

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713051

研究課題名(和文) 糖尿病性潰瘍に対する慢性炎症を標的とした実用的細胞治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of practical cell therapy to control chronic inflammation of diabetic ulcer

研究代表者

田中 里佳 (Tanaka, Rica)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：70509827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、糖尿病皮膚に存在する慢性炎症制御機序を明らかにし、創傷治癒遅延の責任因子を同定した。さらに申請者が新規開発した「ハイブリッド型無血清生体外培養増幅法；Hybrid QQC」により培養した末梢血単核球は糖尿病皮膚を炎症から再生環境に変化させ創傷治癒を促進することを可能にした。本研究は糖尿病皮膚慢性炎症を制御でき、従来の治療効果を更に向上させた発展型の細胞移植治療法の開発の基盤を構築した。さらに細胞治療効果予測因子候補を同定し、今後、慢性炎症に起因する糖尿病性潰瘍に対する遺伝子特性に応じた治療戦略決定のための先進的診断法の開発への発展が期待される成果を見出した。

研究成果の概要(英文)：This project revealed the cause of diabetic wound chronic inflammation and the major factor responsible for its mechanism. In addition, the applicant established a newly founded ex vivo expansion system which enhances the function of diabetic peripheral blood mononuclear cells that can be effective for diabetic wound healing by changing the inflammatory wound environment to anti-inflammatory regenerative state. These findings have built the bases for establishing highly effective cell therapy for diabetic wound healing. Furthermore, the treatment predictor bio-marker candidates for cell therapy found in this study will lead us to establishing personalized treatment strategies according to gene characteristics.

研究分野：形成外科

キーワード：糖尿病 慢性炎症 再生医療 細胞治療 創傷治癒 皮膚 マクロファージ 血管幹細胞

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性潰瘍において壊死が進行すると、壊死組織の上流部を切断する治療選択を避けられず、20秒に1人の患者が下肢を切断されている (Lancet 2008)。難治性の患者に特異的なバイオマーカーは未だ開発されておらず、治療開始前の予後の的確な予見は、極めて困難である。潰瘍局所における M1/M2 比率が創傷治癒遅延に関与しているとの報告もあり、M1/M2 細胞、EPC に起因する慢性炎症制御が有効な細胞移植治療法の確立に重要である。申請者は、既に糖尿病患者の EPC の数(量)と血管再生能(質)の著しい低下が難治性糖尿病性潰瘍の原因の一つであり、自己 EPC 移植による血管・組織再生治療の効率を左右していることを解明した (Tanaka, PRS, 2008、Tanaka, Cell Transplantation, 2012)。これらに基づいて申請者が開発した「無血清生体外培養増幅法 (Quality and Quantity Culture: QQc)」は、糖尿病患者の末梢血単核球細胞に含まれる EPC の量と質の向上を実現した。また、EPC と Angiogenic T cell の共培養で QQc 法を改良し、EPC の量・質のさらなる向上に加え、M2 マクロファージ (抗炎症性) の増幅、M1 マクロファージ (炎症性) の減少を誘導し、抗炎症効果を向上させる独自の培養法を確立した (Hybrid QQc; HyQQc、最先端次世代研究支援プログラム事業成果)。しかし、上記培養法では、糖尿病患者 40 例中 20% の患者では十分な EPC 増幅培養効果と末梢血 M1/M2 マクロファージ細胞の抗炎症効果が得られていない (HyQQc Non Responder)。さらに、HyQQc Non Responder の細胞をヌードマウス潰瘍へ移植したところ、Responder に比べて血管再生・組織再生・抗炎症効果が有意に低く創傷治癒効果が悪いなど、いくつかの課題がある。他報告では、糖尿病性潰瘍の治癒と細胞移植効果を規定する因子として、宿主(host)の局所の慢性炎症に係る M1/M2 マクロファージの比率の関与が示唆されている (Plos one, 2010)。難治性の患者にも効果的な細胞治療を実現するためには、これらの課題を解決する必要がある。先の関連報告を踏まえると、効果的な細胞移植を実現させるためには、細胞が生着する移植床の炎症環境の整備と移植細胞の活性化が重要な要件と考えられる。即ち、高い移植効果を有する HyQQc 細胞と潰瘍局所の M1/M2 マクロファージの慢性炎症制御を可能とする治療法の統合が効果的な治療法を導くための必須要件になる。このため、糖尿病性潰瘍の局所における慢性炎症制御機序と患者のエピジェティックな遺伝子特性を解明し、創傷治癒遅延・細胞治療阻害の原因である慢性炎症の責任因子を特定することは、新規の創傷治療と細胞移植治療の効果的な増強法の開発につながる。これらの背景を踏まえ、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病患者末梢血・潰瘍局所での抗炎症性を規定する M1/M2 細胞比率の制御因子 (Notch シグナル、サイトカイン等) の同定、及び糖尿病性潰瘍の慢性炎症環境と遺伝子特性 (エピジェティクス) の制御機構を解明することを目的とする。申請者が開発した「ハイブリッド型無血清生体外培養増幅法 Hybrid QQc」は、末梢血の血管内皮前駆細胞 (EPC) と M2 細胞の量・質を増幅することで、高い創傷治癒効果を有する細胞移植治療を可能としたが、一部の治療抵抗群では細胞と宿主側の慢性炎症の影響が示唆される。この為、慢性炎症制御機序を解明し、従来の治療効果を更に向上させた発展型の細胞移植治療法の開発が重要となる。本研究で移植細胞の分子生物学的特性、移植床の慢性炎症環境の解明により治療抵抗性の主因を明らかにし、効果的治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

