

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462739

研究課題名(和文) 糖尿病罹患表皮角化幹細胞のクローナル・コンバージョン解析による創傷治癒能の評価

研究課題名(英文) Evaluation of wound healing ability in patients with diabetes based on clonal conversion of epidermal keratinocyte stem cells

研究代表者

松崎 恭一 (Matsuzaki, Kyoichi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20278013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病を患うと創傷治癒は遅延する。さらに糖尿病が悪化して慢性腎不全になり血液透析が導入された末梢動脈疾患合併例の足(重症虚血肢)では、一層治癒が遅延する。本研究では同疾患の創傷治癒遅延に関して上皮化に焦点を当てて検討した。重症虚血肢と体幹の表皮角化幹細胞のコロニー形成能を測定することで細胞増殖活性を評価した。また表皮角化細胞の遊走能をライブイメージング可能な系で経時的に観察した。その結果、細胞増殖活性と遊走能は、重症虚血肢と体幹の間で明らかな相違はみられなかった。重症虚血肢の表皮角化幹細胞が体幹の幹細胞に比べて顕著なクローナル・コンバージョンを生じた可能性は低いと推察された。

研究成果の概要(英文)：Wound healing becomes prolonged in patients with diabetes. Healing is delayed even longer in patients with progressive diabetes who have developed chronic renal failure and peripheral arterial disease in the lower extremities (critical limb ischemia: CLI) as a complication of hemodialysis. This study focused on the relationship between epithelialization and the prolongation of wound healing in CLI. We evaluated cell proliferation by measuring the colony forming ability of epidermal keratinocytes from the trunks and feet of CLI patients. We also observed the migratory capacity of epidermal keratinocytes over time using a live imaging system. We found no clear difference in cell proliferation and migratory capacity between epidermal keratinocytes from CLI and from the trunk. Our findings suggest it is unlikely that epidermal keratinocyte stem cells from CLI result in significantly greater clonal conversion than trunk cells.

研究分野：形成外科

キーワード：創傷治癒 糖尿病 重症下肢虚血 表皮角化幹細胞 クローナル・コンバージョン 細胞増殖 細胞分化 細胞遊走

1. 研究開始当初の背景

糖尿病による創傷治癒遅延に関して、表皮細胞レベルでの研究の多くは、サイトカインの視点で行われてきた。糖尿病では TGF- β 1 レベルの低下によって表皮細胞の遊走が障害される。さらに表皮細胞の EGF に対する反応の低下と、血小板で産生される EGF の減少によって表皮細胞の増殖能と遊走能が障害されることが明らかにされていた。表皮細胞が産生する SDF-1 も低下するため、血管内皮前駆細胞の創傷への誘導にも障害が生じることなども報告されていた。しかし、糖尿病の創傷治癒遅延を表皮角化幹細胞のクローナル・コンバージョンの視点で研究した報告はなかった。

クローナル・コンバージョンに関連した研究は再生医療領域で注目されていた。表皮の基底層に存在する表皮角化幹細胞は、分裂によって角化細胞を供給し、表皮の恒常性を維持する。分化能を維持したうえで高い増殖活性を示す表皮角化幹細胞は、ホロクローンと呼ばれる。ホロクローンを培養して継代するとクローナル・コンバージョンが生じ、増殖活性は低下してパラクローンと呼ばれる Transient amplifying 細胞になる。細胞培養によるクローナル・コンバージョンは継代操作だけでなく不適当な培養条件に伴うストレスや細胞を取り巻く微小環境 (niche) の変化によっても生じることが知られていた。

2. 研究の目的

創傷治癒には様々な細胞が関与する。中でも表皮角化細胞は創傷の上皮化にとって欠かせない。創面を被覆するために遊走する表皮角化細胞は、表皮角化幹細胞の分裂・増殖によって供給される。糖尿病性腎不全のため血液透析が導入された末梢動脈疾患合併症例でみられる重症下肢虚血では、創傷治癒が著しく遅延する。重症下肢虚血患者の足の表皮角化幹細胞は体幹の細胞に比べて niche の変化が生じていると予想される。そこで糖尿病に罹患後、糖尿病性腎不全を合併し、血液透析が導入された重症下肢虚血患者の足と体幹の表皮角化幹細胞をクローナル・コンバージョンの視点で比較検討した。

