

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592655

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞の有する創傷治癒促進と瘢痕減弱効果の機序解析

研究課題名(英文) The mechanism of adipose-derived stem cells on wound healing and less scarring

研究代表者

水野 博司 (MIZUNO, HIROSHI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80343606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来幹細胞(Adipose-derived Stem Cells、以下ASCs)には組織再生能だけでなく創傷治癒過程を促進し、かつ残存する瘢痕も極めて軽微なものとなることがこれまでの先行研究において知られていたが詳細なメカニズムに関しては不明であった。本研究では糖尿病ラット背部皮膚欠損創にASCsを局所投与し、創傷治癒速度、血管新生効果、筋線維芽細胞、線維芽細胞のアポトーシス誘導を調べた。その結果ASCs投与群は非投与群と比べて肉芽組織の増生、毛細血管数の増加だけでなく、比較的早期に筋線維芽細胞、線維芽細胞のアポトーシスが誘導され、これにより瘢痕減弱効果が得られるものと示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previous researches have demonstrated that adipose-derived stem cells (ASCs) possess the potential for not only tissue regeneration but also acceleration of wound healing with less scarring. However, the mechanisms of scar reduction remain still elusive. Therefore, we investigated the detail mechanism including angiogenesis and apoptotic effect of myofibroblasts/fibroblasts using murine diabetic wound model. Results showed that epithelization rates, capillary density and the indices of myofibroblast apoptosis, and fibroblast apoptosis were all higher in ASCs group than in the control group mainly within 2 weeks after injury. These findings suggest that ASCs accelerate skin wound healing at the same time as inducing apoptosis of both myofibroblasts and fibroblasts, thereby reducing scar formation in a diabetic murine model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：再生医学 幹細胞 創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループはヒトおよびマウス皮下脂肪組織中に多分化能を有する間葉系幹細胞が存在することを2001年に世界で初めて証明し、この幹細胞は後に脂肪組織幹細胞(Adipose-derived Stem Cells、以下ASCs)と称されるようになった。そしてASCsはこれまでの我々の研究においても脂肪組織、軟骨組織、骨組織、骨髄組織、肉芽組織、歯周組織、神経細胞、心筋細胞の再生が可能であることがわかっており、自己由来の細胞を用いる限り生命倫理に抵触する可能性が殆どなく、免疫拒絶の問題もない上一度に多くの細胞が獲得でき、ドナーの犠牲も最小限にできるという点で、再生医療における重要な細胞源のひとつとして広く認識されている。

このASCsは近年、組織再生だけでなく、各種の障害を受けた組織や臓器の修復を図る目的として、細胞治療の材料として応用する動きが散見され始めている。実験的には糖尿病性潰瘍治療に対する有効性や皮弁虚血再還流障害の改善、臨床においても難治性瘻孔の閉鎖治療や乳癌放射線治療後の難治性潰瘍治療に応用され始めている。この際、創傷治癒が著しく促進するばかりでなく治癒後に生じる癒痕は極めて軽微なものとなっていることが過去の我々の先行研究によって示されている。(図1)

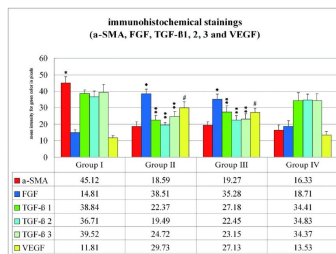


図1 急性皮膚潰瘍モデルにおけるASCs投与の効果(Group II)。a-SMAの発現がコントロール群(Group I)に比べて著しく減少している。(Uysal AC et al. Advances in Wound Care submitted より引用)

しかしながら、最適な創傷治癒を達成するための至適細胞数、創傷治癒促進や癒痕抑制の機序に関しては不明のままであり、これらを明らかにすることは、ASCsを用いた創傷治癒治療に対するより一層効果的な細胞治療を実践するうえで不可欠であるとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究においては、臨床的にその可能性が示唆されつつある、ASCsの有する難治性創

傷治癒促進効果および癒痕減弱効果に関する機序を明らかにするため、創傷治癒遅延モデル動物に作成した皮膚難治性潰瘍にASCsを局所投与した際の、局所における様々な増殖因子の発現と、特に創傷治癒過程に出現する線維芽細胞や筋線維芽細胞の増殖やアポトーシスの関連性について、肉眼的、組織学的、免疫組織学的に調査し、ASCsが創傷治癒の過程において周辺環境にどのような影響を及ぼしているかを探索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験モデルの作成と至適移植細胞数の探索

ストレプトゾトシンによって糖尿病を誘発されたFisher344ラット(10週齢、雄)の鼠頸部脂肪組織より既に確立されたプロトコールに従って、コラゲナーゼ処理し得られたASCsを基本培地(DMEM+10%FBS)で継代培養し、第3継代ASCsを実験に供することとした。

