

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592645

研究課題名(和文)皮膚由来前駆細胞を用いた糖尿病性潰瘍の新規治療法開発に関する基礎的研究

研究課題名(英文)A basic research to develop a new therapy for the treatment of diabetic ulcer using skin derived precursor cells

研究代表者

蛭沢 克己(Ebisawa, Katsumi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：20397459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性足潰瘍は、治療に難渋することも多く、新たな治療として再生医療の手段を用いた報告が散見される。われわれも、皮膚由来前駆細胞を細胞源として着目し、糖尿病マウス創傷治療モデルを用いて、同細胞の創傷治療に与える影響を検討した。糖尿病マウス背部の皮膚全層欠損に、実験群では皮膚由来前駆細胞懸濁液を、対照群では生理食塩水をそれぞれ局所投与した。創面積の経時的変化・創閉鎖までの日数、蛍光免疫染色にて血管密度・神経密度の評価を行った。細胞投与により創治療が有意に促進された。また、10日目における血管密度および28日目における神経線維密度が、細胞投与により有意に増加していた。

研究成果の概要(英文)：We investigate the influence of SKPs on diabetic wound healing. Skins were harvested from 4 week-old male diabetic mice (db/db), and were minced and digested to isolate SKPs. Then SKPs were cultured for three weeks and labeled with PKH 26 before use. We used the excisional wound splint model on diabetic mice. The wounds were randomly divided into control group and SKPs group. We took photographs of the experimental area and harvested tissue samples, and evaluated time to wound closure and histological findings. Wounds treated with SKPs demonstrated a significantly decreased time to closure compared with control wounds. Histological analysis showed that the Capillary Score was significantly higher in SKPs-treated wounds at day 10 but not at day 28. Nerve Density had increased significantly in SKPs-treated wounds at day 28 compared with control group. Some applied SKPs were stained by NF-H, which demonstrates that SKPs directly differentiated into neurons.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：皮膚由来前駆細胞 糖尿病性潰瘍 創傷治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者や脊髄損傷患者の褥瘡、糖尿病性足壊疽、放射線照射後皮膚潰瘍など、形成外科医は、日常的に難治性潰瘍の治療に携わる機会が多い。これら難治性潰瘍は、処置等の医療行為のみならず、通院や入院などによる患者・家族の肉体的・精神的苦痛も大きく、QOL を大きく損なっている。

2008年12月に公表された「平成19年国民健康・栄養調査」によると、糖尿病を強く疑われる人と可能性を否定できない人は、約2210万人と推計され、成人の約2割に当たると報告された。また糖尿病患者のうち25%が足部潰瘍を発症するとされている(Singh N et al. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA* 293: 217-228, 2005)ことを考えると、医学的にも、また医療経済的にも糖尿病性潰瘍が大きな問題である事は明らかである。

(2) これら糖尿病性足潰瘍形成の原因の一つとして神経障害があることは広く知られている。知覚神経障害による防御感覚の消失、運動神経障害による筋萎縮や伸筋・屈筋のアンバランスのため足部変形が生じ、機械的刺激が原因となり潰瘍を形成する。さらにこの病態に末梢動脈閉塞性疾患(PAD)や、自律神経障害による乾燥が皮膚亀裂をきたすなどの要因が加わり、潰瘍が難治化していく。その治療法は、潰瘍に対する処置や手術、また腱移行術や血行再建等であるが、一度傷害された神経への治療法はなく、再発予防の面からも新たな治療法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

上述のような背景から、糖尿病性足潰瘍に対して、自家組織由来幹細胞を利用する潰瘍治癒促進や神経再生を目的とした細胞治療の可能性を検討しようと考えた。

なかでも成人真皮内に存在する皮膚由来前駆細胞 (Skin Derived Precursor Cell; SKPs) は胎生期の神経堤由来と言われ(Wong CE et.al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol.* 175(6): 1005-1015, 2006)、他の幹細胞と比較し優れた神経系への分化能を有する事が報告されており、近年では脊髄損傷の治療戦略として期待されている。(Biernaskie J et.al. Skin derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci.* 27(36): 9545-59, 2007)。また、同細胞は多分化能を持っていることから、創傷治癒を促進する可能性も十分にあり、SKPsは創傷治癒および神経再生のための細胞源として非常に魅力的である。

