

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18935

研究課題名（和文）健常人と糖尿病患者の脂肪組織由来幹細胞の外因性刺激効果検証と創傷治療応用の検討

研究課題名（英文）Exogenous Stimulation Effectiveness Verification of Adipose Tissue-Derived Stem Cells from healthy people and Diabetic Patients for Wound Care Application

研究代表者

松井 千裕（Matsui, Chihiro）

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：80815019

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は脂肪組織由来幹細胞（ADSCs:Adipose Derived Stem Cells）を効果的に治療に用いるため、サイトカイン放出効果（パラクライン効果）の特性について詳細な検証を行った研究である。我々はADSCsのパラクライン効果を高めることが知られているb-FGFをADSCsに投与し、オートクライン効果が発生する前段階で放出されたサイトカインを合計181種類調査した。最終的にCXCL1とIL8というサイトカインが人種、性別、年齢問わず放出され、同様の結果が糖尿病患者のADSCsでも見られた。またCXCL1とIL8が創傷治療に不可欠な血管新生とリンパ管新生を促進することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADSCsを用いた治療についてはこれまで多くの論文が報告されており、その効果をb-FGFが促進することも知られてきたが、これまで「何の成分が効果的であるから治療に役立つ可能性があるのか」が不明瞭なままだった。またこれまでADSCsをb-FGFで刺激した際に得られる反応に対し、創傷治療に関連する181種類もの遺伝子に関する検証は行われておらず、詳細な検証が行われたのは本研究が初めてとなる。そのため漠然と役立つという形で定義されていたADSCs治療に関し、具体的に創傷治療に効果のあるサイトカインを同定したことは、今後の再生医療の発展に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, the characteristics of the cytokine-releasing effect (paracrine effect) of adipose-derived stem cells (ADSCs) were examined in detail in order to effectively apply them to therapeutic use. In the first step, we administered b-FGF, which is known to enhance the paracrine effect of ADSCs, and verified by RT-PCR a total of 181 cytokines released in the preliminary stage of autocrine effect. In the second step, we used ADSCs of various ages, genders, and races to confirm by RT-PCR whether b-FGF stimulation caused the release of CXCL1 and IL8, which proved that the release of CXCL1 and IL8 could be confirmed regardless of race, age, or gender. The same experiment was also performed with ADSCs collected from diabetic patients and the same response was obtained. In the third step, to investigate the effect of CXCL1 and IL8 on wound healing, we conducted a validation on angiogenesis and lymphangiogenesis and found that both were promoted.

研究分野：脂肪組織由来幹細胞

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 サイトカイン パラクライン効果 リンパ管新生 血管新生

1. 研究開始当初の背景

再生医療における脂肪組織由来幹細胞の役割としてはこれまで幹細胞自身の有する多分化能により細胞自身が目的とする再生組織に分化する効果、及び幹細胞自身が分泌する種々の液性因子が周辺の細胞に働きかけ、細胞の増殖、遊走、分化を介した再生誘導を促すといった、いわゆるパラクライン効果によるものの2つが存在すると言われてきた。しかし、実際には幹細胞の分化よりも、むしろ後者のパラクライン効果のほうが組織再生により寄与している可能性を示す研究成果が多く散見され、最近では培養上清中の幹細胞由来成長因子のみを投与しても幹細胞投与と遜色のない再生効果が獲得できる報告も出てきた。その中で我々のチームは、投与する幹細胞に予め別の増殖因子で外因性の刺激を与え、増殖因子の放出力を高めてより強力なパラクライン効果を引き出し、単に幹細胞のみを投与したときと比較して極めて効果的な頭蓋骨組織再生現象および末梢血管再生現象が起こることを発見し、論文報告を行った。そこで、予め外因性増殖因子で刺激を加えてパラクライン効果を最大限発揮させることのできるよう、最適化した状態の幹細胞を投与できれば、多くの組織再生、創傷治癒促進を含めた疾患治療がより一層効果的に達成可能となるのではないかと仮説を立てるに至った。また既存治療では非常に難治性であることが知られている糖尿病性の潰瘍や創傷治癒遅延に対してにも効果的であるかを検証できた場合、非常に多く存在する糖尿病症例に対しても効果的な治療の選択肢になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では ADSCs に対する b-FGF 刺激によるサイトカイン放出に関して、これまで明らかでなかったサイトカインの詳細な種類に関して調査を行い、具体的にどのようなサイトカインが創傷治癒の促進を起こしているのかを突き止めることで、最適な幹細胞補充治療の開発に結び付けるための裏付けをとること、また糖尿病患者脂肪組織幹細胞に関して外的刺激による内因性増殖因子の産生や、それによるパラクライン効果を健常人の脂肪組織幹細胞と比較する事を目的とした。幹細胞補充療法の本質は、必ずしも細胞の分化能による組織再生とは限らず、むしろ幹細胞の持つ“増殖因子放出媒体”としての役割のほうが、より組織再生において重要な側面を持つとされている。従って、その機能を最大限に活かすための検証において、動物実験ではなく、ヒト幹細胞、糖尿病患者と健常人との比較を行ったデータが得られることが本研究では重要であり、糖尿病性潰瘍および健常人の創傷治癒に対する新たな治療法の確立に役立つデータを提供できると考えた。