必要な細胞数が得られて時点で別のストレプトゾトシン誘発糖尿病Fisher344ラット(10週齢、雄)に対し、全身麻酔下で背部に直径1.5cmの皮膚全層欠損創を作成後、下記に示す4つのグループに分けて、準備したASCsに対してDiI蛍光色素で標識したのちに潰瘍周辺および潰瘍底に出来る限り均一に注入移植した。

- グループ : ASCs  $1 \times 10^5 / 1 \text{ccPBS}$
- グループ : ASCs  $1 \times 10^6 / 1 \text{ccPBS}$
- グループ : ASCs  $1 \times 10^7 / 1 \text{ccPBS}$
- グループ : 1ccPBSのみ (各群 n=20)

移植後は創部をフィルムドレッシング材で被覆した。その後隔日で潰瘍面の状態を肉眼的に評価するべく継続的に写真撮影を実施した。

### (2) 組織学的、免疫組織学的観察および細胞アポトーシスの観察

潰瘍作成後4日目、7日目、10日目、14日目、28日目に、潰瘍の中心部を含めるように皮膚検体を採取してHE標本を作製した。次に上記と同じ実験モデルの標本を採取し、以下に示す評価を実施した。

- CD31免疫染色による血管密度の測定
- Ki67免疫染色による細胞増殖の評価
- Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL)染色と抗 $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA)による、筋線維芽細胞のアポトーシスに関する評価
- TUNEL染色と抗Vimentinによる二重染色による、線維芽細胞のアポトーシスに関する評価。

#### 4. 研究成果

(1) 創傷治癒に対する至適細胞数  
ASCs を投与した群(グループ ~ )においては細胞数の違いに関わらずコントロール群(グループ )と比較して、潰瘍作成後4日目から10日目にかけて潰瘍面積の縮小が速いことが示されたが、最終的に完全上皮化に至った日数には大きな違いは認められなかった。また投与細胞数の違いによる創傷治癒速度の差異をみるためグループ から を比較したところ、有意な違いは認めることが出来なかった。HE 染色標本を用いた組織学的検索においては、ASCs 投与群(グループ ~ )において肉芽組織の増生と新生毛細血管の増加が認められた。

#### (2) 各特殊染色による細胞動態の観察

抗 CD31 抗体陽性細胞はコントロール群(グループ )に比べて ASCs 投与群(グループ ~ )において有意に陽性細胞数が多かったものの、グループ ~ の間では明らかな有意差を認めなかった。(図2)

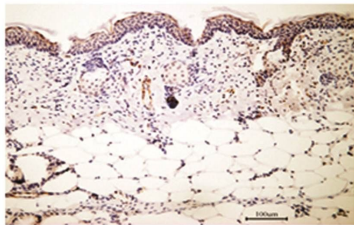


図2 グループ II における細胞投与後 10 日目の CD31 免疫染色像

Ki67 染色像においても CD31 同様、ASCs 投与群(グループ ~ )ではコントロール群(グループ )と比較して陽性細胞の割合が多かったものの、グループ ~ 群間には有意な違いは認められなかった。(図3)

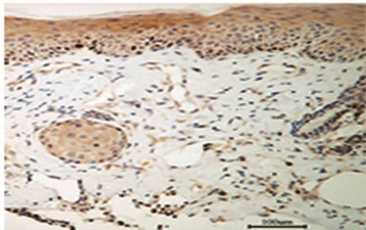


図3 グループ II における細胞投与後 7 日目の Ki67 免疫染色像

各グループにおいて TUNEL+/α-SMA+細胞が真皮内に散見されたが、ASCs 投与群(グループ ~ )においてその数はコントロール群(グループ )より多く、主に投与後 7

日目~14日目にかけて出現し、比較的早い段階で筋線維芽細胞のアポトーシスが誘導されることが分かった。(図4)

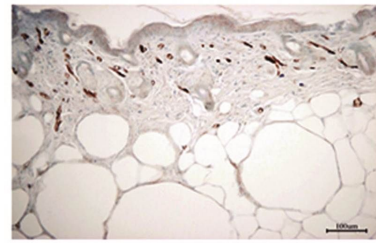


図4 グループ III における細胞投与後 10 日目の TUNEL+/α-SMA+細胞像

TUNEL+/Vimentin+細胞は ASCs 投与群(グループ ~ )において主に投与後 4 日目以降に出現したものの、投与後 10 日目においてのみコントロール群(グループ )と比較して有意差をもって増加を認めたが、それ以外の時期においては有意な差は認められなかった。(図5)

