

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10962

研究課題名(和文) MUSE細胞移植は皮膚創傷治癒を促進し、皮膚構造を再生するか？

研究課題名(英文) Does the MUSE cell transplantation promote skin wound healing and reconstruct skin structure?

研究代表者

落合 博子(Ochiai, Hiroko)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・その他部局等・室長

研究者番号：60374162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの皮膚潰瘍モデルへMUSE細胞を移植した場合、創治癒が促進され、その程度は骨髄由来間葉系幹細胞移植と同等であった。また、細胞移植14日目の創部には、移植したMUSE細胞・骨髄由来間葉系幹細胞ともに認められず、創傷に対して傍分泌効果が関与した可能性が考えられた。また、ラットのMUSE細胞培養では、3継代以降は培養液に自家血清を用いた方がFBSを用いるよりも細胞増殖が有意に少なかった。

研究成果の概要(英文)：The wound healing was promoted when the MUSE (Multi-lineage differentiating stress enduring) cells were transplanted into the skin ulcer of rat. And the degree of wound healing was almost equal to the case of the BMSC (Bone marrow stromal cell) transplantation. In addition, the MUSE cells and the BMSCs couldn't be recognized in the tissues of the wound 14days after cell transplantation. There was the possibility that a paracrine effect primarily promoted the healing of cutaneous wounds.

By culturing the MUSE cells of rat, lesser cell proliferation was recognized when they were cultured in culture fluid with autologous serum than with FBS.

研究分野：形成外科

キーワード：間葉系幹細胞 創傷治癒 皮膚潰瘍

平成30年6月26日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10962

研究課題名(和文) MUSE細胞移植は皮膚創傷治癒を促進し、皮膚構造を再生するか？

研究課題名(英文)

Does the MUSE cell transplantation promote skin wound healing and reconstruct skin structure?

研究代表者

落合 博子(OCHIAI, Hiroko)

国立病院機構東京医療センター・臨床研究センター・聴覚平衡覚研究部・再生医療研究室室長

研究者番号：60374162

交付決定額(研究期間全体):(直接経費)36,000,000円

研究成果の概要(和文):

・マウスによる実験：GFP成獣オスマウス8週令の皮膚由来MUSE細胞を培養して得た。免疫不全マウスの背部にリングを装着した皮膚欠損創を作成し、皮膚潰瘍モデルとした。上記で作成したMUSE細胞をPBSに浮遊させ、創縁および潰瘍底に局注・移植し(M群)、創治癒の過程を分析した。コントロールとして、線維芽細胞(F群)およびBMSC(B群)を用いた。その結果、M群とB群の潰瘍は、F群と比較して有意に創の収縮が早く、肉芽形成も良好だった。M群とF群の間に有意差はなかった。蛍光顕微鏡で潰瘍を組織学的に観察したところ、移植3、7日目は潰瘍周囲の皮膚及び創底に移植したGFP由来のMUSE細胞を認めたが、徐々に減少し、14日目の上皮化が終了した時期にはGFP由来のMUSE細胞は認められなかった。マッソントリクローム染色により、M群とB群の潰瘍は、F群と比較して有意に膠原線維の配列が整っており、成熟していたが、M群とF群の間に有意差はなかった。以上より、皮膚潰瘍へMUSE細胞を移植した場合、創治癒が促進され、その程度はBMSC移植と同等であった。

・ラットによる実験：成獣オスF344ラット(近交系)皮膚よりMUSE細胞を得た。FBSを使用しない培養液で、MUSE細胞を培養し、FBSを使用した場合と比較を行った。ラットより採取した血液を、閉鎖式血清調整デバイスを用いて、増殖因子を多く含む血清を分離し、FBSの代わりに用いた。F-culture: -MEM+10%FBS, S-culture: -MEM+10%Serumを比較した場合、ラットMUSE細胞は、2継代目までは両培養液間に有意差がなく細胞が増殖した。3継代目からは、有意にS-culture群の増殖が少なかった。S-cultureにおいても、2継代目まではSSEA-3陽性の性質が維持されていることが確認できた。

研究成果の概要(英文): The wound healing was promoted when the MUSE (Multi-lineage differentiating stress enduring) cells were transplanted into the skin ulcer of rat. And the degree of wound healing was almost equal to the case of the BMSC (Bone marrow stromal cell) transplantation. In addition, the MUSE cells and the BMSCs couldn't be recognized in the tissues of the wound 14days after cell transplantation. There was the possibility that a paracrine effect primarily promoted the healing of cutaneous wounds.

