

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09774

研究課題名(和文) 浄化濃縮幹細胞培養上清を利用した放射線障害組織に対する新たな再生治療法の確立

研究課題名(英文) Therapeutic effects of adipose-derived stem cells secretome on impaired wound healing in irradiated tissues

研究代表者

河野 由布子 (Kono, Yuko)

自治医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：40883913

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)：本研究では、限外ろ過法(Ultrafiltration)によるヒト間葉系幹細胞由来培養上清の浄化・濃縮が成功し、さらに浄化濃縮幹細胞培養上清による細胞・組織への修復再生効果について検証した。具体的に、ヒト脂肪由来幹細胞(adipose-derived stem cells, ASCs)の培養上清を限外ろ過法にて、サイトカインや増殖因子など有用因子を濃縮し、アンモニアを含む小分子有害物質を取り除いた。次に、体外実験にて浄化濃縮幹細胞培養上清の細胞増殖促能・遊走能・内皮細胞血管新生能を促進した。さらに、難治性潰瘍モデルマウスを用いて、幹細胞培養上清の創傷治癒促進効果について確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療において、移植幹細胞の定着・分化よりは、細胞が分泌するサイトカインや増殖因子などの効果が期待される。我々は、ヒト脂肪由来幹細胞(human adipose-derived stem cells, ASCs)の培養上清に注目し、独自で開発された浄化濃縮法を通して培養上清の浄化・濃縮が成功した。培養上清には細胞成分が含まれていないため、他家由来の培養上清でも投与可能となり、製剤化も容易である。世界中の実験室で毎日廃棄されている培養上清の量は膨大であり、廃棄物を再利用して治療に使えることができれば、その総量と恩恵は膨大である、エコロジーという観点からも画期的な研究計画である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we successfully detoxified and concentrated human mesenchymal stem cell-derived conditioned medium using a membrane-mediated ultrafiltration method. The detoxified and concentrated conditioned medium (dt-CCM), characterized in enriched cytokines and growth factors, but less in metabolite secreted by the mesenchymal stem cells, is a potential therapeutic tool in regenerative medicine. In vitro experiments demonstrated that dt-CCM promoted the cell proliferation, cell motility, and the tube-formation of the vascular endothelial cells. Moreover, application of dt-CCM promoted the wound healing in refractory ulcer mice.

研究分野：形成外科学

キーワード：再生医療 脂肪由来幹細胞 培養上清 浄化濃縮培養上清

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線治療を受ける患者数の年々増加とともに、放射線照射による組織の萎縮、線維化、虚血などの確定的かつ長期的な進行性病変が多く見られる。こうした慢性的な組織障害では、照射部位だけでなく、照射を受けた周囲組織全体で創傷治癒機構が破綻しているため、外科的治療に難渋する。

近年再生医療のアプローチとして、脂肪組織由来幹細胞や多血小板血漿を利用して難治性潰瘍の治療に応用しようという試みがあるが、細胞療法に対する厳しい法的規制や患者本人から採取が必要なこともあり、未だに普及に至っていないのが現状である。一方で、移植幹細胞そのものよりは、幹細胞の分泌因子による治療効果が大きいことが明らかになり、幹細胞由来の培養上清を利用した再生療法の開発に着目した。

2. 研究の目的

幹細胞培養上清には、幹細胞より分泌された生理活性物質(サイトカイン、増殖因子、血管新生因子、エクソソーム、酵素等)が含まれ、再生医療に用いられ、様々な難治性疾患に対する効果が期待されている。一方、培養上清には細胞代謝により産生された有害物質(アンモニア)も含まれており、そのままの利用では有効性を損ない、安全性にも問題がある。これを基づいて、我々の研究室では、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)より回収された培養上清の、有効成分を濃縮し有害物質を除去した「浄化濃縮幹細胞培養上清」製造法を開発し、特許申請した。本研究では、この「浄化濃縮幹細胞培養上清」の成分分析を行い、in vitroでの機能評価法を確立するとともに、慢性放射線潰瘍モデルを用いて有効性および安全性の検証を通じて、放射線障害組織に対する再生治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

1) 培養上清中有害物質を取り除く、有益因子を濃縮する方法の最適化

培養上清の浄化濃縮について：限外ろ過法を用いて培養上清から低分子有害物質(乳酸やアンモニアなど)を取り除く、さらに増殖因子などの有用成分を濃縮する。高機能浄化濃縮培養上清を調製するため、最適な限外濾過膜の選択について検討した。

浄化能の評価：浄化・濃縮後培養上清から有害な物質であるアンモニアが除去できたかについて確認する。サンプルは、培養上清、浄化濃縮後の培養上清、および浄化濃縮廃液、コントロールとして新鮮未培養培地を用いる。アンモニア濃度の測定では、富士ドライケム NX10N(富士フィルムメディカル株式会社)にて行う。