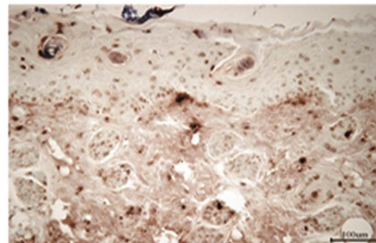


図5 グループ II における細胞投与後 7 日目の TUNEL+/Vimentin+細胞像

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

水野博司、再生医療の実用化について、日本下肢救済・足病学会誌、6: 42-48, 2014、査読有

Mizuno H Adipose-derived stem cells for regenerative medicine in the field of plastic and reconstructive surgery J Oral Biosci 55: 132-136, 2013、査読有  
Wang Y, Orbay H, Huang CY, Tobita M, Hyakusoku H, Miyamoto M, Tabata Y and Mizuno H Preclinical efficacy of slow-release bFGF in ischemia-reperfusion injury in a dorsal island skin flap model J Reconstr Microsurg 29: 341-346, 2013、査読有

Tobita M and Mizuno H Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma: The key to functional periodontal tissue

engineering Curr Stem Cell Res Ther 8: 400-406, 2013、査読有  
水野博司、田中里佳、幹細胞と増殖因子の臨床応用、形成外科 55: 1091-1097, 2012、査読有  
水野博司、脂肪注入と脂肪組織由来幹細胞、日美外報 34: 75-79, 2012、査読有  
Mizuno H, Tobita M and Uysal AC Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine Stem Cells 30: 804-810, 2012、査読有  
水野博司、幹細胞、細胞増殖因子の創傷治療への応用、医学のあゆみ 237: 17-20, 2011、査読有  
Tobita M, Orbay H and Mizuno H Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives Discov Med 11: 160-170, 2011、査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

飛田護邦、石原久子、大下高志、田島聖士、田畑泰彦、水野博司、脂肪組織幹細胞と徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子混合移植による創傷治療及び血管新生効果、第22回日本形成外科学会基礎学術集会(2013年11月7, 8日、新潟)

Mizuno H Regenerative Medicine with adipose-derived stem cells: updates and perspectives 11<sup>th</sup> Meeting of Northern Cyprus Turkish Societh of Plastic and Reconstructive Surgery (2013年9月13, 14日、Girne, Cyprus)

Ishihara H, Orbay H, Tobita M, Hyakusoku H and Mizuno H Therapeutic application of adipose-derived stem cells for avascular tissue repair and maintenance The 17<sup>th</sup> international congress of the international confederation for plastic, reconstructive and aesthetic surgery (2013年2月24日～3月1日、Santiago, Chile)

水野博司、再生医療の実用化について、第2回マゴットセラピー研究会(2013年2月10日、横浜)

水野博司、形成外科における再生医療、第60回日本形成外科学会中部支部東海地方会(2012年10月20日、名古屋)

Mizuno H, Tanaka R, Matsumoto S, Orbay H, Hyakusoku H, Miyamoto M and Tabata Y Therapeutic strategies for wound healing by regenerative medicine 4<sup>th</sup> Congress of the World Union of Wound Healing Societies(2012年9月2～6日、横浜)

水野博司、脂肪組織由来幹細胞による組織再生と創傷治療、第48回静岡手の外科・マイクロサージャリー研究会(2011年11月26日、三島)

Mizuno H Various applications of adipose-derived stem cells for tissue repair and maintenance The 69<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of Korean Society of Plastic and Reconstructive Surgeons (2011年11月11～13日、Seoul, Korea)

Mizuno H Therapeutic application of adipose-derived stem cells for tissue repair and maintenance The 21<sup>th</sup> Japan-China Joint Congress on Plastic Surgery (2011年11月3, 4日、福岡)

水野博司、形成外科領域における脂肪組織由来幹細胞を用いた再生医学の現状、第53回歯科基礎医学会学術大会・総会(2011年9月30日～10月1日、岐阜)

Mizuno H Adipose-derived stem cells for skin regeneration 2<sup>nd</sup> Lübeck Regenerative Medicine Symposium (2011年6月27, 28日、Lübeck, Germany)

〔図書〕(計 3 件)

Mizuno H, Tobita M, Orbay H, Uysal AC and Lu F (分担) Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine 「Stem Cells and Cancer Stem Cells」 Editor: Hayat MA Springer, New York, NY in press

Mizuno H and Hyakusoku H (分担) Fat grafting to the breast and adipose-derived stem cells 「Stem Cells with Fat Transfer in Aesthetic procedures: Science, Art and Clinical Techniques」 Editors: Shiffman MA, Giuseppe AD and Bassetto F Springer, New York, NY in press

水野博司、(分担)創傷治療における再生医療「創傷のすべて」、監修：市岡 滋、編集：安部正敏、寺師浩人、溝上祐子 2012: pp330-332 克誠堂出版

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/keisei\\_geka/](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/keisei_geka/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 博司 (MIZUNO, Hiroshi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80343606

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

古元 将和 (KOMOTO, Masakazu)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：20459126