3. 研究の方法

倫理委員会承認のもと、同意を得た重症下肢虚血患者の足潰瘍手術の際に生じた余剰皮

膚を研究に使用した。全例、糖尿病性腎不全のため血液透析が導入された末梢動脈疾患合併例で、血行再建後に足の創傷を治療した 15 例であった。また足の創傷に、体幹から採取した皮膚を植皮した症例では、体幹の余剰皮膚をコントロールとして使用した。

(1) 対象患者の皮膚片を、explant 法によって組織培養し、遊走した表皮角化細胞と真皮線維芽細胞を単離・培養した。そして其々の細胞のコロニー形成能を測定することで増殖活性を評価した。ヒト表皮角化細胞のコロニー形成実験では、マイトマイシン C 処理によって増殖活性を失ったマウス胎仔由来線維芽細胞株 3T3 細胞をフィーダー細胞として使用した。フィーダー細胞を調整した 6cm の培養ディッシュに 200 個のヒト表皮角化細胞を播種後、12 日間培養のうえ、ホルマリン溶液で固定後に、ローダミン B 染色を行い、コロニーを可視化することで増殖能を評価した。また、真皮線維芽細胞は低酸素下で培養するとコロニーを形成することが明らかになったので、本研究に応用した。200 個の線維芽細胞を 10cm の培養ディッシュに播種し、12 日間培養のうえ、ホルマリン溶液で固定後に、クリスタルバイオレットで染色することによって、コロニーを可視化のうえ増殖能を評価した。

(2) 創傷治癒過程における *in vivo* の上皮化では、表皮角化細胞の遊走が創縁でみられる。In vitro の培養系におけるライブイメージングで同様な遊走を再現する系を構築した。具体的には、ヒト皮膚片を 35mm ガラスボトムディッシュ上に置き、カバーグラスを上部から覆い固定した。皮膚片から細胞が遊走するまでの期間は、通常のインキュベータ内で培養した。遊走を確認後は、タイムラプス観察が可能な顕微鏡に設置されたチャンバー型インキュベータ内で培養すると共に位相差観察を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト皮膚からの細胞単離法の検討
ヒト組織を用いる本研究では、最小限の皮膚で研究を遂行することが求められたため、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞の効率的な単離培養法の検討を要した。

表皮角化細胞の単離においては、皮膚片の皮下組織を剪刀で削除した後、トリプシンで処理して角化細胞を単離する方法、皮膚片をディスペーゼで処理して表皮を剝離後、トリプシン処理によって角化細胞を単離する方法、皮膚片を細切後、真皮側を培養ディッシュ面にのせ、その上からカバーガラスで覆い固定する explant 法の3つの方法を検討した。本研究で採取された皮膚片の大きさは、との方法で行うには不十分だったため処理が難しく、単離した表皮角化細胞を継続して培養することが困難な症例が存在した。一方、の方法であれば皮膚片から遊走した表皮角化細胞をトリプシン処理で単離後に培養しても増殖能を十分に維持した状態で継代可能であった。以上の結果から本研究では、表皮角化細胞を explant 法で単離する方法を採用した。

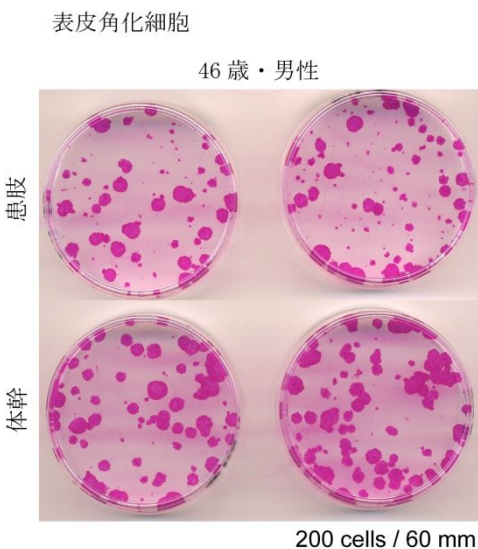
真皮線維芽細胞の単離も表皮角化細胞と同様に explant 法を用いた。線維芽細胞に適した条件で培養すると、培養の初期段階では表皮角化細胞の遊走を認めたが、継続して培養すると、表皮角化細胞は培養系から脱落して除外されることが明らかになった。

