

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463080

研究課題名(和文) 骨髄幹細胞由来培養細胞上清を用いた放射線性皮膚炎治療法の研究

研究課題名(英文) A study of the radiation-induced dermatitis therapy using serum-free conditioned medium derived from human bone marrow mesenchymal stem cells

研究代表者

西川 雅也(Nishikawa, Masaya)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10635593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌治療において放射線性皮膚炎は、重篤な副作用の一つである。近年、ヒト由来骨髄間葉系幹細胞培養上清は多くの組織修復に關する成長因子を含有することが報告されている。本研究では、放射線性皮膚炎に対する治療のために、ヒト由来骨髄間葉系幹細胞培養上清の有効性を評価した。放射線性皮膚炎モデルを作成し、これに各種条件(皮下注射、塗布、経静脈投与)で培養上清を投与して、実際の治療を行った。しかし、その結果は仮説とは異なり、治療効果は明らかではなかった。

研究成果の概要(英文)：Radiation-induced dermatitis is one of the serious side effects in head and neck cancer treatment.

Recently, serum-free conditioned medium derived from human bone marrow mesenchymal stem cells (MSC-CM) are reported to express a variety of growth factors relation with tissue repair. In this study, we evaluated the efficacy of MSC-CM for the treatment of radiation-induced dermatitis. To make model of radiation-induced dermatitis, rats were irradiated. And MSC-CM was gave various administration methods (subcutaneous injection, application, intravenous administration) to rats for treatment to radiation-induced dermatitis. However, as for the results, the efficacy of MSC-CM was not clear unlike a hypothesis.

研究分野：口腔外科

キーワード：放射線性皮膚炎 培養上清

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌患者における治療法として、手術による根治治療の他に化学療法や放射線治療、さらにそれらを組み合わせた治療法が一般的に選択される。

このうちの放射線治療を行う際には種々の副作用が出てくることが知られており、その一つが放射線性皮膚障害である。

放射線性皮膚障害が引き起こす影響としては、放射線治療の中断や、照射領域の皮膚の感染や治癒不全などが挙げられる。特に放射線治療の中断は、予後に影響すると考えられ重大な問題である。

頭頸部領域の癌患者では、放射線治療単独で行われる場合は少なく、化学療法が併用される場合が多い。治療における相乗効果を狙ったものであるが、副作用も増強されているのが現状である。また、全身の皮膚の中でも頭頸部領域の皮膚は放射線の影響を受けやすいといわれている。これらの事象は、頭頸部癌で放射線治療を受ける患者の QOL や治療効果に多大な影響を与える。

さらに放射線治療終了後においても、皮膚の萎縮や色素沈着、皮下硬結等の障害は永続的であり、場合によっては皮膚移植等の治療が行われることもある。

放射線治療中に発生する皮膚炎に対しては、スキンケアを行うことで、その影響を減弱することが可能であるといわれている。しかし、実際には、放射線治療の進行に伴って、皮膚の焼灼感や疼痛、びらんや表皮剥離などが発生し、スキンケアを行うこと自体が困難となる。これらの症状に対しては、現状では状況に応じて対症療法がおこなわれており、有効な治療法が確立されておらず、問題であると考えられる。

## 2. 研究の目的

近年、失われた体の組織や臓器を、自らの細胞や増殖因子などを用いて、再生させる再生医療の研究が盛んである。再生医療は、細胞、担体、増殖因子を用い組織再生を行う(ティッシュエンジニアリング)。これまで申請者の研究室では、ティッシュエンジニアリング的手法を用いて皮膚、骨、歯根膜、口腔粘膜など様々な組織再生を試み臨床の有効性を報告してきた。

ティッシュエンジニアリングは従来の治療法と異なり、患者由来の細胞を用いるため、免疫原性がなく安全という利点があったが、採取する患者の負担が大きいこと、幹細胞の分化、増殖能が分裂回数を重ねることで減弱すること、また移植した細胞の腫瘍化などの問題点があった。そこで最近、骨髄幹細胞由来培養細胞上清を用いた再生医療の研究を行っている。骨髄幹細胞由来培養細胞上清は多くの組織修復に関与する成長因子を含有すること、細胞移植と比較し費用、時間、安全性から患者負担が軽減されるという利点がある。皮膚の創傷治癒に関する研究にて、

