

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04939

研究課題名(和文) 下肢虚血性潰瘍に対する低酸素刺激を加えた細胞シートによる治療法の開発

研究課題名(英文) Development of transplantation therapy using hypoxically preconditioned cell sheets for lower limb ischemic ulcers

研究代表者

濱野 公一 (HAMANO, Kimikazu)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60263787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では末梢循環障害による難治性皮膚潰瘍に対して、成長因子を分泌する末梢血単核球とコラーゲンを分泌する線維芽細胞シートを共培養して作製した細胞混合シートの移植法を開発したものである。この細胞混合シートは、末梢血単核球が分泌する成長因子が線維芽細胞に作用することで、線維芽細胞が分泌するVEGFの産生量が飛躍的に上昇し、皮膚潰瘍の早期の創傷治癒を促すことが示唆された。また、皮膚全層欠損に移植された細胞混合シートは皮膚全層欠損が治癒した組織には残存しないことが確認されている。本研究において、この細胞混合シート移植治療は、難治性皮膚潰瘍に対する新しい治療法となる可能性を有していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, cell-mixed sheets were consisting of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) secreting growth factors and fibroblasts secreting collagens on cutaneous skin ulcers. Growth factors secreted from PBMCs increased the production of VEGF protein in Fibroblasts. cell-mixed sheets transplanted into full-thickness skin defects promoted the wound healing compared to no treatment in mice model. Cell-mixed sheets transplanted into full-thickness skin were not detected in tissues after healing in syngeneic transplantation models. Our data suggested that cell-mixed sheets might be a new treatment method for cutaneous skin ulcers.

研究分野：再生医療、心臓血管外科学

キーワード：細胞シート 再生医療 難治性皮膚潰瘍

1. 研究開始当初の背景

重症の閉塞性動脈硬化症 (ArterioSclerosis Obliterans; ASO) に対しては、血管内治療やバイパス手術による血行再建が最良の治療法であるが、血行再建が困難な症例や適応とならない症例も少なからず存在する。また血行再建が成功したとしても、局所の循環障害が残存した場合、皮膚潰瘍が難治性となることがある。また一部の施設では、血行再建が適応とならないような症例に対し、骨髄細胞や末梢血単核球の移植による血管新生療法が試みられ、一定の効果は認めるものの移植細胞の「生着率の低さ」や「血管成長因子の産生能の低さ」といった問題点が指摘されており、新しい治療法の開発が望まれる。

我々の施設でも、循環器疾患に対する骨髄細胞移植療法を長年に渡り研究してきており、1999年には重症下肢虚血に対する自己骨髄細胞移植治療を世界に先駆けて実施した (Cell Transplant. 2002;11(8):747-52)。その後、移植細胞種を骨髄細胞から末梢血単核球に変更して治療の低侵襲化に成功し、近年では、末梢血単核球を移植直前に低酸素条件に晒すのみで、“成長因子産生能の増強”や“酸化ストレス抵抗性の獲得”等を誘導する「低酸素プレコンディショニング法」を考案した (Biochem Biophys Res Commun. 2014 Feb 14;444(3):370-5)。同法により治療効果は向上したが、十分な血流改善が得られない症例や潰瘍治癒までに長期間を要する症例などが存在し、依然として重症虚血障害の根治には至っていない。

近年、標的部位での生着率を向上させる技術として「細胞シート」が開発され、様々な疾患モデルにおいて効果が認められている。我々は、重症下肢虚血における難治性皮膚潰瘍にも同技術が応用出来るのではないかと考え、“細胞成長因子を分泌する末梢血単核球”と“皮膚の基質となる線維芽細胞”の二種類の細胞種で構成される細胞混合シートによる移植治療の開発を行うことにした。

2. 研究の目的

(1) 細胞混合シート作製法の確立および血管新生因子分泌能の解析

(2) 動物モデルにおける細胞混合シートの有効性の解析

(3) 移植後の細胞混合シートの生体における残存性の解析

3. 研究の方法

(1) 細胞混合シート作製および細胞培養条件

線維芽細胞は C57BL/6 マウスの尾先端約 1cm を採取し、コラゲナーゼ処理後、単離・培養した。末梢血単核球は C57BL/6 マウスの腹部大静脈から採血後に、Lympholyte®-M (CedarLane Laboratories Ltd) を用いて単離した。