(2) 表皮角化細胞および真皮線維芽細胞の増殖能の検討

対象患者の患肢と体幹の皮膚から、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞を上記(1)の方法で単離し、コロニー形成実験を行った。その結果、患肢と体幹の皮膚から単離した表皮角化細胞のコロニー形成能に大きな相違はみられなかった(図1)。

同一の皮膚片から単離した真皮線維芽細胞のコロニー形成実験も行ったところ、表皮角化細胞と同様に患肢と体幹で明確な相違を見出すことはできなかった(図2)。

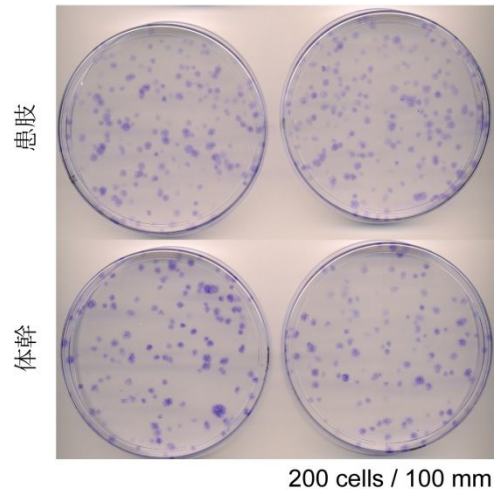
以上、培養系において、表皮角化細胞と線維芽細胞の増殖活性は、患肢と体幹の間で明らかな相違はみられなかった。



(図1)

真皮線維芽細胞

46歳・男性



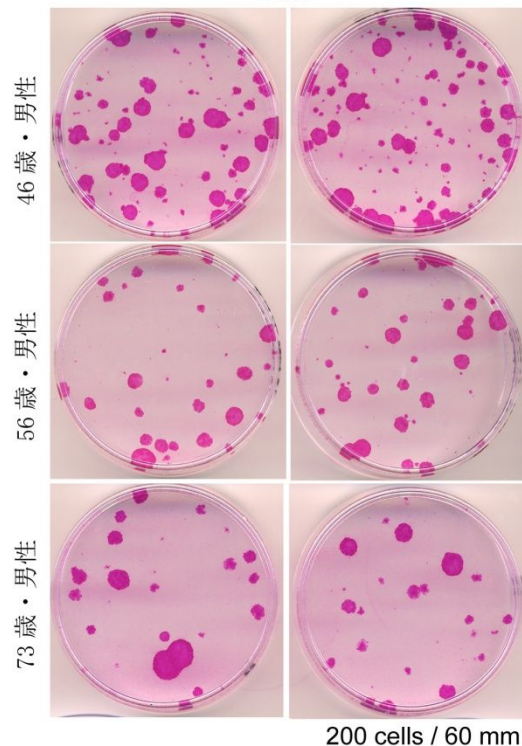
(図2)

さらに全15例の患肢表皮角化細胞を単離し、コロニー形成実験を行った結果、ほぼ全例でコロニー形成能の明らかな低下はみられなかった(図3は代表的3例の結果)。

全15例から単離した真皮線維芽細胞においても、表皮角化細胞と同様にコロニー形成能の低下は見られなかった(図4は代表的3例の結果)。

表皮角化細胞

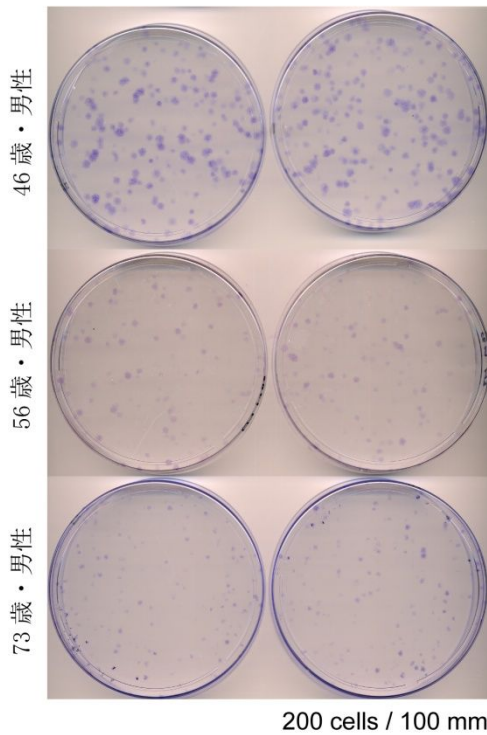
患肢



(図3)