I. 糖尿病 M1/M2 細胞制御機序解明し責任因子を同定。

1) 末梢血単核球 HyQQc 法による M1/M2 細胞制御の因子を同定。

HyQQc 法より炎症性 M1 細胞を抑制、そして抗炎症性 M2 細胞を有意に増幅する、という申請者の研究結果を踏まえ、培地条件と単核球中に含まれる細胞が M1/M2 炎症制御に関与していること予想された。そこでこれらと慢性炎症制御の関係を解析した。

方法) HyQQc 前後の糖尿病末梢血 M1、M2 の表現型の変化を FACS 解析 (M1 (CCR2), M2 (CD206), PCR 解析 (M1: TNF α , iNOS, IFN γ ; M2: IL-10, IL-12, TGF- β , Arg-1) と Elisa 法により培地中に分泌される上記サイトカインを解析し、HyQQc のどの因子が M1/M2 細胞活性に変化をもたらすかを調べた。

2) Notch シグナルが HyQQc M1/M2 制御に与える影響を解明。

糖尿病 EPC Notch シグナル障害が糖尿病 M1/M2 制御障害に影響することを解明し、Notch シグナル阻害剤または誘導因子の有無で HyQQc 前後で、EPC 血管再生能、EPC 数、M1/M2 の表現型の変化を PCR 解析、溶液中に分泌されるタンパクの変化をサイトカインアレイにて解析し、Notch シグナルによる HyQQc 培養への影響を解析した。

II. 糖尿病性潰瘍創傷遅延における慢性炎症の役割を解明、潰瘍局所慢性炎症を制御して細胞治療効果を高める新しい治療法の確立に向けた基盤研究

現在の HyQQc 細胞の一部の糖尿病潰瘍に対する治療効果は完全ではない。平成 27 年度以降は、移植側 (Host) の環境を整えて細胞生着率向上させることを目的に、下記実験にて潰瘍局所の慢性炎症機序を解明する。また、既に同定した慢性炎症責任因子による慢性炎症の制御で効果的な細胞移植法を確立し、発展型 HyQQc を完成させる。