By culturing the MUSE cells of rat, lesser cell proliferation was recognized when they were cultured in culture fluid with autologous serum than with FBS.

研究分野：形成外科

キーワード：間葉系幹細胞 創傷治癒 皮膚潰瘍

## 1. 研究開始当初の背景

(1) これまで、BMSC (Bone marrow derived Mesenchymal Stem Cell)は骨、筋、神経、軟骨、脂肪細胞などに分化し、生体に移植するとその環境に合わせて分化することが報告されてきた(Nature, 2002, 418(6893):41-49)。さらに、BMSCは、数は少ないものの障害を受けた組織に生着し、組織に応じて3胚葉性の細胞に分化して組織修復細胞としての機能を果たすことが示唆されてきた(Nature, 2001, 410:701-705)(J. Biochem., 2003, 134:551-558)。

(2) 一方、BMSC中の多能性幹細胞であるMUSE (Multilineage- differentiating stress enduring)細胞の存在が報告されてきた。MUSE細胞は、損傷部位を認識し、組織再生と組織修復の中心的役割を担っていることが証明されている。MUSE細胞は、骨髄液では3,000個の骨髄単核球細胞のうちの1細胞の割合とされており、MUSE細胞以外のBMSCは栄養因子の供給や抗炎症作用などの役割で組織修復に一定の寄与をしているのみであるとされる。また、免疫欠損マウスにヒトMUSE細胞を投与すると障害部位にホーミングし、肝細胞、筋細胞、神経細胞、表皮細胞に分化することが移植後2~4週間で認められている

(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, 107:8639-43)。また、MUSE細胞は、骨髄以外にも皮膚や脂肪組織からも分離が可能である。従って、皮膚潰瘍・創傷の治癒促進目的にMUSE細胞を移植することは、比較的簡便であり、BMSCを移植するよりもより早くより良い効果を得られる可能性が期待できる。

## 2. 研究の目的

(1) 筆者は、これまでBMSCを皮膚の創傷に移植すると正常に近い皮膚構造が再生されることを確認し、すでに臨床応用を開始している。そんな中、MSCの中心的役割を果たす多能性幹細胞MUSE細胞が報告された。MUSE細胞は皮膚や脂肪から容易に採取でき、移植すると心筋や肝臓の損傷部位に高率に生着し機能的な細胞に分化することが知られている。損傷皮膚や軟部組織に対しても同様の効果を有するならば皮膚創傷や潰瘍を有する患者へ大きな恩恵があると考えられる。そこで、本研究では、MUSE細胞移植が皮膚創傷治癒に及ぼす効果と作用機序を検討し、患者の負担の少ない臨床応用の実現を目的とする。

(2) 皮膚潰瘍へMUSE細胞を移植した際の、創治癒の過程を観察し、組織学的検討を行う。また、FBSを用いずに自家血清でMUSE細胞を培養した際の、細胞増殖の程度を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) GFPマウス皮膚由来MUSE細胞の培養  
GFP成獣オスマウス8週令を用いて実験を行う。皮膚を採取して、細かく破碎し、プラスチックディッシュに播種して培養を行う。

培養液は、-MEM+10%FBS+0.1mg/mL Kanamycinを用いる。FACSによりSSEA-3陽性細胞を分離し、poly-HEMAコートdishに細胞・FBS・メチルセルロースを入れて培養し、クラスター細胞を得る(東北大学大学院医学系研究科・細胞組織学分野・人体構造学分野ホームページに従う)。