本研究では、自己幹細胞源として SKPs を用い、糖尿病性足潰瘍の根治療法としての可能性を検討した。

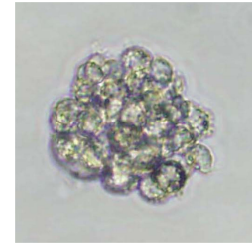
3. 研究の方法

本研究の動物実験は、名古屋大学医学部実験動物委員会の承認を得たプロトコールに従って行った。

(1) SKPs の単離・培養

Tomaらの方法 (Toma JG et. al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* 3(9): 778-84, 2001.)を参考とした。糖尿病性マウス (C57BLKS/J Iar- + Lepr^{db}/ + Lepr^{db}、中部科学資材、10週齢、♂)背部皮膚より皮膚を採取、2~3 mm³ほどに細切し、0.1%トリプシンにて酵素処理を行った。40μm のメッシュにて濾過し、SKPsを単離した(図1)。

DMEM-F12 3:1 に B27, EGF, b-FGF 添加培地を用い、非接着性フラスコにて浮遊培養を行った。継代は1週間ごとに行った。細胞塊を機械的に崩し、75%の培地と



25%の培養上清にて継代培養を行った。

なお、細胞特性解析は Flow cytometry にて nestin 陽性、CD34 陰性などを確認した。

(2) 糖尿病性潰瘍モデル

糖尿病性皮膚潰瘍モデルとし Galiano らの方法 (Galiano RD et. Al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen.* 12(4): 485-92, 2004.)を参考にした。糖尿病マウスをイソフルレンにて全身麻酔し、背部に直径 8 mm の皮膚全層欠損を 2 ヲ所作成し、直径 16mm のドーナツ型シリコンシートを瞬間接着剤にて貼付後、5-0 ナイロン糸にて縫着して皮膚潰瘍モデルとした(図2)。

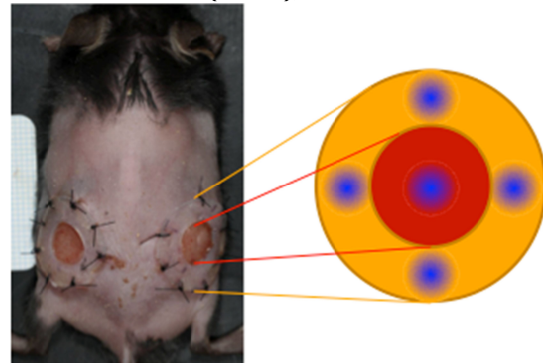


図2. 糖尿病性潰瘍モデルと SKPs 局所投与

(3) SKPs の潰瘍層への投与

培養した SKPs を機械的にバラバラにした後 PKH26 で標識化した。欠損層をランダムに2群に分け、実験群では PKH26 で標識化された SKPs 1.0×10^6 個のリン酸緩衝液懸濁液 100μL を、対照群ではリン酸緩衝液 100μL をそれぞれ皮下に局所投与した(図2)。創部はフィルムドレッシングにて被覆した。

(4) 創部の解析

局所投与後 0, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 28 日後に創部の規格写真をデジタルカメラで撮影した。完全に上皮化した期間を創閉鎖までの日数とした。また、創面積は画像解析ソフトウェア Image J (Ver.1.47) で算出した。創閉鎖率は $1 - (\text{創面積}/64)$ で算出した。

(5) 組織学的解析

創部組織は、局所投与後 10, 28 日目に、創縁から 2mm のマージンを付けて採取した。定法に従い、 $8\mu\text{m}$ 凍結切片を作成した。

血管内皮細胞同定には、一次抗体としてラット抗マウス CD31 抗体、二次抗体として Alexa Fluor 647 結合抗ラット IgG 抗体を使用した。また、平滑筋細胞同定には、一次抗体として抗マウス αSMA 抗体、二次抗体として Alexa Fluor 488 結合抗マウス IgG 抗体を使用した。血管は、両者で二重染色されており(図3)、 1mm^2 あたりの血管数を Capillary score として算出した。

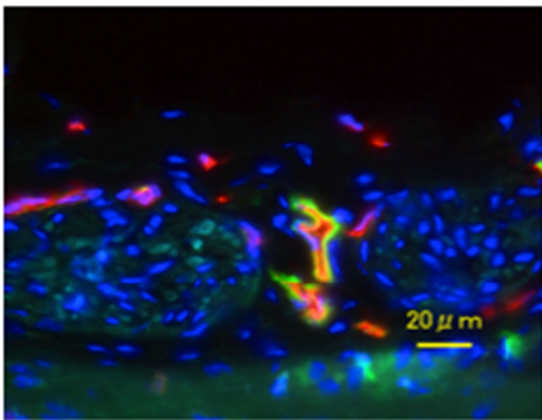


図3. 血管の免疫染色
Red: CD31, Green: $\alpha\text{-SMA}$, Blue: DAPI

神経線維の同定には、一次抗体として抗マウス NF-H 抗体、二次抗体として Alexa Fluor 488 結合抗マウス IgG 抗体を使用した。これにより蛍光染色されるフィラメント状の構造を神経線維とし(図4)、 1mm^2 あたりの神経線維数を Neuro density として算出した。