2) 浄化濃縮培養上清による細胞増殖効果の検証

培養上清、浄化濃縮培養上清を用いてASCsやヒト皮膚由来角化細胞、線維芽細胞を培養し、細胞増殖能をCCK-8 assayにて評価する。血管新生促進能を内皮細胞管腔形成実験にて解析する。細胞遊走能をscratch wound healing assayにて測定する。

3) 疾患動物モデルを用いて浄化濃縮培養上清による組織再生(肥沃化)効果・血管新生効果の検証および治療に最適なプロトコルの確立

放射線障害による難治性潰瘍モデルの作成は、マウスの背部皮膚に、総線量40Gy(毎週10Gy×4)の放射線を照射して3ヶ月後に、照射部位の皮膚欠損創を作成することで、難治性潰瘍を作る。浄化濃縮幹細胞培養上清が創傷治癒をどの程度促進するのか、組織再生、血管新生にどのような効果があるか、放射線障害マウスモデルに、ASC培養上清、浄化濃縮ASC培養上清を局注し、創傷治癒効果を評価し比較する。

4. 研究成果

肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor, HGF)は、細胞増殖、血管新生、組織の修復において重要な増殖因子の一つであり、近年再生医療領域において大きな注目が集まっている。これに基づいて、我々は、高機能幹細胞培養上清、すなわちHGFに富む・低アンモニア(またはアンモニア不含有)幹細胞培養上清の獲得に着目した。

(1) 培養上清から有害物質除去および有用因子の濃縮法を開発し、最適化する。

限外濾過法を用いて幹細胞培養上清の「濃縮」及び「浄化」を実現することができた。(図1) また、限外濾過工程に使われる限外ろ過膜の材質、公称分画分子量(normal molecular weight limit, NMWL)について検討し、浄化濃縮幹細胞培養上清の作製における最適な限外ろ過膜を確立し、実験室スケール浄化濃縮培養上清の製造が可能となった。

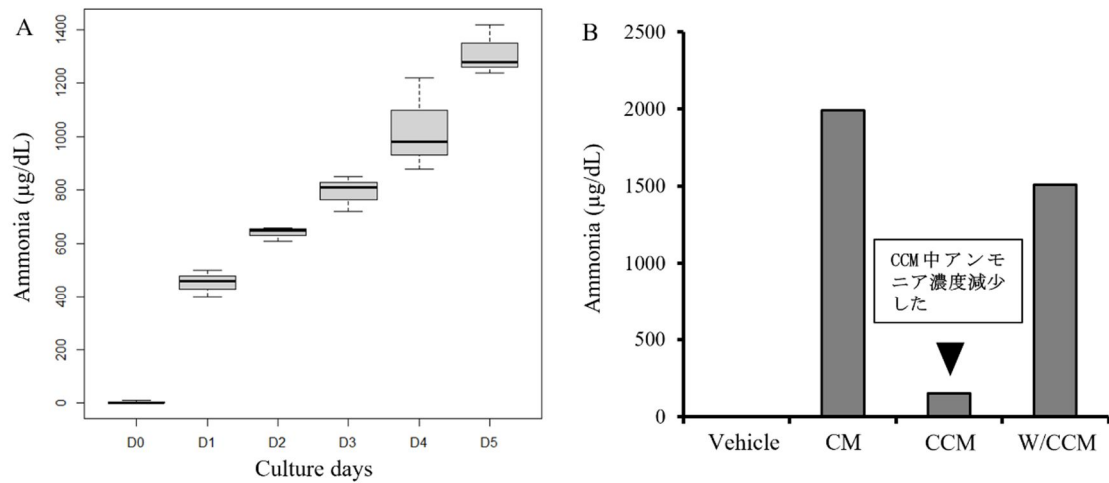


図1. A) 培養上清中アンモニア濃度の経時的变化 ヒト脂肪由来幹細胞 (ASC) を培養し、24時間毎に、5日間連続でCM中アンモニア濃度を測定した結果 B) 限外濾過法による培養上清中アンモニアの除去 CM, 培養上清、CCM, 浄化濃縮培養上清、W/CCM, 浄化濃縮後廃液

(2) in vitro で浄化濃縮培養上清の効果を検証する

浄化濃縮した培養上清では、ヒト表皮角化細胞 (normal human epidermal keratinocyte, NHEK)、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (normal human dermal fibroblast, NHDF)、ASCs の増殖を促進することが示した。NHEK および NHDF の遊走能も促進した。

浄化濃縮幹細胞培養上清では、血管内皮細胞の管腔形成能を誘導することが確認された。

(3) 放射線障害難治性潰瘍マウス (創傷治癒遅延モデル) を用いて、浄化濃縮幹細胞培養上清の創傷治癒へ有効性および安全性について評価した。放射線障害マウス群において、培地投与群と比較して、浄化濃縮幹細胞培養上清投与群では、創傷治癒を有意に促進した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	吉村 浩太郎 (Yoshimura Kotaro) (60210762)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

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