間葉系幹細胞と同様、その培養上清は VEGF、HGF、IGF、PDGF、TGF  $\beta$  など多くの成長因子を有し、新たなコラーゲンの形成、上皮の肥厚化、抗酸化作用に効果を示し、皮膚の創傷治癒に有効に作用することを明らかにした<sup>1)</sup>。

そこで本研究は、再生医療技術を土台として、培養細胞上清が皮膚炎に与える影響を解明し、放射線性皮膚炎の効果的な治療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト由来骨髄間葉系幹細胞培養上清に含まれる生理活性物質の計測

遺伝子解析実験として、細胞株として確立され、販売されているヒト由来の骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、その培養上清を回収、そこに含まれる生理活性物質をサイトカインアレイにて同定し、さらに ELISA 法にて定量した。

(2) 培養上清成分の安全性の検討

放射線治療が行われる際は、担癌状態であることが考えられる。このため、培養上清成分が腫瘍細胞の増殖を促進しないことが重要である。これより、腫瘍細胞株を培養し、培地に培養上清を添加した群と添加していない群を設定。その増殖速度を比較検討した。

(3) 放射線性皮膚炎ラットの作製

管電圧 115KV、管電圧 20mA の条件で、ラットの大腿部に、総線量 30Gy (1.4Gy/min) の照射を行ったラットを、放射線性皮膚炎モデルとした。

(4) 放射線性皮膚炎ラットへのヒト由来骨髄間葉系幹細胞培養上清皮下注射による治療効果の検討

放射線照射し作成した放射線性皮膚炎ラットに対して培養上清を皮下注射した群と、対象群としてリン酸バッファーを皮下注射した群を用いて比較を行った。

照射後より経時的に Skin injury score の計測を行った。

また、照射後 1 日、12 日、56 日で実験動物を屠殺し、組織を採取し試料の作製を行った。試料は放射線照射した部位の皮膚であり、組織標本の作製とタンパクの質抽出を行った。

組織標本はヘマトキシリン エオジン (H-E) 染色を行い評価した。また免疫染色にてグランザイム B の発現を評価した。抽出したタンパク質は SDS-PAGE にて電気泳動し解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) ヒト由来骨髄間葉系幹細胞培養上清に含まれる生理活性物質

ヒト由来骨髄間葉系幹細胞培養上清に対してサイトカインアレイを行ったところ、26

種類のサイトカインが検出された。

これを ELISA 法にて定量したところ、VEGF、HGF、IGF-1、TGF- $\beta$ 1 などが高濃度に含有されていた。

### (2) 培養上清成分の安全性の検討

培地に培養上清を添加した群と添加していない群では、腫瘍細胞の増殖能に変化は認められなかった。この結果から、培養上清成分は腫瘍細胞に対して異常増殖を促す効果はないことが明らかになった。

### (3) 放射線性皮膚炎ラットへのヒト由来骨髄間葉系幹細胞培養上清皮下注射による治療効果の検討

作製した放射線性皮膚炎モデル(図 1-A)において、臨床的な放射線性皮膚炎の治癒を見る Skin injury score を計測したところ、両群において治癒の速度に違いは認められなかった(図 1-B)。

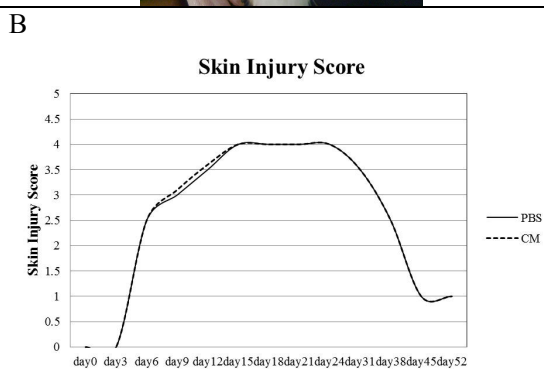
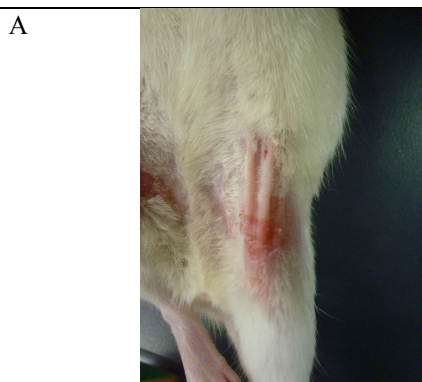


