

令和 6 年 6 月 14 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：21K09796

研究課題名（和文）複数の幹細胞由来浄化濃縮培養上清を駆使した糖尿病性難治性潰瘍の新規治療法の開発

研究課題名（英文）A novel treatment for Diabetic Refractory Ulcers utilizing culture supernatant derived from multiple stem cells

研究代表者

三戸 那奈子 (Mito, Nanako)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：40797057

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能・移動能・内皮細胞血管新生促進能について検証した。さらに、糖尿病性難治性潰瘍マウスを用いて、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

糖尿病性潰瘍は、血行障害、神経障害、感染症による破壊性病変とされ、糖尿病の重大な合併症の一つである。糖尿病患者数の増加に伴い発症も増加しており、糖尿病性虚血下肢において壊死が進行すると、壊死組織の上流部を切断する治療選択を避けられず、20秒に1人の患者が下肢を切断されている（Lancet, 2008）。糖尿病性虚血下肢の治療は難渋し、効果的な治療法の開発が期待されている分野である。本研究では、糖尿病性難治性潰瘍の治療ツールとなりうる浄化濃縮幹細胞培養上清の精製法を確立、治療効果の検証を実施した。

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：脂肪間質幹細胞 血管内皮前駆細胞 培養上清 創傷治癒 難治性潰瘍

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性潰瘍は、血行障害、神経障害、感染症による破壊性病変とされ、糖尿病の重大な合併症の一つである。糖尿病患者数の増加に伴い発症も増加しており、糖尿病性虚血下肢において壊死が進行すると、壊死組織の上流部を切断する治療選択を避けられず、20秒に1人の患者が下肢を切断されている(Lancet, 2008)。糖尿病性難治性潰瘍部位の病的組織では、幹細胞が枯渇しており、潰瘍局所治療において、幹細胞を補充し、治癒に向かう環境を整えることが極めて重要である。

ヒト皮下脂肪組織に存在する間葉系幹細胞(adipose-derived stem cells, ASCs)は、骨髄由来幹細胞(BM-MSC)とほぼ同様の性質を有する。さらに脂肪組織は、低侵襲かつ大量に採取可能であり、再生医療において有用な細胞供給源として注目される。これまでに行われた細胞投与治療において、幹細胞そのものだけでなく、幹細胞の分泌因子による治療効果が大いことが明らかになり、幹細胞培養上清を利用した再生医療も、すでに臨床応用が始まっている。申請者は、培養上清の成分を詳細に調べた結果、細胞増殖因子や血管新生因子などの有益因子が有するが、その量が僅かである。一方、細胞が放出した数多くの代謝老廃物(アンモニア、乳酸など)が蓄積されているすなわち、培養上清をそのまま使用した場合は却って組織や細胞に危害を与えてしまうことが明らかになった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の培養上清に含まれる分泌因子の同定、ならびに限外濾過による培養上清の浄化濃縮を通じて、浄化濃縮幹細胞培養上清の精製が成功した。浄化濃縮幹細胞培養上清を利用した糖尿病性難治性皮膚潰瘍の有効性・安全性を検証する。

### 3. 研究の方法

1) 脂肪由来間葉系幹細胞の培養上清成分解析。分泌因子の網羅的解析を行い、それぞれの組成を可及的に明らかにする。

2) *In vitro* で脂肪由来間葉系幹細胞・血管内皮前駆細胞の浄化濃縮培養上清の有効性について検証する。コントロール群(未培養培地) 間葉系幹細胞ないし血管内皮前駆細胞由来の培養上清、浄化濃縮培養上清、浄化濃縮後廃液を用いて、細胞増殖能の検証は、CCK-8 assay 法で解析する。血管新生能を内皮細胞管腔形成実験(endothelial tube formation assay, ETFA)にて評価する。免疫調整能を蛍光活性化セルソーティング法(fluorescence-activated cell sorting, FACS)にて、浄化濃縮培養上清によるCD4+T細胞の増殖、分化能への影響を確認する。

神経細胞への保護効果は、神経突起の伸長によって評価する。

3) 脂肪由来間葉系幹細胞、及び血管内皮前駆細胞の浄化濃縮培養上清は、糖尿病難治性潰瘍治療の有効性を確認する。8週齢のdb/dbマウス(BKS.CgDock7m+/+Leprdb/+Leprdb/J)及びそのコントロールマウス(BKS.Cg-Dock7m+/+Leprdb/J)を馴化後、体重測定、血中グルコース濃度が300 mg/dl以上であることを確認する。9週齢のdb/dbマウス及びそのコントロールマウスに対し、創傷治癒モデル作成する。

### 4. 研究成果

(1) 増殖因子抗体アレイ法にて脂肪由来幹細胞(ASCs)由来の培養上清に含まれている増殖因子を同定した。(図1)

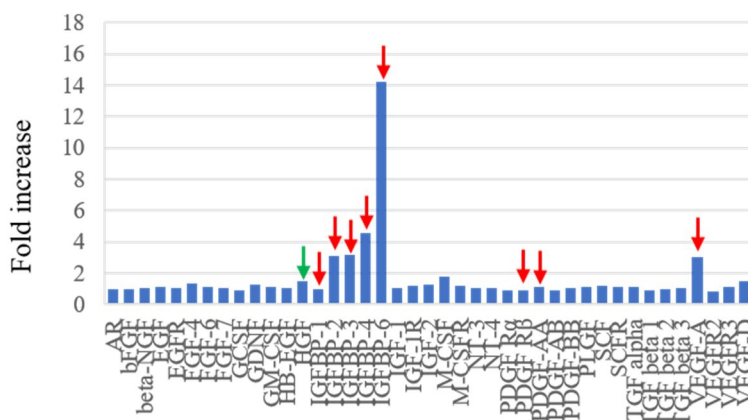


図1. 培養上清中増殖因子の同定

(2) 体外実験にて浄化濃縮培養上清による細胞増殖へ効果を検証した。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。さらに、NHEK および NHDF の遊走能も促進した。

さらに、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。(図2)

(3) 糖尿病マウス(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。糖尿病マウス群において、幹細胞培養上清未浄化群と比較して、浄化濃縮幹細胞培養上清投与群では、糖尿病マウスの創傷治癒を有意に促進した。

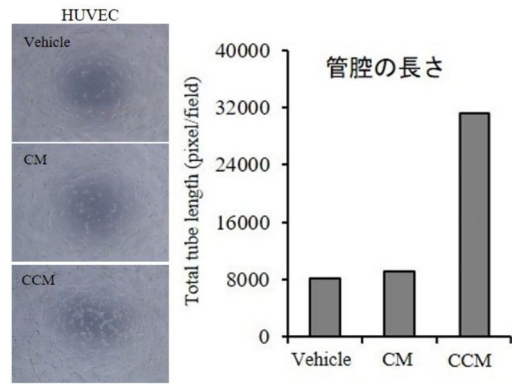


図2. 浄化濃縮培養液CCMによる内皮細胞管腔形成能への影響  
CM群と比較して、CCM添加群では内皮細胞の遊走とネットワーク形成能を有意に促進させた  
CM, 培養上清、CCM, 浄化濃縮培養上清

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