真皮線維芽細胞

患肢



(図4)

全 15 例の colony forming efficiency (CFE)は表 1 のような結果であった。コロニー数に個人差はあるが、表皮角化細胞と線維芽細胞の増殖活性において、患肢と体幹部間で明らかな相違はみられなかった。

(表1)

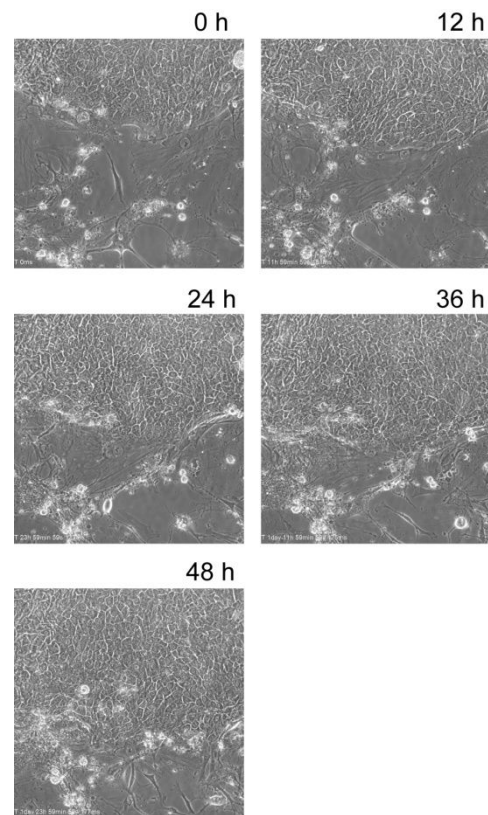
患肢		角化 CFE	線維芽 CFE
No.	年齢・性別		
1	64・男性	+	++
2	70・男性	+	++
3	71・男性	+	++
4	53・男性	++	++
5	70・女性	lost	++
6	76・男性	+	+
7	79・男性	++	+++
8	54・男性	+	++
9	73・男性	++	++
10	70・女性	+++	+
11	46・男性	+++	++
12	56・男性	++	+
13	82・女性	++	+
14	77・女性	+	+
15	67・女性	++	+

体幹		角化 CFE	線維芽 CFE
No.	年齢・性別		
1	64・男性	+	+++
11	46・男性	+++	++

(+の数：コロニー数を相対的に示す)

(3) ヒト皮膚片を用いた in vitro 上皮化モデルによる細胞遊走能評価法の開発

コロニー形成能の実験の結果、増殖能に大きな相違はみられなかったことから、重症虚血肢の創傷治癒遷延の要因の一つとして、表皮角化細胞の遊走能低下の可能性が示唆された。そこでライブイメージング可能な系を開発し、患肢由来の表皮角化細胞の遊走を経時的に観察した(図5)。一方、体幹部由来の表皮角化細胞の遊走も経時的に観察したが、患肢由来と同様な結果であったことから、患肢の表皮角化細胞の遊走能は障害されていないと考えられた。



(図5)

以上の研究結果を総合的に評価すると、顕著な創傷治癒の遷延がみられる「糖尿病性腎不全のため血液透析が導入された末梢動脈疾患合併症例」、いわゆる「重症下肢虚血」の患肢皮膚において、表皮角化細胞の増殖能と遊走能、さらに真皮線維芽細胞の増殖能に不可逆的な低下はないと考えられた。重症虚血肢の創傷治癒遷延に関して、本研究は表皮角化細胞の全機能を検討していないため、細胞レベルでの障害はないと断言できないが、創傷治癒遷延は細胞外環境の障害による直接的、間接的な影響に起因すると推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

- (1) 難波大輔, 松崎恭一: 重症下肢虚血における表皮角化幹細胞のクローナル・コンバージョンに関する研究への取り組み.
形成外科 60: 1264-1274, 2017 (査読無)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 恭一 (Matsuzaki, Kyoichi)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師
研究者番号: 20278013

(2) 研究分担者

難波 大輔 (Nanba, Daisuke)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・
准教授
研究者番号: 10380255

(3) 研究協力者

宮本 明 (Miyamoto, Akira)