図 1-A  
放射線性皮膚炎モデル  
放射線照射 6 日後のラット大腿部。皮膚面に発赤が認められる。

図 1-B  
Skin injury score  
培養上清を皮下注射した群 (CM) と、対象群としてリン酸バッファー (PBS) を皮下注射した群で、Skin injury score に有意な差は認められなかった。

組織学的評価としてヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を行い、評価を行ったところ、既存の報告どおり上皮組織の肥厚が認められ、また、間質組織は結合組織が増加している像が認められた。さらに、トルイジンブ

ルー染色にて肥満細胞が増加していることが明らかになった。

しかし培養上清投与群と対照群とでは組織学的な違いは認められなかった。正常な皮膚組織と放射線照射 56 日後の皮膚の H-E 画像を以下に示す (図 2)。

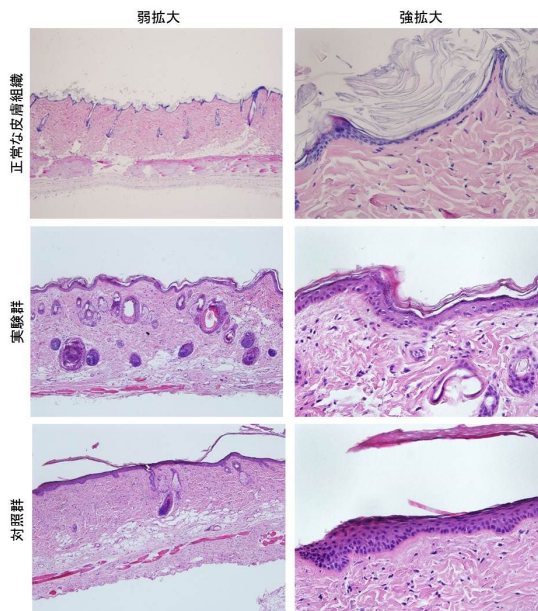


図 2 : H-E 染色像  
H-E 染色にて検討した結果、実験群、対象群ともに上皮組織の肥厚が認められ、正常な皮膚組織と比較し放射線性皮膚炎による組織学的変化が認められた。

タンパク質を抽出し、SDS-PAGE にて電気泳動を行ったところ、タンパク質の発現に大きな違いは認められなかった。

また、ウェスタンブロッティングにてコラーゲンタイプ I の発現量を比較したところ、両群に違いは認められなかった。

これより皮下注射による培養上清の投与では、研究開始前の仮説とは異なり、放射線性皮膚炎への治療効果は認められないという結論となった。

これに対して培養上清の投与方法が問題と考え、新たに、放射線性粘膜表皮への塗布、経静脈的投与の 2 つの方法を用いて、同様の方法で実験を行い、治療効果の判定を行った。

しかし、これらの方法を用いても放射線性皮膚炎への治療効果は認められなかった。

さらに、ヒト由来骨髄間葉系幹細胞培養上清ではなく、歯髄幹細胞培養上清を作製し、同様の実験を行ったが、こちらも放射線性皮膚炎への治療効果は認められなかった。

### (4) 放射線性皮膚炎の病理組織学的解析

本研究では、仮説とは異なりヒト由来骨髄間葉系幹細胞培養上清による放射線性皮膚炎への治療効果は認められなかった。このこ

とから、放射線性皮膚炎の病態解明を行うべく以下の検討を行った。

放射線照射の効果には、細胞内の主に水に作用することにより遊離基 (free radical) を発生させ、これが DNA を損傷する間接作用がある。しかしながら、これらは生体組織内に活性酸素を生じ、線維化を促進することが明らかにされている。そのため、放射線照射による皮膚組織の線維化を調べるために、近年報告された線維化のマーカーである xylosyltransferase-1 免疫染色を行ったところ陰性であった。