3. 研究の方法

サイトカインの同定を行うため、ヒト ADSCs (健常人、糖尿病患者) を b-FGF で刺激し、そのサイトカインの上昇に関して RT-PCR、ELISA で検証する。得られた遺伝子情報をもとに、そのサイトカインが創傷治癒において重要な血管新生、リンパ管新生に対してどのような影響を示すかを確認した。また線維芽細胞の遊走に対しての影響も調査を行う。

4. 研究成果

LONZA 社から健常人の ADSCs のリストを入手し、その中でも細胞の条件が良いものをスクリーニング用を選び、b-FGF 刺激を行った後に最初のサイトカインの上昇が発生するタイミングを確認した。

我々の実験では4時間目の上昇が安定していたことから、4時間目の時点で創傷治癒に関連する合計181種類のサイトカインに関してRT-PCRを行ったところ、IL1B, HBEGF, CXCL1, IL8の4つの遺伝子が安定上昇を示した。次にELISAで確認を行ったところ、CXCL1とIL8の上昇がみられた。

そのため複数の人種、年齢、性別のADSCsでCXCL1, IL8に関して同様の実験を行い、RT-PCRで検証したところ、人種、年齢、性別問わず同様にCXCL1とIL8の上昇が確認された。また糖尿病患者から採取されたADSCsでも同様の結果であった。

このデータをもとに、HUVECとTIME-GFP, HDLECの細胞を用いて、血管新生とリンパ管新生に関しTube formation assayを施行した。またHUVECとTIME-GFPについてはCXCL1とIL8の中和抗体を用いて、CXCL1とIL8が阻害された場合の影響を検証したところ、この2つのサイトカインが中和された場合血管新生が阻害されることを証明した。

また線維芽細胞の Migration assay に関しては、CXCL1 と IL8 両方共遊走能を促進させた。

以上の成果から、ADSCs を b-FGF で刺激した場合オートクライン効果の影響が少ない培養 4 時間目では、人種、性別、年齢問わず CXCL1, IL8 の上昇がみられ、さらには糖尿病患者でも同様の結果となったこと、この 2 つのサイトカインは創傷治癒を促進することが考えられ、健常人、糖尿病患者問わず、これらのサイトカインの放出を増強させた ADSC s は創傷治療に対して効果が高い可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chihiro Matsui	4. 巻 Volume 9 - Issue 10S
2. 論文標題 Cytokines Released from Human Adipose-tissue Derived Stem Cells By b-FGF Stimulation: Effects on Angiogenesis and Lymphatic Vessels Formation By IL-8 and CXCL1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery Global Open	6. 最初と最後の頁 p 124-125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/01.GOX.0000799740.60269.17	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Chihiro Matsui
2. 発表標題 Cytokines Released from Human Adipose-tissue Derived Stem Cells By b-FGF Stimulation: Effects on Angiogenesis and Lymphatic Vessels Formation By IL-8 and CXCL1
3. 学会等名 Plastic Surgery the Meeting 2022 (Atlanta, U.S.A) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Joseph M. Escandon
2. 発表標題 Paracrine Effect of bFGF-Stimulated Adipose Tissue-Derived Stem Cells:Angiogenesis and Lymphatic Vessels Formation By IL-8 and CXCL1
3. 学会等名 American Society for Reconstructive Microsurgery annual meeting 2023, Miami USA (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chihiro Matsui
2. 発表標題 Decoding the Paracrine Effect of bFGF-Stimulated Adipose Tissue-derived Stem Cells on Angiogenesis and Lymphangiogenesis
3. 学会等名 Plastic Surgery Research Council (PSRC) 68th Annual Meeting 2023, Cleveland, Ohio (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究協力者	小出 寛 (Koide Hiroshi) (70260536)	順天堂大学 (32620)	
研究協力者	水野 博司 (Mizuno Hiroshi) (80343606)	順天堂大学 (32620)	

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
---------	---------