1) マウス糖尿病性潰瘍の慢性炎症機序について解明。

方法：ストレプトゾトシン (STZ) 腹腔内注射により 1 型糖尿病を誘導したマウスにステント潰瘍を作成した。健常マウスと糖尿病マウスに潰瘍作成後 6 時間から 9 日間までの皮膚を回収し、潰瘍局所 M1/M2 細胞を分離し FACS 解析、PCR 解析 (M1: TNF α , IFN γ , iNOS; M2: IL-10, IL-12, TGF- β , Arg-1 など) と免疫染色 (M1: iNOS; M2: Arg-1, Macrophage CD68) を行った。M1 と M2 が関与する創傷治癒の機序、糖尿病性潰瘍局所の慢性炎症機序と創傷治癒遅延の責任因子を明らかにするため、Real-time qPCR、western blotting、免疫染色法を用いて、皮膚での M1/M2 関連サイトカインの mRNA の発現量および p38 MAPK と PI3K/Akt シグナルを測定した。

2) マウス糖尿病性潰瘍に対する慢性炎症制御因子の炎症制御と HyQQc 細胞の役割の解明

方法：糖尿病マウスと健常マウスの背部ステント潰瘍モデルに HyQQc 細胞を移植し、実験 II-1 にて解析した潰瘍局所慢性炎症機序を同様の方法にて比較解析する。糖尿病患者では慢性炎症制御不能 HyQQc を移植し、糖尿病マウス慢性炎症制御が可能かを検証する。さらに、I の実験の結果を踏まえて新たに開発した新規 QQ 培地を用いて、慢性炎症制御不能患者移植が改善されるかを検証した。これらの結果は局所糖尿病性潰瘍に対する慢性炎症制御処置が細胞治療効果にもたらす影響を明らかにし、細胞治療効果増強補助治療としての可能性も探る。

III. 糖尿病患者の HyQQc による組織再生・慢性炎症制御不能患者の責任因子を同定する。

20%の糖尿病患者では慢性炎症制御不能によって HyQQc 法が適用不可、ならびにヌードマウス潰瘍への HyQQc 細胞移植で血管再生・組織再生・抗炎症効果が有意に低いという課題を受けて、HyQQc に慢性炎症制御不能の原因と申請者は予測した。そこで制御不能患者の HyQQc 細胞における遺伝子学的特徴を RNASeq にて解明した。さらに、HyQQ 培養中の培養上清を解析し、HyQQc Non Responder/Responder の慢性炎症制御因子の候補を選定する。

4. 研究成果

I. 糖尿病 M1/M2 細胞制御機序解明し責任因子を同定。

1) 末梢血単核球 HyQQc 法による M1/M2 細胞制御の因子を同定。

HyQQc 前後の糖尿病末梢血 M1、M2 の表現型の変化を FACS 解析、PCR 解析と培地の Elisa 法により解析したところ、HyQQc の培地が EPC を増幅させ、EPC の増幅に伴い M1 細胞が減少し M2 マクロファージが増加することが明らかになった。EPC の存在は M1 細胞を M2 細胞への表現型を変化させることの確認するた

め、EPC とマクロファージを共培養のありとなし群により比較をしたところ EPC あり群においては M1 細胞が M2 細胞に表現型が変化したことが明らかになった。本結果は 2015 年再生医療学会において報告している。

2) Notch シグナルが HyQQc M1/M2 制御に与える影響を解明。

糖尿病患者において末梢血 CD34+細胞における PGC1 α と Notch シグナルの障害が存在していることを明らかにし、HyQQc 培養においては PGC1 α と Notch シグナルの障害を改善し、HyQQc 細胞は高い血管新生・創傷治癒効果を有することを明らかにした (Tanaka R et al. Stem Cell Translational Research doi.org/10.1002/sctm.17-0043, 20198)。Notch シグナルは血管新生において正常脈管形成やリモデリングに必須なシグナルであるが、過剰な活性は逆に異常血管形成や血管機能障害をもたらす。糖尿病患者においては末梢血 EPC の Notch シグナル障害が生じているため、HyQQc による NonResponder が存在することが示唆された。 γ -セクレターゼ阻害剤は、Notch シグナルの伝達物質である γ -セクレターゼの切断を阻害し、Notch 伝達経路を制御する薬剤化合物である。我々は、糖尿病 EPC に γ -セクレターゼ阻害剤を用いると EPC 機能障害が改善することを明らかにし (Sukmawati D, Tanaka R. et al Journal of Diabetes and Its Complications 30:12-20, 2016)。本研究成果より糖尿病 HyQQc Non-Responder 患者にも有効な培養技術を確立するため、 γ -セクレターゼ阻害剤を用いた新規培地を開発した (特許出願済み)。本培地は HyQQc に比べ糖尿病患者の EPC 血管再生能を有意に増幅させ、より効果的に M2 細胞制御が可能になった。

