

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16913

研究課題名（和文）羊膜由来間葉系幹細胞を用いた透析足潰瘍の炎症制御

研究課題名（英文）Regulation of inflammation in dialysis foot ulcers using amnion-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

高橋 周子（Takahashi, Hiroko）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：00829434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：我が国における透析患者の増加は著しく、それに伴う難治性慢性創傷が社会的問題となっている。間葉系幹細胞は様々な疾患へ応用が広がっており、創傷治癒にも促進的に働く。本研究では末期腎不全患者と似た動態を示すKlothoマウスを用いて、羊膜由来間葉系幹細胞（Amnion-derived mesenchymal stem cell：AMSC）の局所投与による創傷治癒への影響を検証した。背部創傷モデルへのAMSCゲル外用は、創収縮を有意に促進した。潰瘍組織のリアルタイムPCRでは、KlothoマウスにおいてAMSC外用がマトリックスメタロプロテアーゼ3、9の発現を抑制することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

透析患者における難治性創傷は重症化しやすく、かつ治療抵抗性で、長期の入院や外来通院、複数回の外科的治療を要することが多い。時には大切断や敗血症に至る場合もあり、よりよい創傷治癒を目指すことは重要な課題である。本研究ではAMSCの局所投与によって、Klothoマウスを用いた透析創傷モデルにおける創傷治癒への影響を検証することを目指した。透析創傷におけるAMSCの有効性を証明できれば、今後の新規薬剤開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The number of patients requiring dialysis in Japan has been increasing significantly, leading to a rise in refractory chronic wounds such as critical limb ischemia and calciphylaxis, which have become a significant social issue. Mesenchymal stem cells have been extensively utilized in treating various illnesses and have demonstrated efficacy in promoting wound healing. In this investigation, we evaluated the impact of local administration of amnion-derived mesenchymal stem cells (AMSCs) on wound healing in Klotho mice, which possess kinetics comparable to patients with end-stage renal failure. To create a back wound model, AMSC hypoxic culture supernatant was solidified and applied topically to the ulcer site, which considerably enhanced the rate of wound contraction in Klotho mice. Ulcer tissue was collected and assessed through real-time PCR, which indicated that AMSC topical application suppressed the expression of MMP-3 and MMP-9 in Klotho mice.

研究分野：形成外科

キーワード：羊膜由来間葉系幹細胞 Klotho 透析 創傷 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における透析患者の増加は著しく、先進国の中で最も有病率が多いとされる。高齢化社会に伴い、透析患者の数は今後も増え続けると考えられており、透析施設の圧迫や医療経済の逼迫が懸念される。形成外科領域においても、透析患者に合併する重症下肢虚血やカルシフィラキシスなどの慢性創傷を治療する機会は増えているが、これらの創傷は重症化しやすく、かつ治療抵抗性で、長期の入院や外来通院、複数回の外科的治療を要することが多い。その背景には、持続する全身的・局所的な慢性炎症、全身血管・軟部組織石灰化、動脈硬化、皮膚血流低下、低栄養、合併症の存在などといった様々な病態が存在し、これらが複合的に作用することで創傷治癒遅延を引き起こすと考えられている。<sup>1</sup>時には大切断を余儀なくされる場合もあり、患者のQOLを著しく損なう。透析患者の慢性創傷の治療は、解決すべき重要な問題の1つである。

## 2. 研究の目的

当研究室では羊膜由来間葉系幹細胞 (Amnion derived mesenchymal stem cell: AMSC) の局所投与による創傷治癒促進効果について継続的に研究を行っており、糖尿病マウスの創傷にAMSCの培養上清をゲル化させて外用することで、AMSCの抗炎症作用・血管新生作用によって創傷治癒が促進されることを証明した。<sup>2,3</sup>今回我々はAMSCを透析患者の難治性創傷に応用することを考えた。透析患者の全身血管・軟部組織石灰化と類似した症状を呈する -Klotho ノックアウトマウスを用いた創傷モデルを作製し、AMSCゲルの外用によってその創傷治癒にどのような影響が及ぶのかについて、詳細に検証を行うことを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 創傷モデルの作製

