

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18908

研究課題名(和文) 糖尿病性潰瘍を骨髄から治すー骨髄自律神経修復による根治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a radical therapy for diabetic ulcer focusing on mesenchymal cells in adipose tissue

研究代表者

北 愛里紗(Kita, Arisa)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20642185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性潰瘍は再発しやすく難治である。骨髄間葉系幹細胞および脂肪前駆細胞は、糖尿病患者では本来の働きが阻害されることが知られているが、本研究ではこの原因として、皮下脂肪内の間葉系細胞における細胞老化に着目した。結果、糖尿病マウスおよびヒトの創傷治癒過程では、正常で生じるタイミングでは細胞老化が起こらず、創傷治癒後期に老化細胞が蓄積していた。また、老化細胞の分泌因子をメンブレン抗体アレイにて解析したところ糖尿病マウスではCCL-11、MMP-3などが増加しており、線維芽細胞の増殖を抑制することを確認した。以上より糖尿病性潰瘍の創傷治癒障害に老化細胞の異常性が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、皮下脂肪における細胞老化の異常が糖尿病性潰瘍に関与していることが明らかになった。細胞老化に介入して創傷治癒を促進するという新しい治療戦略は、難治性であり肢切断のリスクもある糖尿病性潰瘍に、より根治的な治癒をもたらす可能性があり、社会的意義は非常に大きい。また、糖尿病性潰瘍に関する研究では皮膚の異常に着目するものが多い中で、脂肪組織に焦点を当てたことが本研究の特色である。脂肪組織は皮下や内臓周囲、骨髄内など全身に分布している。脂肪組織における細胞老化の異常性を明らかにすることで、糖尿病性潰瘍のみならず、慢性炎症によって生じる様々な疾患に対する新しい治療法の開発に繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)：Diabetic ulcers are prone to recurrence and are intractable. Bone marrow mesenchymal stem cells and adipose progenitor cells are known to be impaired in diabetic patients. In this study, we focused on cellular senescence in mesenchymal cells in subcutaneous fat as a cause for this. The results showed that during the wound healing process in diabetic mice and humans, cellular senescence did not occur at the timing that occurs normally, but senescent cells accumulated in the late stages of wound healing. Membrane antibody array analysis of secreted factors of senescent cells showed that CCL-11, MMP-3, and other factors were increased in diabetic mice and inhibited fibroblast proliferation. These results suggest that abnormalities of senescent cells may be involved in impaired wound healing of diabetic ulcers.

研究分野：細胞老化、糖尿病性潰瘍、創傷治癒

キーワード：細胞老化 SASP 脂肪 糖尿病性潰瘍 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性潰瘍は、一時的に治癒が得られたとしても、易感染性や組織の脆弱性、創傷治癒阻害などさまざまな要因にて再発、難治化しやすいとされる。難治化の要因として、骨髄由来の間葉系細胞の機能低下があることは既に報告されている。また、慢性炎症が創傷治癒を阻害することは知られているが、骨髄間葉系細胞の機能低下と慢性炎症との関係性には不明な点が多い。

本研究では、骨髄間葉系細胞の細胞老化と慢性炎症に着目した。細胞老化とは細胞にダメージが加わったとき、異常増殖を防ぐ生体防御機構で、自身の増殖を止めるとサイトカインや成長因子など様々な因子の分泌現象 (Senescence associated secretory phenotypes; SASP) を起こす。この SASP によって、老化細胞は免疫細胞を動員し、自らを貪食させ、組織の修復・再生を促す。特に、創傷治癒において細胞老化は不可欠な現象として知られる。一方で、糖尿病などの慢性疾患では、老化細胞が病変部に蓄積することで、慢性炎症の原因となることも報告されている。これら一連の研究背景から、糖尿病創傷治癒過程における細胞老化動態を詳細に解析することで、糖尿病における難治性潰瘍形成メカニズムの解明につながると考えた。

2. 研究の目的

正常な創傷治癒と糖尿病性潰瘍における創傷治癒を対比し、老化細胞の機能と局在を明らかにすること

3. 研究の方法

非糖尿病モデルマウス (db/+) と糖尿病モデルマウス (db/db) を用いて創傷治癒過程における老化関連遺伝子発現を解析した。

創傷治癒作成前、作成後 2 日目、8 日目の 3 ポイントで、創傷部の組織を皮膚と皮下脂肪に分けて RNA を抽出し、qPCR を行った。p53, Cdkn2b, IL-2, Tgfb1, Serpine1, Serpine2 の発現について主成分分析したところ、糖尿病モデルマウスの皮下脂肪組織における細胞老化因子の発現パターンは、非糖尿病モデルの場合と大きく異なっていた。皮膚の場合は非糖尿病と糖尿病モデルとで類似した発現パターンであった。以下の解析は皮下脂肪組織に着目して行った。