II. 糖尿病性潰瘍創傷遅延における慢性炎症の役割を解明、潰瘍局所慢性炎症を制御して細胞治療効果を高める新しい治療法の確立に向けた基盤研究

1) マウス糖尿病性潰瘍の慢性炎症機序について解明。

我々は、糖尿病性潰瘍の創傷治癒遅延の原因が皮膚炎症細胞である M1 と M2 細胞の活性異常である可能性を考え、これらの細胞に起因する糖尿病性潰瘍の創傷治癒機構の解明を行った。健常マウスと糖尿病マウスに潰瘍作製後 6 時間から 9 日間までの皮膚を回収し、Real-time PCR、western blotting、免疫染色法を用いて、皮膚での M1/M2 炎症性サイトカインの mRNA の発現量および p38 MAPK のリン酸化とその下流遺伝子の発現レベルを測定した。その結果、健常マウスは潰瘍作成 6 時間後に M1 細胞から分泌される炎症性サイトカインである IL6 は著しく増加し、IL6 により p38 MAPK と PI3K/Akt シグナル伝達が活性化されることが明らかになった。一方、糖尿病マウス皮膚では M1 マクロファージから

分泌される炎症性サイトカインである IL6 の発現量が大きく慢性的に炎症が遷延していた。健常マウスにおいては潰瘍作成 6 時間後、IL6 は著しく増加し、3 日後、M2 マクロファージから分泌される抗炎症性サイトカインである Arginase(Arg)が増加した(下図)。一方、糖尿病マウスにおいて潰瘍作成 6 時間後の IL6 の発現は低く、Arg の発現量と p38 MAPK のリン酸化とその下流遺伝子の発現も有意に減少していた。糖尿病の皮膚は M1 細胞の

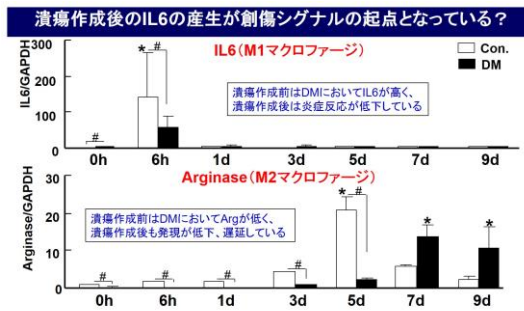
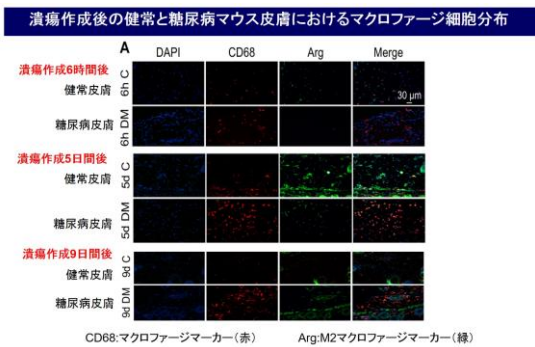
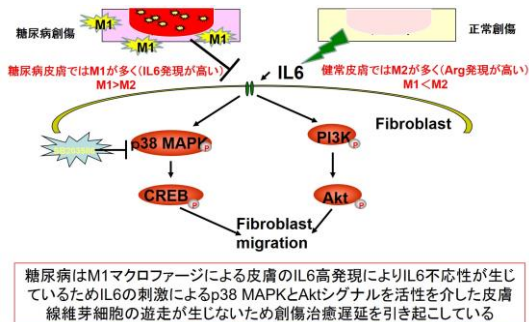