さらに、組織の線維化には、組織内に含まれるタンパク質の中で糖鎖構造を持つプロテオグリカンが増加するという報告がある。このため、クロマトグラフィー法にてプロテオグリカン量を定量したところ、放射線照射された皮膚は、プロテオグリカンの量が増加していないことが明らかになった (図 3)。

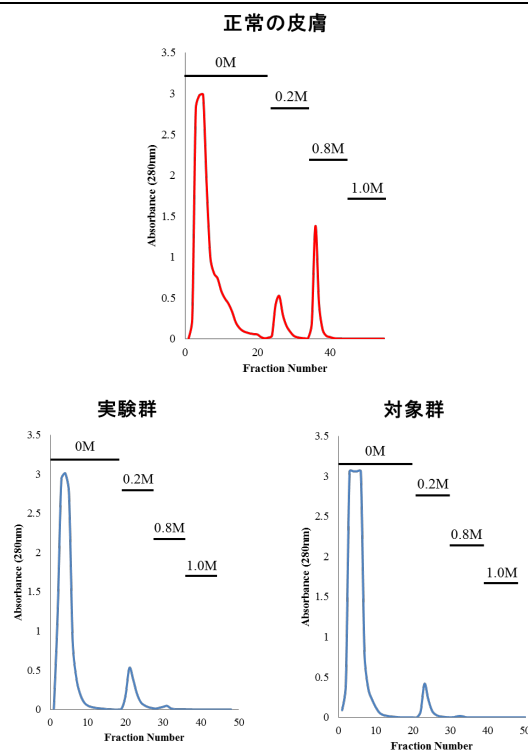


図 3 : 放射線治療 56 日後のクロマトグラフィー法によるプロテオグリカン量の定量  
正常な皮膚では 0.8M の領域にプロテオグリカンを示すピークが認められるが、放射線治療を行った群では、実験群・対象群ともにピークの消失が認められた。

そこで、プロテオグリカンの糖鎖をアミノ酸に付与する Chondroitin 4-O-sulfotransferase 1 と Chondroitin 6-sulfotransferase-1 の免疫染色を行ったところ、ともに陰性であった。

#### (5) まとめ

本研究期間では、当初計画のヒト由来骨髄間葉系幹細胞培養上清による放射線性皮膚

炎の治療効果は認められなかった。しかし、培養上清成分には抗炎症作用を有するタンパク質が含まれていることが報告されている。今後、これらのタンパク質を応用することにより、放射線性皮膚炎の治療法を探索することは有意義であると考えられた。

また、本研究では、治療効果判定を臨床所見の分類のみで行っており、その判定の信用性にかける点があったため、放射線性皮膚炎の分子マーカーの探索を行うこととし、放射線性皮膚炎発症のメカニズムの検討を行った。

放射線性皮膚炎の治療効果判定が困難ある原因は、放射線性皮膚炎の分子マーカーがないことであると考えられた。これを探索していくことは今後、診断、治療指針、予防法に応用できる可能性があるため有意義であると考えられた。

#### <引用文献>

1) Cell-based cytokine therapy for skin rejuvenation. Ueda M, et al: The Journal Of Craniofacial Surgery, 2010 Nov, Vol. 21 (6), 1861-6

#### 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 2 件)

Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis. Ishikawa J, Takahashi N, Matsumoto T, Yoshioka Y, Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Ishiguro N, Ueda M, Furukawa K, Yamamoto A.: Bone. 2016 Feb;83:210-9. 査読あり .

Dental pulp-derived stem cell conditioned medium reduces cardiac injury following ischemia-reperfusion. Yamaguchi S, Shibata R, Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Tanigawa T, Ueda M, Murohara T, Yamamoto A.: Sci Rep. 2015 Nov 6;5:16295. doi: 10.1038/srep16295. 査読あり .

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

西川 雅也 (NISHIKAWA Masaya)

名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号 : 10635593

(2)研究分担者

上田 実 (UEDA Minoru)

名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号 : 00151803

(平成 26 年 9 月まで分担)

山本 憲幸 (YAMAMOTO Noriyuki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60378156

古江 浩樹 (FURUE Hiroki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40567012

(平成 25 年度 26 年度)