5週齢 -Klotho KO マウス (雄) を用いて背部左右に直径 8mm の皮膚全層欠損創を作成し、皮膚潰瘍モデルを作製した。

### (2) Cell lines

AMSC は予定帝王切開患者に事前に同意を得た上で、分娩後に廃棄される胎盤から手作業で卵膜を剥離し、細胞を単離・培養することで得られる。本研究では北海道大学薬学部分子細胞医薬学 大西俊介教授より、継代培養した細胞を譲受した。細胞は 37℃、CO<sub>2</sub> 5% の環境下で培養した。

### (3) 培養上清の抽出

AMSC が Sub-confluent に達した段階で、Minimum Essential Medium (MEM) に培地を交換し、通常酸素下または低酸素下 (O<sub>2</sub> 1%) で 48 時間培養後、0.22 μm 細胞濾過フィルターを用いて培養上清を抽出した。

### (4) 外用ゲルの調製

培養上清または MEM にカルボキシメチルセルロース粉末を加え、7%カルボキシメチルセルロース溶液とすることで外用ゲルを作製した。

### (5) 創傷モデルへのゲル外用

上記 (1) で作製した皮膚潰瘍モデルに、(4) で作製した AMSC およびコントロールゲルを外用し、(A) Wild/control 群、(B) Wild/AMSC 群、(C) Klotho/control 群、(D) Klotho/AMSC 群の 4 群に分けた。潰瘍作製日を day0 とし、ゲル外用は day0、2、4、6 に行った。ゲル外用後は創部をフィルムで保護することで、ゲルの溢流および panniculus carnosus muscle による潰瘍の収縮を防止した。

### (6) 創傷閉鎖率の評価

経時的に潰瘍部の写真撮影を行い、ImageJ ソフトウェアを用いて潰瘍面積を計測した。潰瘍作製直後の面積と day8 における潰瘍面積から創傷閉鎖率 = (潰瘍作成時の面積 - day8 の面積) / 潰瘍作成時の面積 × 100 を算出し、各群で比較することで創傷治癒速度の違いを検証した。

### (7) リアルタイム PCR による潰瘍部の炎症関連遺伝子発現の評価

Day8 に潰瘍面、潰瘍周囲皮膚を含めた組織を採取し、凍結保存した。凍結組織から RNA 抽出を行い、cDNA に変換したのちに StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) でリアルタイム PCR を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 結果

#### 創傷閉鎖率

day8 における創傷閉鎖率を各群で比較したところ、Klotho/control 群に比較して、Klotho/AMSC 群では創傷閉鎖率が有意に増加した(図1)。また、創傷閉鎖までの期間を比較したところ、Wild/control 群が平均 14 日であったのに対して Klotho/control 群では平均 20 日と創傷治癒遅延を認めたと、Klotho/AMSC 群では平均 17 日と創傷治癒促進が認められた。

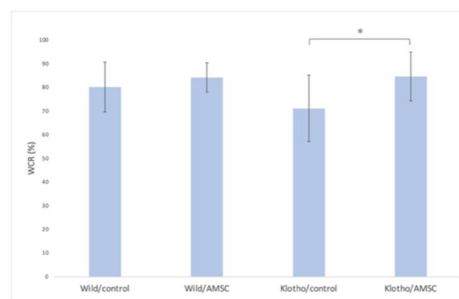


図1. Day8 における創収縮率

#### 潰瘍組織における炎症関連 mRNA 発現

採取した潰瘍組織における炎症関連因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、MMP-3、MMP-9) を、リアルタイム PCR で解析した。TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 に関しては、各群でいずれも有意差を認めなかったが、AMSC 群で TNF- $\alpha$  が低下する傾向が認められた (Klotho>Wild)。また、Wild 群では IL-1 や IL-6 にも低下傾向が認められたが、Klotho 群では低下傾向は認められなかった。MMP-3、MMP-9 に関しては、Klotho/control 群に対して Klotho/AMSC 群で有意に低下することが明らかになった (図2)。

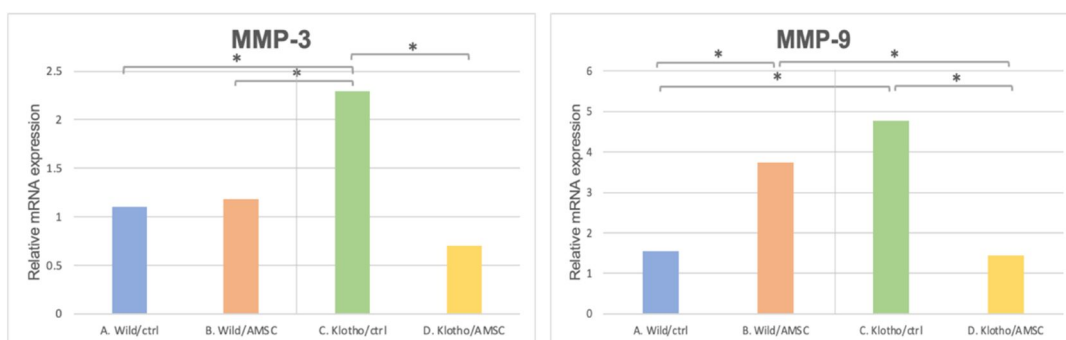


図2. 潰瘍組織における炎症関連 mRNA 発現の解析

### (2) 考察

Klotho マウスにおいて、AMSC の外用によって創傷閉鎖が促進することが明らかになった。また、Klotho 群において AMSC 外用で MMP-3、MMP-9 が低下することが明らかになったが、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 は有意な低下を認めなかった。MMP (マトリックスメタロプロテアーゼ) はコラーゲンやプロテオグリカン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスの分解に関与し、炎症、線維化、血管新生などに広く作用する。<sup>4</sup> 生体において、コラーゲンの量はこの MMP の調整によってコントロールされており、TNF- $\alpha$  や IL-1 は MMP の発現を誘導することが明らかになっている。<sup>5</sup> 一方で、MMP を抑制する因子として Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) が知られており、IL-6 や TGF- $\beta$  などは TIMP の発現を誘導することが知られている。<sup>5</sup> コラーゲンを分解する MMP とコラーゲン分解を抑制する TIMP のバランスによって、コラーゲン量が調整されている。創傷治癒過程の増殖期においては、コラーゲン線維の形成が重要な役割を担っており、コラーゲン形成の不具合は創傷治癒遅延の原因となる。これらのことから、AMSC による Klotho マウスの創傷治癒促進作用は、抗炎症作用よりも、線維化調整作用がより強く影響を与えている可能性が考えられた。また、MMP の抑制機構として、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 以外の因子を介して調節している可能性や、AMSC が TIMP などの抑制因子によって直接的にコントロールしている可能性が示唆された。しかしながら、本研究の範囲では、その詳細な機序まで解明するには至らなかった。

### (3) まとめ

AMSC 外用によって Klotho マウスの創傷治癒が促進した。潰瘍組織の炎症関連 mRNA 発現解析の結果、Klotho 群において AMSC 外用によって MMP-3、MMP-9 が有意に低下することが明らかになった。しかしながら、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 の発現に有意な低下は認められず、AMSC が Klotho マウスの創傷治癒を促進する原因としては、抗炎症作用よりも線維化調整作用がより強く影響を与えている可能性が示唆された。

#### <引用文献>

1. Nigwekar SU, Thadhani R, Brandenburg VM. Calciphylaxis. N Engl J Med. 2018 May 3;378(18):1704-1714.
2. Sato C, Yamamoto Y, Funayama E, Furukawa H, Oyama A, Murao N, Hosono H, Kawakubo K, Sakamoto N, Ohnishi S. Conditioned Medium Obtained from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents Activation of Keloid Fibroblasts. Plast Reconstr Surg. 2018 Feb;141(2):390-398.
3. Takahashi H, Ohnishi S, Yamamoto Y, Hayashi T, Murao N, Osawa M, Maeda T, Ishikawa

- K, Sakamoto N, Funayama E. Topical Application of Conditioned Medium from Hypoxically Cultured Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes Wound Healing in Diabetic Mice. *Plast Reconstr Surg.* 2021 Jun 1;147(6): 1342-1352.
4. Zhao X, Liu Y, Jia P, Cheng H, Wang C, Chen S, Huang H, Han Z, Han ZC, Marycz K, Chen X, Li Z. Chitosan hydrogel-loaded MSC-derived extracellular vesicles promote skin rejuvenation by ameliorating the senescence of dermal fibroblasts. *Stem Cell Res Ther.* 2021 Mar 20;12(1):196.
  5. Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces soft tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythropoietin activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem* 266:2017-2020,1991.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋周子、佐々木雄輝
2. 発表標題 羊膜由来幹細胞を用いた透析足潰瘍の炎症制御
3. 学会等名 第44回北大形成外科アカデミー
4. 発表年 2022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
---------	---------