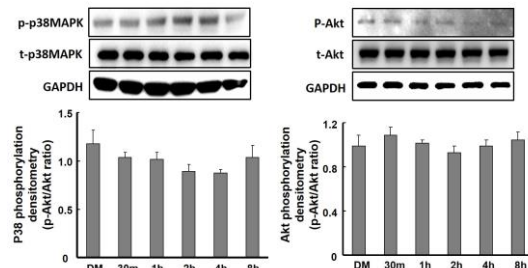
Fig. 2. mRNA expression for M1 and M2 cytokines in normal and diabetic wounds. mean±S.E., n = 3, * p < 0.05 vs. Con.0h, # p < 0.05

活性による慢性炎症が遷延していることから、外傷などの外的ストレス下に M1 細胞からの炎症シグナルが正常に惹起されないため、その後 M2 マクロファージからの再生シグナルの発現が遅延することで、創傷治癒遅延が生じる可能性が示唆された(下図)。本研究成果は、糖尿病局所慢性炎症制御機構を明らかにし、今後細胞治療効果を高める IL6 を用いた新しい治療法を見出した。



2) マウス糖尿病性潰瘍に対する慢性炎症制御因子の炎症制御と Hybrid Qqc 細胞の役割の解明
上記実験において明らかになった、皮膚慢性炎症制御因子である IL6 がマウス糖尿病性潰瘍に及ぼす影響を確認するため、健常と糖尿病マウス皮膚繊維芽細胞創傷治癒モデルに IL6 刺激と阻害実験を実施した。その結果、健常マウスでは IL6 刺激は線維芽細胞の創傷治癒促進と Akt と P13K のリン酸化を促進し、阻害剤投与によって線維芽細胞の創傷治癒阻害と Akt の発現量と p38 MAPK のリン酸化とその下流遺伝子の発現を有意に減少した。しかし、糖尿病マウスではこれらの現象は認められなかった(下記図)。

糖尿病性潰瘍ではIL6刺激により線維芽細胞のp38 MAPKとAKTのリン酸化は変化を認めなかった



さらに糖尿病皮膚慢性炎症における HyQQc 効果を検証するため、マウス糖尿病性潰瘍に健常人と糖尿病患者 Responder HyQQc 細胞を移植したところ、コントロール群に比較して有意に潰瘍縮小効果をもとめ、皮膚の M2 細胞の増加を認めた。HyQQc は多くの M2 細胞を含むことから、糖尿病性潰瘍においては肉芽形成期に異常な活性状態にある M1 細胞を鎮静化し、炎症から抗炎症環境を誘導し M2 細胞移植により皮膚組織内の血管新生促進、繊維芽細胞増生などをもたらし、創傷治癒促進に働いているが明らかになった。

Ⅲ. 糖尿病患者の HyQQc による組織再生・慢性炎症制御不能患者の責任因子を同定する。
平成 28 年度から平成 29 年度は、HyQQc 培養不適合患者における責任因子を同定し、効果的治療バイオマーカーの開発を行った。20% の糖尿病患者では慢性炎症制御不能によって HyQQc 法が適用不可、ならびに、ヌードマウス潰瘍への HyQQc 細胞移植で血管再生・組織再生・抗炎症効果が有意に低い患者においていくつかの候補遺伝子を同定した(特許出願手続き中)。さらに、HyQQ 細胞だけでなく、HyQQ 培養中の培養上清を解析し、HyQQc Non Responder/Responder の慢性炎症制御因子の候補を特定した。候補遺伝子と培養上清の両方に相関関係を認め、細胞治療の治療効果予測のバイオマーカーの可能性となる候補因子において、遺伝子とタンパク阻害剤を用いた検証実験を行っている。今後、慢性炎症に起因する糖尿病性潰瘍に対する遺伝子特性に応じた治療戦略決定のための先進的診断法の開発への発展が期待される。

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 41 件)

【英文原著】*: corresponding author
(すべて査読あり)