## (2) 免疫不全マウスの皮膚創傷へのMUSE細胞移植および組織学的検討

マウスは創治癒が早く良好であるため、皮膚潰瘍モデルを使用する。免疫不全マウスの背部にリングを装着した皮膚欠損創を作成し、皮膚潰瘍モデルとする。上記1で作成したMUSE細胞をPBSに浮遊させ、創縁および潰瘍底に局注・移植し、創治癒の過程を肉眼的に観察し、デジタルカメラで撮影し、潰瘍面積および肉芽形成の分析を行う。コントロールとして、線維芽細胞およびBMSCを用いる。

また、MUSE細胞移植後1, 3, 5, 7日目に創部を採取する。採取した組織はOCTコンパウンドに包埋し、急速凍結後に7µmの凍結切片を作成する。乾燥させた後、アセトンで10分間、室温で固定する。蛍光顕微鏡により、移植したGFP細胞の生着数と生着部位を確認する。移植細胞の機能評価は、組織学的検討により行う。マッソントリクローム染色により、膠原線維の配列や成熟の評価を行う。免疫染色によるSMA, Cytokeratin, 弾性線維などの発現を検討する。Western blottingなどによりTGF $\beta$ , HGFの発現量の検討を行う。

## (3) FBSを用いないMUSE細胞の培養方法の検討

成獣オスマウス344ラット(近交系)を用いる。ラット皮膚よりMUSE細胞を得る。ラットより採取した血液を、閉鎖式血清調整デバイスを用いて、増殖因子を多く含む血清を分離し、FBSの代わりに用いた培養液で培養を行う。細胞の増殖の程度を比較検討し、SSEA-3陽性などの性質が維持されるか確認する。

## 4. 研究成果

(1) マウスによる実験：GFP成獣オスマウス8週令の皮膚由来MUSE細胞を培養して得た。

免疫不全マウスの背部にリングを装着した皮膚欠損創を作成し、皮膚潰瘍モデルとした。上記で作成したMUSE細胞をPBSに浮遊させ、創縁および潰瘍底に局注・移植し(M群)、創治癒の過程を分析した。コントロールとして、線維芽細胞(F群)およびBMSC(B群)を用いた。その結果、M群とB群の潰瘍は、F群と比較して有意に創の収縮が早く、肉芽形成も良好だった。M群とF群の間に有意差はなかった。蛍光顕微鏡で潰瘍を組織学的に観察したところ、移植3, 7日目は潰瘍周囲の皮膚及び創底に移植したGFP由来のMUSE細胞を認められたが、徐々に減少し、14日目の上皮化が終了した時期にはGFP由来のMUSE細胞は認められなかった。創傷に対して傍分泌効果が関与した可能性が考えられた。

マッソントリクローム染色により、M群とB群の潰瘍は、F群と比較して有意に膠原線維の配列が整っており、成熟していたが、M群とF群の間に有意差はなかった。

以上より、皮膚潰瘍へMUSE細胞を移植した場合、創治癒が促進され、その程度はBMSC移植と同等であった。

・ラットによる実験：成獣オスF344ラット（近交系）皮膚よりMUSE細胞を得た。

FBSを使用しない培養液で、MUSE細胞を培養し、FBSを使用した場合と比較を行った。ラットより採取した血液を、閉鎖式血清調整デバイスを用いて、増殖因子を多く含む血清を分離し、FBSの代わりに用いた。F-culture: -MEM+10%FBS, S-culture: -MEM+10%Serumを比較した場合、ラットMUSE細胞は、2継代目までは両培養液間に有意差がなく細胞が増殖した。3継代目からは、有意にS-culture群の増殖が少なかった。S-cultureにおいても、2継代目まではSSEA-3陽性の性質が維持されていることが確認できた。

(2) 本研究により、東京医療センターですでに臨床応用されている「骨髄由来間葉系幹細胞移植によるscarless wound healing」の治療方法を、さらに効率よく効果的にステップアップさせるための手段を確立することができる。また、脊髄損傷患者の難治性潰瘍を実際の治療対象とする場合、皮膚の採取や細胞移植において患者が感じる苦痛はほとんどなく、また栄養状態が良好な患者が多いことから、治療効果が安定して得られることが期待できる。

MUSE細胞は、腫瘍形成性がほとんどないとされており、分化誘導をかけなくても組織特有の細胞に分化し組織修復に寄与する事から、煩雑さが少なく安全に臨床応用できることが保障されている。そのため、形成外科領域における口唇裂などの小児に対する形成手術や、顔面などの腫瘍切除術などの癒痕を目立たなく治す目的に非常に適していると考えられる。

#### 引用文献

Dezawa M. Muse Cells Provide the Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells: Direct Contribution of Muse Cells to Tissue Regeneration. *Cell Transplant*. 2016;25(5):849-61.