細胞シート作製には、細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材 (セルシード社) の 24-well plate が使用された。細胞混合シートを作製する為に、線維芽細胞 1.25×10^5 個と末梢血単核球 2×10^6 個が共培養された。線維芽細胞シートを作製する為に、線維芽細胞 1.25×10^5 個が培養された。末梢血単核球のみの培養では 2×10^6 個が培養された。

培養条件として、通常の培養条件 (Normo) は、 37°C 、5% CO_2 、大気圧酸素濃度で 3 日間培養であり、低酸素の培養条件 (Hypo) は、 37°C 、5% CO_2 、大気圧酸素濃度で 2 日間培養後、 33°C 、5% CO_2 、2% O_2 で 1 日間培養した。マウスモデルを用いた治療実験では低酸素の培養条件 (Hypo) で培養された細胞シートが移植に用いられた。

(2) 培養上清中の成長因子測定

培養上清中の VEGF、TGF- β 1、PDGF-BB の濃度は mouse ELISA kits (R&D Systems) を用いて測定された。

リコンビナントタンパクは TGF- β 1 (R&D Systems, Inc.) と PDGF-BB (Sigma-Aldrich) が線維芽細胞に添加されて、48 時間後の培養上清中の VEGF の濃度が測定された。

(3) conditioned medium 解析

線維芽細胞 1.25×10^5 個および末梢血単核球 2×10^6 個が通常の培養条件 (Normo) で 48 時間培養され、その培養上清が回収され、そして遠心された。その遠心後の培養上清が conditioned medium として用いられた。末梢血単核球由来の conditioned medium が、線維芽細胞の培養容器に添加された。48 時間培養の培養上清中の VEGF 濃度が ELISA で測定された。また、48 時間培養後の線維芽細胞における VEGF、Collagen I、Collagen III、 α -SMA、Axin2 の mRNA レベルが qPCR で解析された。

(4) マウスモデルを用いた治療実験

ストレプトゾトシン (Sigma-Aldrich) 投与により血糖値が 300 mg/dl 以上の C57BL/6 マウスの背部を外科的手法で皮膚全層欠損させたものを以下の ~ の群で使用した。また、血糖値が正常である C57BL/6 マウスの皮膚全層欠損モデルを正常とした。治療群は以下の 5 群である。正常群、コントロール群、線維芽細胞シート移植群、細胞混合シート移植群。

(5) 移植した細胞シート残存性の解析

ストレプトゾトシン (Sigma-Aldrich) 投与により血糖値が 300 mg/dl 以上の雌の C57BL/6 マウスの背部を外科的手法で皮膚全層欠損させ、その箇所には雄の C57BL/6 マウス由来の細胞混合シートを移植した。移植 21 日後に、移植により治癒した組織を採取し、その組織から AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出した。内部コントロールである ACTB、X 染色体特異的 DNA である ZFX、Y 染色体特異的 DNA である ZFY1 および ZFY2 に対するプライマーを用いて PCR 解析が行われた。また、雄および雌由来の線維芽細胞から抽出されたゲノム DNA が PCR 解析のこ

ントロールとして用いられた。

4. 研究成果

(1) 細胞混合シートが分泌する VEGF 濃度
末梢血単核球が分泌する VEGF 濃度は ELISA の検出限界値以下であった。線維芽細胞シートが分泌する VEGF 濃度は Normo 条件では 248 ng/mL、Hypo 条件では 357 ng/mL であった。細胞混合シートが分泌する VEGF 濃度は Normo 条件では 957 ng/mL、Hypo 条件では 1337 ng/mL であった (図 1)。細胞混合シートの VEGF 分泌能は線維芽細胞シートよりも高く、また、Hypo 条件での培養は VEGF 分泌能を高める結果であった。

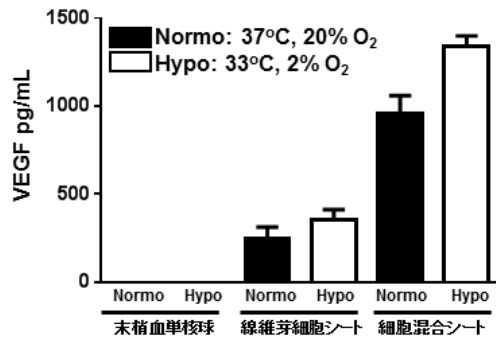


図1 細胞混合シートのVEGF分泌能

(2) VEGF 分泌能を上げる因子の探索

末梢血単核球の conditioned medium を線維芽細胞に与えて培養 48 時間後の線維芽細胞の培養上清中の VEGF 濃度が測定された。新鮮な末梢血単核球の培地を与えて培養した線維芽細胞の培養上清であるコントロールと比べて、末梢血単核球由来の conditioned medium では、線維芽細胞が分泌する VEGF の濃度が上昇した (図 2)。