1. Tanaka R*, Masuda H, Fujimura S, Hirano-Ito R, Arita K, Kakinuma Y, Hagiwara H, Kado M, Hayashi A, Mita T, Ogawa T, Watada H, Mizuno H, Sawada N, Asahara T: Quality-quantity control culture enhances vasculogenesis and wound healing efficacy of diabetic peripheral blood CD34+ cells. *Stem Cells Translational Medicine* doi.org/10.1002/sctm.17-0043, 2018
2. Shen T, Kanazawa S, Kado M, Okada K, Lin L, Hayashi A, Mizuno H, Tanaka R*: Interleukin-6 stimulates Akt and p38 MAPK phosphorylation and fibroblast migration in non-diabetic but not diabetic mice. *PLoS ONE* doi.org/10.1371/journal.pone.0178232, 2017
3. Sukmawati D, Tanaka R*, Fujimura S, Jitsukawa S, Ito-Hirano R, Hayashi A, Itoh S, Mizuno H, Daida H: The Role of Notch Signaling in Oxidative stress tolerance Cells Dysfunction. *Journal of Diabetes and its Complications* 30:12-20, 2016
4. Sukmawati D, Fujimura S, Jitsukawa S, Ito-Hirano R, Ishii T, Sato T, Hayashi A, Itoh S, Mizuno H, Daida H, Tanaka R*: Oxidative stress tolerance of early stage diabetic endothelial progenitor cell. *Regenerative Therapy* 1:38-44, 2015
5. Masuda H, Tanaka R, Fujimura S, Ishikawa M, Akimaru H, Shizuno T, Sato A, Okada Y, Iida Y, Itoh J, Itoh Y, Kamiguchi H, Kawamoto A, Asahara T: Vasculogenic conditioning of peripheral blood mononuclear cells promotes endothelial progenitor cell expansion and phenotype transition of anti-inflammatory macrophage and T lymphocyte to cells with regenerative potential. *Journal of the American Heart*

Association DOI:

10.1161/JAHA.113.000743, 2014

〔学会発表〕(計 114 件、共著者としての発表含む)

【2018 年】

1. 田中里佳, 難治性潰瘍患者に対する四肢救済を目的とした新規血管・組織再生治療法の開発, 第 17 回日本再生医療学会総会

【2017 年】

1. 田中里佳, 末梢血 MNC-QQ 細胞移植がもたらす創傷治癒学の未来, 第 47 回日本創傷治癒学会

【2016 年】

1. 田中里佳, 難治性四肢潰瘍に対する生体外培養末梢血単核球を用いた次世代型血管・組織再生治療, 第 14 回日本フットケア学会年次学術集会
2. Rica Tanaka, Next Generation Autologous Vascular Stem Cell Therapy for Diabetic Limb Salvage, 1st Congress of Diabetic Limb Salvage in Asia

【2015 年】

1. Rica Tanaka, Stem Cells in Tissue Repair and Regeneration Featuring the Japanese Society for Wound Healing, 2015 Wound Healing Society

〔図書〕(計 1 件)

1. 田中里佳: 分担) 再生医療 フットケアと足病変治療ガイドブック 日本フットケア学会、医学書院、東京、204-208、2017

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称: 間葉系肝細胞による処置の効果を増幅するための組成物

発明者: 田中里佳

権利者: 学校法人順天堂

種類: 特許

番号: PCT/JP2018/008195

出願年月日: 2018 年 2 月 27 日

国内外の別: 国際

名称: 単核球培養用無血清培地

発明者: 田中里佳、平野 理恵

権利者：学校法人順天堂
種類：特許
番号：特願 2016-022313
出願年月日：2016 年 2 月 9 日
国内外の別：国内

名称：虚血性疾患治療に適した細胞を含む細胞群の生体外増殖方法
発明者：浅原 孝之、増田 治史、田中里佳
権利者：学校法人順天堂、学校法人東海大学、StemMed 株式会社、公益財団法人 神戸医療産業都市推進機構
種類：特許
番号：特願 2014-538679
出願年月日：国際出願日 2013 年 9 月 30 日、国内移行日 2015 年 3 月 24 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/keisei/kenkyu/grp03/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 里佳 (TANAKA, Rica)
順天堂大学・医学部・先任准教授
研究者番号：70509827