組織学的に創部皮下脂肪組織の間葉系老化細胞 (PDGFR-⁺p15⁺) を定量したところ、非糖尿病マウスでは創傷初期に細胞老化因子の発現が一過性に亢進し、その後低下する一方、糖尿病マウスでは細胞老化因子の発現が経時的に増加した。

糖尿病および非糖尿病患者の熱傷創部皮下脂肪組織でも、同様に間葉系老化細胞を定量したところ、糖尿病患者から採取した検体では経時的に老化細胞が蓄積することがわかった。

老化細胞が蓄積した糖尿病モデルマウス由来の皮下脂肪が実際に創傷治癒に悪影響を及ぼすか確認するために、正常マウスの皮下に移植して創傷治癒経過を観察したところ、正常マウス由来の皮下脂肪を移植した場合と比べて上皮化が遅延した。

なぜ糖尿病の皮下脂肪に蓄積した老化細胞が創傷治癒を阻害するかを明らかにするため、脂肪組織の培養上清に含まれるサイトカインをメンブレンアレイにて解析した。非糖尿病マウスでは創傷治癒早期 (2 日目) に Adiponectin, Ang2, CCL2, CRP, CXCL2, IL1Ra, MMP9, VEGF, CCN4 が高発現し、後期 (8 日目) には VEGF, IGFBP, SerpinF1 が高発現していた。糖尿病マウスでは早期に IL11, CCL11, MMP3 が高発現し、後期には CCL6, CCL11, CXCL2 が高発現していた。

脂肪組織の培養上清をマウスの皮膚線維芽細胞に添加し、創傷治癒アッセイを行ったところ、糖尿病マウス由来の培養上清は創閉鎖を有意に遅らせることがわかった。

4. 研究成果

本研究では、皮下脂肪の細胞老化が一過性に起こることで、サイトカインや成長因子など分泌因子を産生し、正常皮膚の創傷治癒を促進することを明らかにした。これらの結果は、創傷治癒に、特に皮下脂肪における細胞老化の働きが重要であることを示すものとなった。

臨床上、正常な皮下脂肪は創傷治癒に重要であると考えられてきた。しかしながら、皮下脂肪が一体どのような働きをしているのか、その機能については十分明らかにされてこなかった。今回我々が見出した、皮下脂肪における「細胞老化」という創傷治癒における新たな機能は、創傷治癒を促進するメカニズム解明として、形成外科学領域に新たな知見をもたらすものとなった。

一方、糖尿病では皮下脂肪の細胞老化が遅延すると同時に、細胞老化に伴って生じるサイトカインや成長因子などの分泌因子が変化して慢性炎症の病態を促進し、創傷治癒を阻害することがわかった。糖尿病性潰瘍は、形成外科医にとってチャレンジングな疾患であり、しばしば制御困難となり、難治性に至る。また、一旦は潰瘍が治癒しても、併発する虚血性変化や神経障害、組織の脆弱性により再発を繰り返すことから、革新的な治療法の開発が国際的に望まれてきた。近年、老化細胞を除去する「老化細胞除去薬(セノリティクス薬)」が注目を集めており、特発性肺線維症や慢性腎臓病など治療が困難な慢性炎症の制御を目的として、治験が開始されているものもある。本研究の成果は、糖尿病性潰瘍の新たな治療戦略として、脂肪組織で異常に蓄積する老化細胞を新たな治療ターゲットとして、セノリティクス薬が候補となりうることを示した。これらは、糖尿病性潰瘍の病態解明と同時に、従来の治療では完治できなかった難治性潰瘍の治療法開発に繋がる、極めて意義深い成果となったと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kita Arisa, Saito Yuki, Miura Norihiro, Miyajima Maki, Yamamoto Sena, Sato Tsukasa, Yotsuyanagi Takatoshi, Fujimiya Mineko, Chikenji Takako S.	4. 巻 5
2. 論文標題 Altered regulation of mesenchymal cell senescence in adipose tissue promotes pathological changes associated with diabetic wound healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03266-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Saito, Maki Miyajima, Sena Yamamoto, Norihiro Miura, Tsukasa Sato, Arisa Kita, Shogo Ijima, Mineko Fujimiya, Takako S Chikenji	4. 巻 11
2. 論文標題 Intrathecal Injection of Mesenchymal Stromal Cell Cultured on 3D Fiber Ameliorates Multiple Organ Damage in Murine Lupus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem cells translational medicine	6. 最初と最後の頁 644-658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/stcltm/szac021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kita Arisa
2. 発表標題 Diabetic wound impaired injury-induced transient senescence in adipose tissue that promotes the normal wound healing process
3. 学会等名 6th International Cell Senescence Association conference（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千見寺 貴子
2. 発表標題 間葉系間質/幹細胞が誘導する細胞老化-クリアランス-リモデリング連鎖は慢性腎不全の線維化を改善する
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------