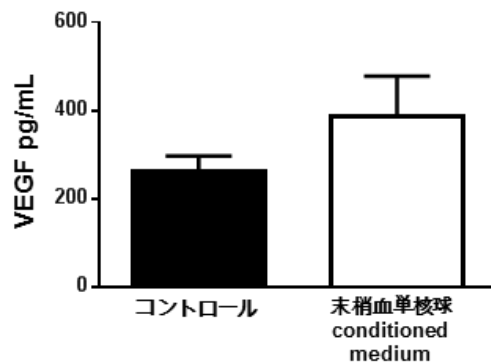


図2 conditioned mediumによる線維芽細胞のVEGF分泌能

図 2 の結果は、末梢血単核球が分泌する成長因子が線維芽細胞の VEGF 分泌能を上げることが示唆したことから、線維芽細胞からは分泌量が低いまたは分泌されないが、末梢血単核球から分泌される成長因子の探索を行った。末梢血単核球から分泌される TGF-β1 および PDGF-BB の分泌量は線維芽細胞と比べ

て高い値であった (図 3)。

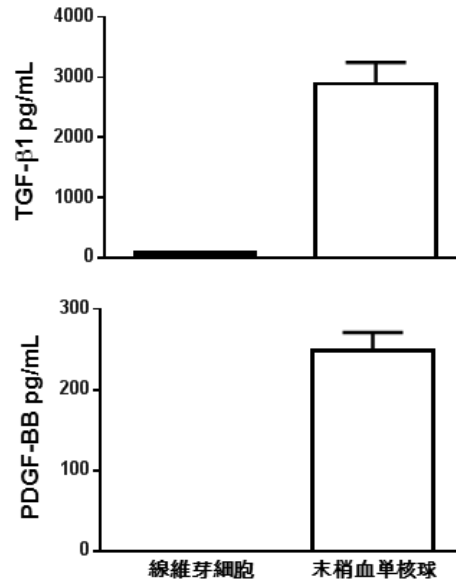


図3 末梢血単核球が分泌する成長因子

次に、TGF-β1 および PDGF-BB のリコンビナントタンパクを 250 - 20000 pg/mL の濃度で線維芽細胞に与えて 48 時間培養後の、培養上清中の VEGF 濃度が ELISA で測定された。TGF-β1 および PDGF-BB のリコンビナントタンパクの濃度に比例して、線維芽細胞が分泌した VEGF 濃度は高い値であった (図 4)。

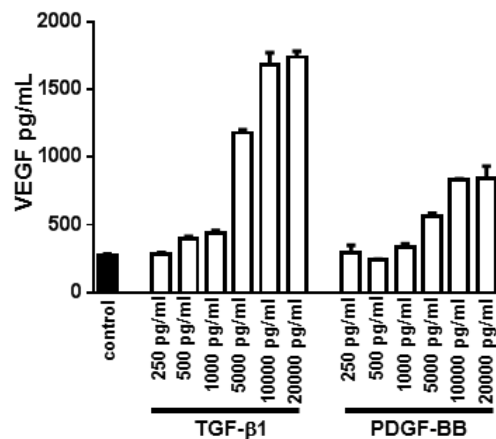


図4 TGF-β1およびPDGF-BBによる線維芽細胞のVEGF分泌能

末梢血単核球が分泌する成長因子が線維芽細胞に与える影響を解析するために、末梢血単核球の conditioned medium を線維芽細胞に与えて培養 48 時間後の線維芽細胞における発現解析を qPCR で行ったところ、末梢血単核球の conditioned medium は線維芽細胞の VEGF、Collagen I、Collagen III、α-SMA、AXIN-2 の mRNA の発現レベルを上昇させた (図 5)。

