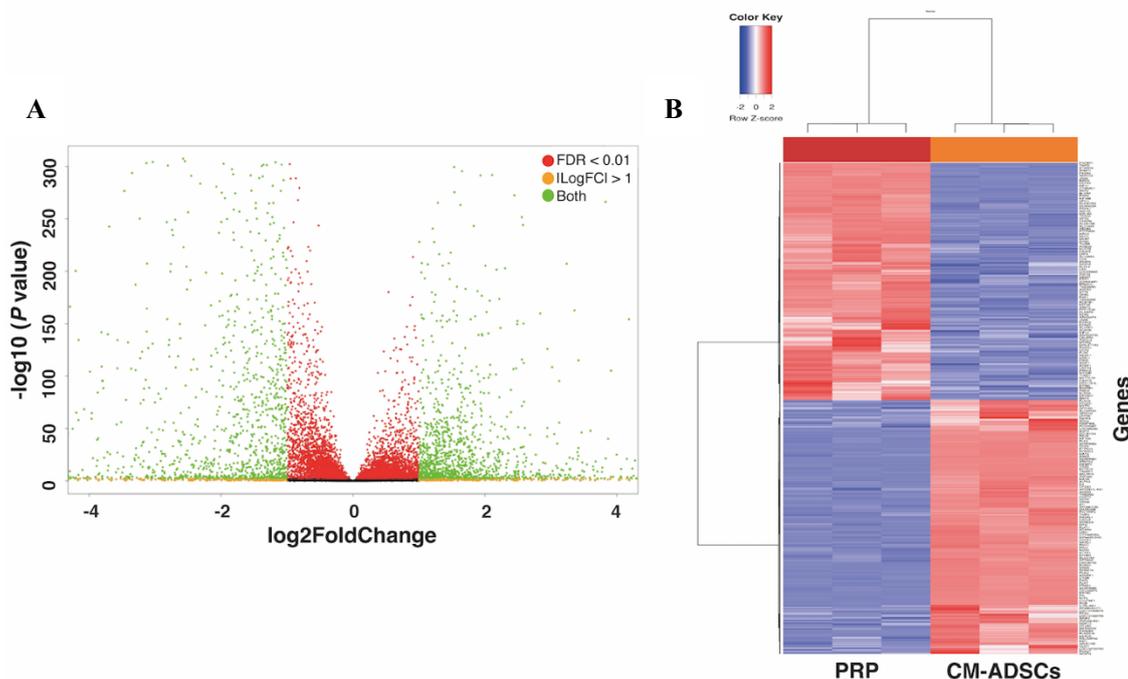


図 5. CM-ADSCs 投与によるは発現変動遺伝子の変化

(5) CM-ADSCs 点眼による遺伝子発現変化の解析

(2)の培養正常ヒト角膜上皮細胞創傷治癒モデルを用いて創傷作成後 12 時間後のサンプルを採取し、RNA を抽出した。増殖・分化・炎症に関与する EGF、TGF-β1、Fibronectin、Ki67、Caspase9、IFN-γ、IL1β、TNFα 等の発現を RT-PCR 法により定量化した(図 6)。

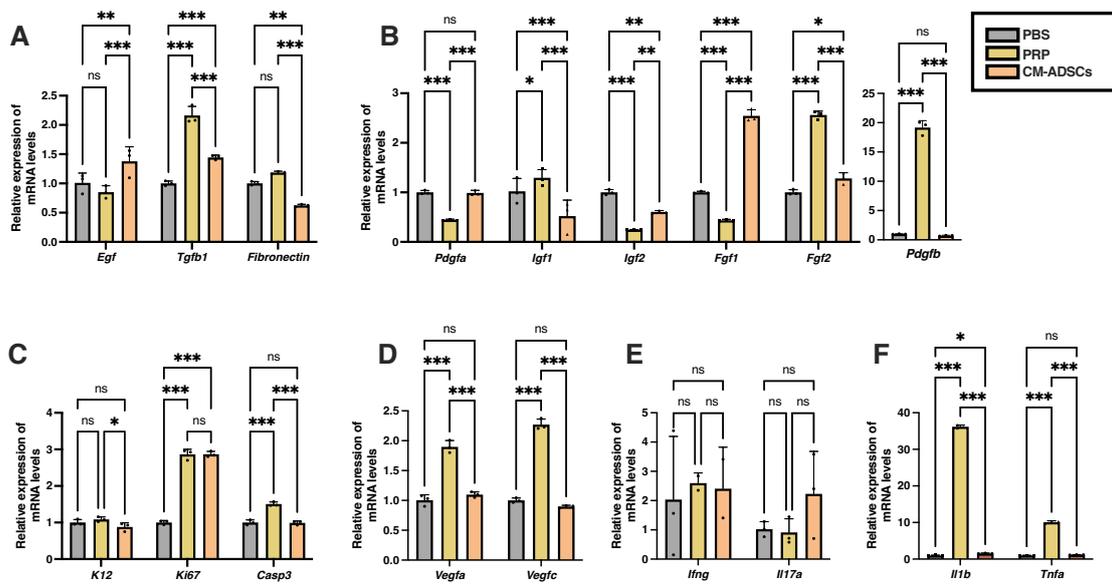


図 6. CM-ADSCs 投与による遺伝子発現の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Watanabe M, Okumura Y, Inomata T, Miura M, Fujimoto K, Hirokawa K, Nagino K, Morooka Y, Hara F, Yee A, Nakao S
2. 発表標題 Corneal epithelial wound healing promotion pathways on cultured media from adipose derived stem cells
3. 学会等名 16th Joint Meeting of Korea-China-Japan Ophthalmologists (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥村雄一, 廣澤邦彦, Yee Alan, 三浦真里亜, Shokirova Hurrarnhon, 藤本啓一, 藤尾謙大, 赤崎安序, 黄天翔, 猪俣武範
2. 発表標題 脂肪組織由来間葉系幹細胞順化培養液の炎症・血管新生抑制分子の発現
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥村雄一, 廣澤邦彦, Yee Alan, 三浦真里亜, Shokirova Hurrarnhon, 藤本啓一, 藤尾謙大, 赤崎安序, 黄天翔, 猪俣武範
2. 発表標題 脂肪組織由来間葉系幹細胞順化培養液の正常ヒト角膜上皮細胞に対する創傷治癒効果
3. 学会等名 角膜カンファランス2023
4. 発表年 2023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
---------	---------