Pittenger, M.F., et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284:143-147

永谷憲歳、北村惣一郎：臨床応用 再生医療の実際 心血管 心不全：日本臨床 2008, 66(5):978-983

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L. et al.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature Epub* 2002 Jun 20.

Kamiya K, Fujinami Y, Hoya N, Okamoto Y, Kouike H, Komatsuzaki R, Kusano R, Nakagawa S, Satoh H, Fujii M, Matsunaga T. Mesenchymal stem cell transplantation accelerates hearing recovery through the repair of injured cochlear fibrocytes. *American journal of pathology Epub* 2007 May 24, 2007 Jul;171(1):214-26

Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. *Cell Transplantation* 2004, 13:405-412

中島龍夫, 佐藤博子, 貴志和生, 緒方寿夫, 永竿智久. 臨床応用への道 形成外科領域での再生医療の最近の動向. *ティッシュエンジニアリング* 2007 Jun;163-168

落合博子, 貴志和生, 中島龍夫, 梅澤明弘. 創傷治療. *病理と臨床* 2009 Apr;27;4:364-366

Yoshikawa, T., et al.: Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. *Plast Reconstr Surg* 2008, 121(3):860-877

[Kishi, K.](#), [Ohyama, K.](#), Satoh, H. et al.: Mutual dependence of murine fetal cutaneous regeneration and peripheral nerve regeneration. *Wound Repair Regeneration* 2006, 14(1):91-99

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計3件）

Ochiai H, Kishi K, Kubota Y, Oka A, Hirata E, Yabuki H, Iso Y, Hiroshi S and Umezawa A. Transplanted Mesenchymal Stem Cells are Effective for Skin Regeneration in Acute Cutaneous Wounds of Pigs. *Regenerative Therapy*. 2017 July;7:8-16.

Kuriyama E, Ochiai H, Inoue Y, Sakamoto Y, Yamamoto N, Utsumi T, Kishi K, Okumoto T and Matsuura A. Characterization of the capsule surrounding smooth and textured tissue expanders and correlation with contracture. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 5(7):e1403, July 2017. DOI: 10.1097/GOX.0000000000001403

落合博子, 貴志和生, 久保田義顕, 岡愛子, 平田恵理, 矢吹華代, 磯良崇, 鈴木洋, 梅澤明弘. 間葉系幹細胞移植がブタ皮膚急性創傷治療へ与える影響. *形成外科* 2017 Nov;60(11):1232-1239

〔学会発表〕（計3件）

Hiroko Ochiai, Kazuo Kishi, Akihiro Umezawa. Mesenchymal Stem Cells are Effective for Skin Regeneration in Acute Cutaneous Wounds of Pigs. The 5th Congress of World Union of Wound Healing Societies, Italy 2016.9.28.

落合博子, 貴志和生, 梅澤明弘. 分化細胞(間質細胞)を用いた皮膚創傷治療, Annual meeting for society of plastics and regenerative science, 台湾 2016.11.4.

Hiroko Ochiai, Kazuo Kishi, Aiko Oka, Mari Nishimon, Eri Hirata, Shiho Watanabe, Akihiro Umezawa.

Mesenchymal Stem Cell Grafting is Effective for Skin Regeneration in Acute Cutaneous Wounds of Pigs. 11th World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell. Singapore.2017.11.15.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

落合 博子 (OCHIAI, Hiroko)

国立病院機構東京医療センター・臨床研究センター・聴覚平衡覚研究部・再生医療研究室室長

研究者番号：6 0 3 7 4 1