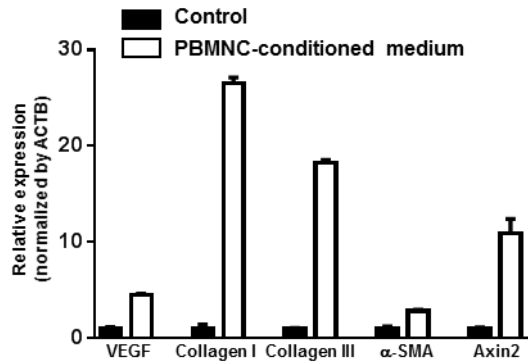
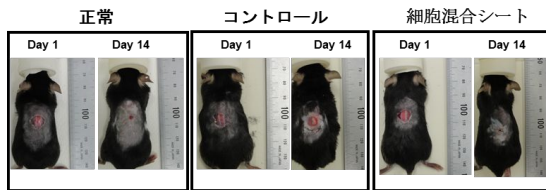
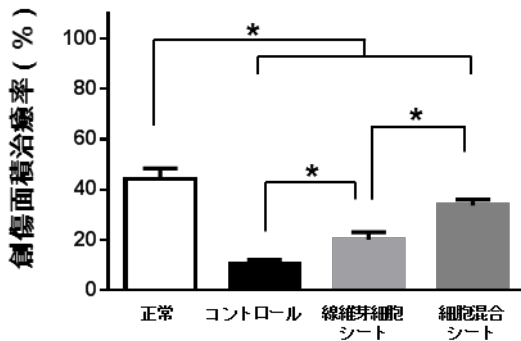


図5 末梢血単核球 conditioned medium による線維芽細胞における mRNA 発現解析



治療開始7日後



治療開始14日後

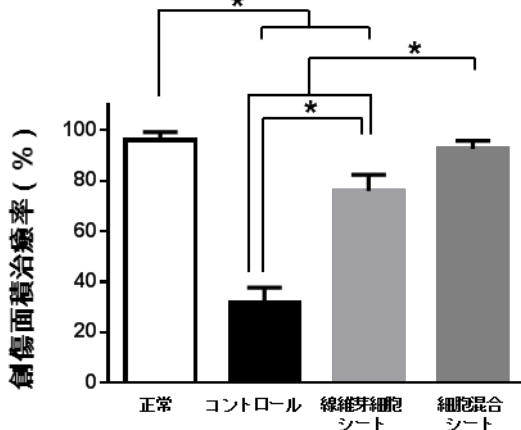


図6 細胞混合シートの動物モデルにおける治療効果

(3) 細胞混合シートの治療効果

糖尿病マウスの背部に作製した皮膚全層欠損に対して、無治療であるコントロール群、線維芽細胞シート移植群、細胞混合シート移植群で治療が行われた。正常マウスにおいては無治療で皮膚全層欠損の治癒が観察された。治療開始7日後において、細胞混合シート移植群では、コントロール群および線維芽細胞シート移植群よりも有意に創傷面積治癒

癒率が高い結果であったが、正常群よりも創傷面積治癒率が低い結果であった。治療開始14日後において、細胞混合シート移植群では、コントロール群および線維芽細胞シート移植群よりも有意に創傷面積治癒率が高い結果であり、正常群と比べて創傷面積治癒率に差はなかった(図6)。

(4) 移植した細胞混合シートの残存の有無
糖尿病マウスの背部に作製した皮膚全層欠損に対して、移植した細胞混合シート移植が治癒した組織に残存しているか否かを解析する為に、雌のマウスに対して雄由来の細胞混合シートを移植して21日後の治癒した組織において雄由来細胞のゲノムの有無がPCRで解析された。X染色体特異的DNAであるZFXは治癒した組織、雄由来線維芽細胞、雌由来線維芽細胞のゲノムDNAにおいて検出された。雄特異的であるY染色体にコードされているZFY1およびZFY2は雄由来線維芽細胞において検出されたが、治癒した組織および雌由来線維芽細胞のゲノムDNAにおいては検出されなかったことから、移植した細胞混合シートは治癒した組織には残存していないことが示唆された(図7)。



図7 移植した細胞混合シートの残存の有無

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 12 件)

Takahiro Mizoguchi, Koji Ueno, Yuriko Takeuchi, Makoto Samura, Ryo Suzuki, Tomoaki Murata, Tohru Hosoyama, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano, Treatment of Cutaneous Ulcers with Multilayered Mixed Sheets of Autologous Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells, Cell Physiol Biochem, 査読有, 47(1), 2018, 201-211, doi: 10.1159/000489767.