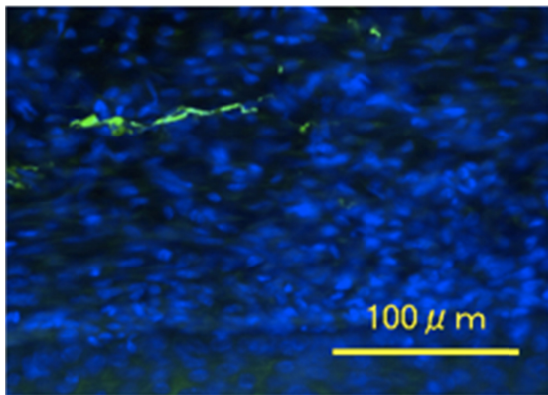


図4. 神経線維の染色
Green: NF-H, Blue: DAPI

(6) 統計学的検討

統計学的検討は、統計解析ソフトウェア

SigmaStat を使用した。それぞれ、Student t 検定および Mann-Whitney U 検定を行い、 $p < 0.05$ で有意差有りとした。

4. 研究成果

代表的な経時的な創部写真を示す(図5)。

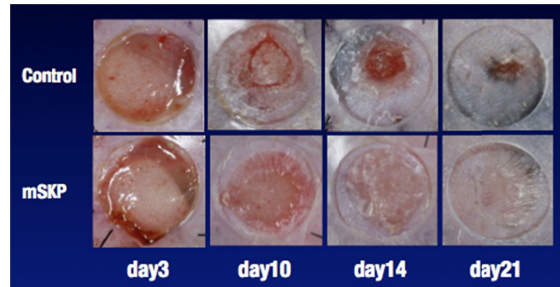


図5. 創部の経時変化 上段対照群、下段 SKPs 群

創治癒までに要する日数は、実験群で 18.6 ± 0.7 日、対照群で 21.7 ± 0.7 日であり、SKP 投与により創治癒が有意に促進された。

また、創閉鎖率は 7, 10, 14, 18 日目で、細胞投与群が有意に創閉鎖を促進していた(図6)。

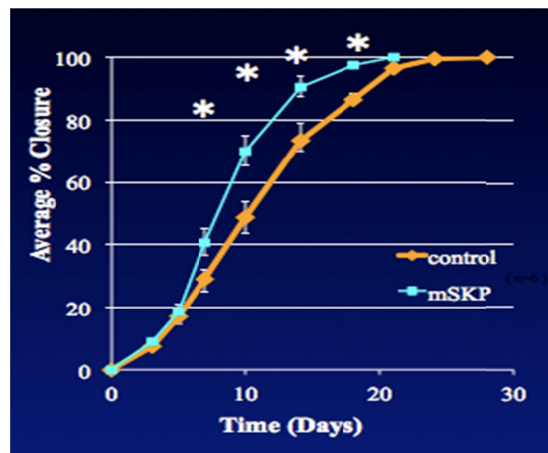
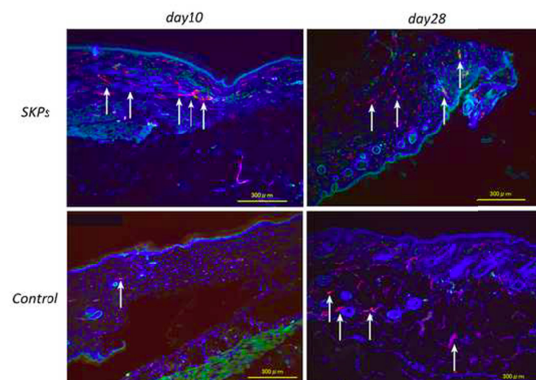


図6. 経時的な創閉鎖率

10 日目における Capillary Score は細胞投与群で $17.4 \pm 2.2 / \text{mm}^2$ 、対照群では $9.5 \pm 0.64 / \text{mm}^2$ であり、SKP 投与が血管密度を有意に増加させた(図7)。28 日目における血管密度は細胞投与群では $24.2 \pm 6.3 / \text{mm}^2$ 、対照群では $17.7 \pm 4.8 / \text{mm}^2$ であり、両群間に統計学的有意差を認めなかった。



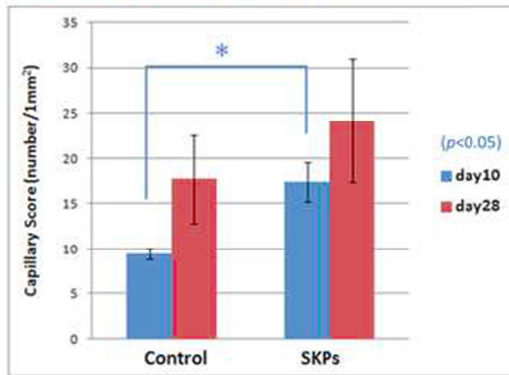


図7 . 10日目と28日目の創部の血管(矢印)と血管密度

一方、10日目の Neuro Density は、細胞投与群および対照群ではそれぞれ $6.8 \pm 0.5 / \text{mm}^2$ 、 $5.0 \pm 1.2 / \text{mm}^2$ であり、両群間に統計学的有意差を認めなかった。28日目における神経密度は細胞投与群で $19.1 \pm 2.0 / \text{mm}^2$ 、対照群では $9.0 \pm 0.7 / \text{mm}^2$ であり、SKP 投与が神経線維密度を有意に増加させた(図8)

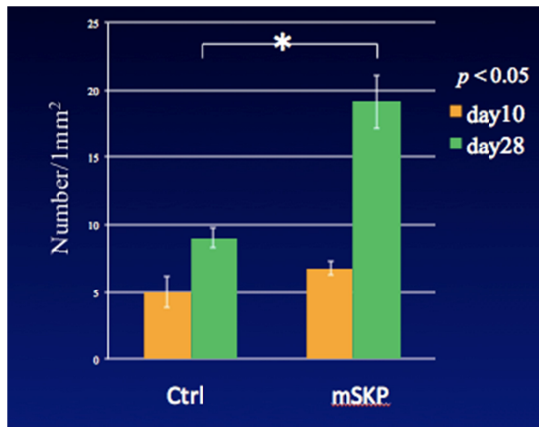


図8 . 10日目と28日目の神経線維密度

さらに、免疫染色により移植した SKPs が神経系へ分化誘導することなく、局所の環境で神経線維へ直接分化している事が確認された(図9)。

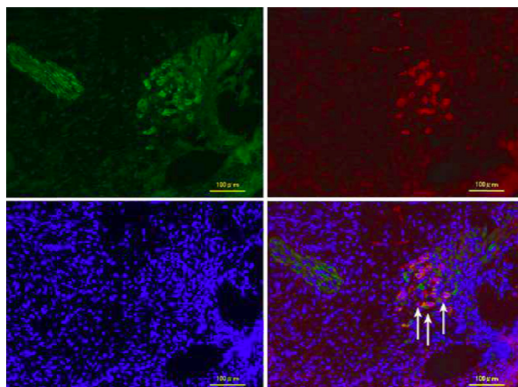


図9 .創部の免疫染色 左上:抗NF-H抗体、右上:PKH26 左下:DAPI 右下:merge

本研究では、糖尿病マウス皮膚潰瘍モデルにおいて、SKPs は局所血管密度を介して創治癒を促進させる事が示され、SKPs の局所投与

が糖尿病性足潰瘍治療に有効である事が示唆された。また、移植された SKPs が局所で神経に分化しており、この点からも SKPs が糖尿病性足潰瘍の創傷治療に影響を与える可能性があると考えた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

佐藤秀吉、蛭沢克己、鳥山和宏、八木俊路朗、高成啓介、亀井譲 皮膚由来前駆細胞を用いた創傷治癒促進能の検討 第22回日本形成外科学会基礎学術集会 2013年11月8日 朱鷺メッセ(新潟市)

SATO H、EBISAWA K、YAGI S、TORIYAMA K、KAMEI Y. Skin derived precursor cells promote diabetic wound healing. The 4th Congress of the World Union of Wound Healing Society, 2012年9月5日 Pacifico Yokohama(横浜市)

佐藤秀吉、蛭沢克己、鳥山和宏、八木俊路朗、高成啓介、亀井譲 糖尿病マウスにおける、皮膚由来前駆細胞を用いた創傷治癒促進能の検討 第12回日本再生医療学会総会 2012年3月23日 パシフィコ横浜(横浜市)

佐藤秀吉、蛭沢克己、鳥山和宏、八木俊路朗、高成啓介、亀井譲 皮膚由来前駆細胞を用いた創傷治癒促進能の検討 第20回日本形成外科学会基礎学術集会 2011年10月6日 ハイアットリージェンシー東京(新宿区)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

蛭沢 克己 (EBISAWA, Katsumi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号: 20397459

(2)研究分担者

亀井 譲 (KAMEI, Yuxuru)

名古屋大学・医学(系)研究科・教授

研究者番号: 10257678

鳥山 和宏 (TORIYAMA, Kazuhiro)

名古屋大学・医学(系)研究科・准教授

研究者番号: 40314017

八木 俊路朗 (YAGI, Shunjiro)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 00378192

佐藤 秀吉 (SATO, Hideyoshi)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 70528968

削除：平成 24 年 4 月 18 日