Yuriko Takeuchi, Koji Ueno, Takahiro Mizoguchi, Makoto Samura, Takasuke Harada, Atsunori Oga, Tomoaki Murata, Tohru Hosoyama, Noriyasu Morikage,

Kimikazu Hamano, Development of Novel Mouse Model of Ulcers Induced by Implantation of Magnets, Sci Rep, 査読有, 7 2017, 4843, doi: 10.1038/s41598-017-05250-y
Yuriko Takeuchi, Koji Ueno, Takahiro Mizoguchi, Makoto Samura, Takasuke Harada, Atsunori Oga, Tomoaki Murata, Tohru Hosoyama, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano, Ulcer healing effect of autologous mixed sheets consisting of fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells in rabbit ischemic hind limb, Am J Transl Res, 査読有, 9, 2017, 2340-2351.
Makoto Samura, Tohru Hosoyama, Yuriko Takeuchi, Koji Ueno, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano, Therapeutic strategies for cell-based neovascularization in critical limb ischemia, J Transl Med, 査読有, 15, 2017, 49, doi:10.1186/s12967-017-1153-4.
Koji Ueno, Yuriko Takeuchi, Makoto Samura, Yuya Tanaka, Tamami Nakamura, Arata Nishimoto, Tomoaki Murata, Tohru Hosoyama, Kimikazu Hamano, Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts, Sci Rep, 査読有, 6, 2016, 28538, doi: 10.1038/srep28538.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 上野耕司、溝口高弘、藤田陽、佐村誠、濱野公一、難治性皮膚潰瘍に対する積層化細胞シート作製の基礎的検証、第 17 回日本再生医療学会総会、2018.3.21-23、神奈川県横浜市
2. 溝口高弘、上野耕司、竹内由利子、佐村誠、西本新、末廣晃太郎、森景則保、美甘章仁、濱野公一、難治性皮膚潰瘍に対するフィブリングループを用いた細胞移植治療の検討、第 17 回日本再生医療学会総会、2018.3.21-23、神奈川県横浜市
3. 溝口高弘、上野耕司、佐村誠、濱野公一、難治性皮膚潰瘍に対するヒト自己細胞混合シートの作製法の検討、第 17 回日本心臓血管外科再生治療研究会、2018 年 2 月 19 日、三重県津市
4. 上野耕司、竹内由利子、溝口高弘、佐村誠、細山徹、濱野公一、難治性皮膚潰瘍に対する線維芽細胞シートの Collagen III を活性化させる因子の基礎的検証、第 16 回日本再生医療学会総会、2017.3.7-9、宮城県仙台市
5. 溝口高弘、上野耕司、竹内由利子、佐村誠、西本新、細山徹、森景則保、美甘章仁、濱野公一、難治性皮膚

潰瘍に対する細胞シートの積層法の検討、第 16 回日本再生医療学会総会、2017.3.7-9、宮城県仙台市

6. 竹内由利子、上野耕司、溝口高弘、西本新、細山徹、森景則保、濱野公一、末梢血単核球と線維芽細胞からなる細胞混合シートを用いた難治性皮膚潰瘍治療の臨床応用に向けて、第 47 回日本心臓血管外科学会総会、2017.2.27-3.1、東京都
7. 上野耕司、竹内由利子、佐村誠、田中裕也、西本新、細山徹、濱野公一、アロ細胞混合シートを用いた難治性皮膚潰瘍治療の検討と移植された細胞シートの残存有無の検証、第 15 回日本再生医療学会総会、2016.3.17-19、大阪府大阪市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 末梢血単核球又は末梢血単核球より分泌される因子を伴う線維芽細胞を含む細胞シート

発明者: 濱野公一、細山徹、上野耕司

権利者: 国立大学法人山口大学

種類: 特許

番号: 2016-556612

出願年月日: 2015.10.28

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱野 公一 (HAMANO, Kimikazu)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60263787

(2) 研究分担者

森景 則保 (MORIKAGE, Noriyasu)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 50335741

細山 徹 (HOSOYAMA, Tohru)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 20638803

上野 耕司 (UENO, Koji)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30736070

李 桃生 (LI, Tao-sheng)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
研究者番号：50379997

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし