

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861684

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞の免疫制御作用を用いた、静脈性潰瘍の新しい治療方法の開発

研究課題名(英文) Investigation of new treatment option for venous ulcer with adipose derived stem cells and its immunomodulatory effect

研究代表者

高成 啓介(Takanari, Keisuke)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80378190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脂肪由来幹細胞(ADSC)が局所の炎症を抑えることが可能かにつきラットの静脈潰瘍モデルを用いて研究を行った。今回作成したモデルでは下大静脈、総腸骨静脈、大腿静脈をそれぞれ結紮し、静脈うっ滞をより強くしたところ、CVI群において静脈圧の有意な上昇、潰瘍の治癒遅延を認めた。さらに、ブラジキニンを足底に投与することにより(CVI+BK群)重篤なCVIを作成することに成功した。CVI+BK群では足底の腫脹、疼痛閾値の低下が見られた。また、ラットよりADSCの抽出を行いフローサイトメトリーにて確認を行った。現在ADSCの炎症細胞に対する影響を調査するとともに、潰瘍モデルへの処置を進めている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate if Adipose derived stem cell (ADSC) can modulate immune response in the local tissue. We utilized rat chronic venous insufficiency model. Inferior vena cava, common iliac vein, femoral vein were ligated and the venous hypertension was confirmed. The ulcer med in the leg showed significant retardation of wound healing. Bradykinin injection to the foot made this model even worse and we observed swelling of foot and lowering pain threshold, that were not observed in the original model. Next we isolated ADSC from rat subcutaneous tissue and confirm by flowcytometry. We are now proceeding to the last step of this study to investigate the effect of ADSC on inflammation cells and the effect on venous ulcer model.

研究分野：形成外科

キーワード：静脈性潰瘍 慢性静脈不全症 脂肪由来幹細胞 炎症制御効果

### 1. 研究開始当初の背景

慢性静脈不全症 (chronic venous insufficiency; CVI) は罹患率の高い疾患であり、下腿難治性潰瘍の主な原因の一つである。この CVI による静脈鬱滞性潰瘍 (静脈性潰瘍) に対する治療は、現在のところ硬化療法、ストリッピング、穿通静脈切断などの静脈病変に対する治療や、デブリードマン、感染対策、圧迫療法などの対症療法が行われているが、治療に難渋する症例も多い。静脈性潰瘍の成因は長く局所の酸素欠乏が主であると考えられてきたが、近年局所の炎症が大きくかかわっていることが知られるようになった。そのメカニズムとしては、鬱滞した静脈の透過性が上昇することによりマクロファージなどが漏出し、マクロファージから白血球遊走因子が放出されて局所の炎症を起し、皮膚潰瘍の形成や悪化に関与しているとされる。このような病態に対する新しい治療として免疫制御治療が期待されているが、確立した治療は現在まで報告がない。

脂肪由来幹細胞 (Adipose derived stem cells; ADSCs) は採取が容易であり、他の体性由来幹細胞に比べて高密度で存在していることなどから、体性由来多能性幹細胞のソースとして期待されている。近年の研究では体性由来幹細胞は、多能性分化能とともに、細胞から放出される各種サイトカインによる paracrine effect と呼ばれるさまざまな間接的影響を周囲の組織にもたらすことが知られつつある。中でも、ADSCs、骨髄幹細胞 (bone marrow derived stem cells; BMSC) などの免疫制御作用は多くの報告がなされてきている。ADSCs に関しては同種組織移植の際に同時に細胞を移植することで、レシピエントからの拒絶に関わる Tリンパ球の働きを抑制することができるという報告、ADSCs の同種細胞移植は拒絶されにくいという報告や ADSCs がアレルギー性気道炎を抑制するという報告などがみられる。また、BMSCs にも Tリンパ球やマクロファージのサブタイプを炎症性のものから免疫制御性のものへと転換させる性質があることが報告され、これらの体性幹細胞を用いた免疫抑制療法の可能性が示唆されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、静脈性潰瘍に対する ADSCs を用いた治療法の可能性について検証する。ADSCs は各種間葉系細胞株に分化する性質や免疫制御作用、血管新生作用があり、これらの総合的な作用によって創傷治癒促進効果が期待できると考えられる。(図 1)

### 3. 研究の方法

(1) 現在のところ動物の静脈鬱滞性潰瘍モデルはないため、これまで報告されている静脈不全モデルを改変 (図 2) し、静脈うっ滞

性潰瘍モデルを作成する。下肢の静脈圧測定、作成した潰瘍面積の継時的推移、組織学的検査 (Hematoxylin & Eosin (HE) 及び Masson Trichrome (MT) 染色) を行う。

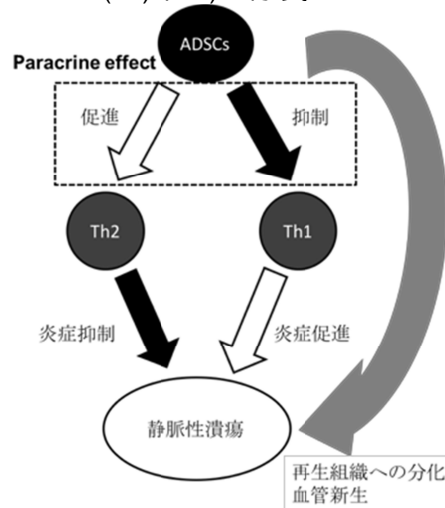


図 1 : ADSCs の予想される治癒促進機序 (仮説)

ADSCs は炎症抑制細胞に対してはその機能を促進的に、炎症促進細胞に対しては抑制的に働き、炎症制御機能を持つと考えられる。また、潰瘍部において直接線維芽細胞や表皮細胞に分化したり、血管新生を促すことにより治癒促進効果を持つと考えられる。

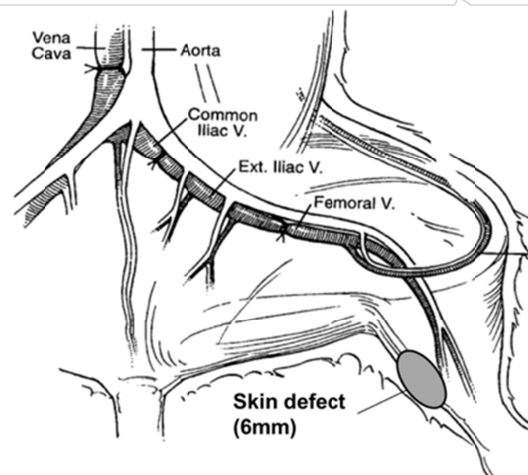


図 2 : ラット CVI モデル (文献より抜粋、一部改編) 下大静脈、腸骨静脈、大腿静脈をそれぞれ同定、結紮する。その後、腓腹部に 6mm の皮膚全層欠損を作成する。

(2) また、皮下組織より ADSC を抽出し、その特性について評価を行う。末梢血や腹水より炎症性細胞 (T 細胞、B 細胞、マクロファージなど) を抽出し、ADSC のこれらの細胞に与える免疫制御効果について検証する。

(3) さらに、(1) で作成した静脈性潰瘍モデルに対して ADSC を投与し、その効果について、潰瘍面積、組織学的検査を行って検討する。

### 4. 研究成果

平成 25 ~ 27 年は静脈性潰瘍の動物モ

デル作成を行った。これまでの報告では静脈うっ滞モデルのみが作成されていたが、今回作成したモデルでは顕微鏡下に下大静脈、総腸骨静脈、大腿静脈をそれぞれ結紮し、静脈うっ滞をより強くしたところ、2週間の時点での静脈圧（大腿静脈抹消側にカニューレションして測定）はCVI群：11.8mmHgに対しコントロール群：1.72mmHgと有意な上昇を認めた。また、静脈圧は1ヶ月以上維持されていた（表1）。

POD(日)	1	7	14	21	28	44
静脈圧 (mmHg)	8.63	6.78	11.91	14.32	13.75	14.89
SE	0.37	0.33	1.69	2.54	2.03	0.85

表1: CVI作成後の静脈圧の変化

ラットCVIモデル作成後、大腿静脈抹消側にカニューレションを行い測定（n=4）。術後1ヶ月以上高い静脈圧が維持されている。

上記のモデルに潰瘍を付加した「静脈性潰瘍モデル」を作成した。8週令のSDラット（ ）を用い、顕微鏡下に静脈の結紮を行いCVIを作成した。同時に両下肢にダーマパンチを用い6mmの潰瘍を作成した。潰瘍の周囲にはドーナツ型のシリコンプリントを固定し、潰瘍の収縮を防いだ。これをCVI群（n=10）とした。コントロールにはCVIは作成していないが、潰瘍のみ両下肢に作成したものをを用いた（n=10）。両群において、継続的に潰瘍面積を測定し、潰瘍作成時の面積（100%）と比較したところ、10日目のCVI群の創面積は $14.1 \pm 2.0\%$ （コントロール群では $8.0 \pm 2.0\%$ ）、14日目の創面積は $2.7 \pm 0.8\%$ （コントロール群では $1.0 \pm 0.5\%$ ）と、コントロール群に比べ有意に創傷治癒が遅延することが示された（図3）。

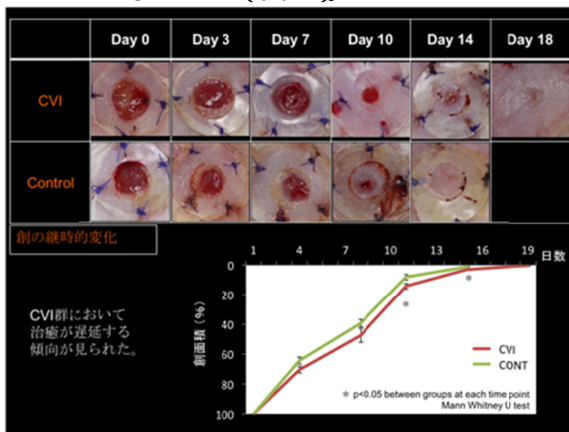


図3: 潰瘍の継続的な変化

CVI群で創治癒が有意に遅延していた。

また、治癒した瘢痕をHE染色及びMT染色にて組織学的評価を行なったところCVI群では真皮層に当たる部分においてコラーゲンなどの膠原繊維の沈着が減少しており、単核

球、マクロファージを中心とした炎症細胞浸潤が多く見られ、血管の内腔が小血栓で潰れている像が多く見られた（図4）。

作成したCVI群では静脈圧の上昇、潰瘍の治癒遅延といった臨床でも見られる所見が得られたが疼痛や浮腫といった所見は見ら

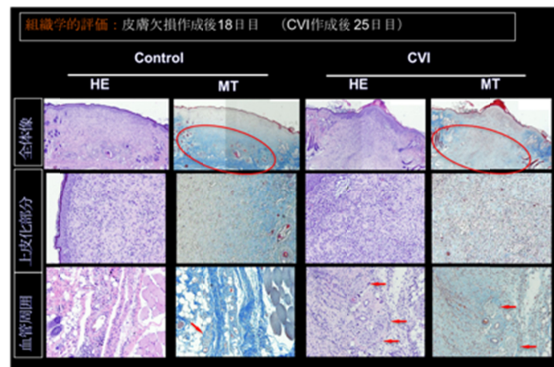


図4: 組織学的評価

CVI群で膠原繊維の沈着の減少、単核球、炎症細胞浸潤、微小血栓の増加が見られた。

れなかった。このため、さらに臨床に即したモデルを作成するためにCVI作成と同時にブラジキニン（BK）を足底に投与することにより（CVI+BK群）より重篤な静脈性潰瘍モデルを作成することを試みた。前モデルと同様に、8週令のSDラット（ ）を用い、顕微鏡下に静脈の結紮を行いCVIを作成した。同時に両足底にBKを皮下注射した。また、両下肢にダーマパンチを用い6mmの潰瘍を作成した。潰瘍の周囲にはドーナツ型のシリコンプリントを固定し、潰瘍の収縮を防いだ。これをCVI群（n=10）とした。コントロールにはCVIモデル作成時と同様のものをを用いた。

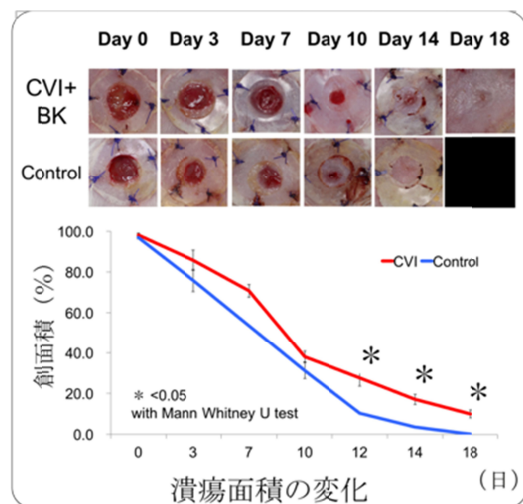


図5: CVI+BKの潰瘍面積の変化

コントロール群に比べ有意に潰瘍の治癒遅延を認める。

これにより、CVIのみでは見られなかった一過性の足底の腫脹や、疼痛閾値の低下が見

られた。また、創の継時的変化を見たところ、10 日目の創面積 27.7% (コントロールは 10.4%)、14 日目の創面積 17.1%(コントロールは 3.5%)と、コントロール、CVI のみの両群よりも創の治癒遅延が見られた (図 5)。

これらの成果により、これまで報告がなかった静脈うっ滞性潰瘍のラットモデルを作成することに成功した。

また、ラット皮下及び大網より脂肪組織を採取し、脂肪由来幹細胞の抽出を行った。脂肪幹細胞の表面高原には CD44+/CD90+/CD31-/CD45- を用いており、約フローサイトメトリー (FACS Calibur, Beckton, Dickinson and co.) にて確認を行った。

現在脂肪由来幹細胞の炎症関連細胞 (T 細胞、B 細胞、マクロファージ) に対する影響を調査するとともに、潰瘍モデルへの処置を行っている。

#### 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 2 件)

1. ラットにおける下腿静脈鬱滞性潰瘍モデルの作成 (第 2 報)  
高成啓介、鳥山和宏、佐藤秀吉、八木俊路朗、蛭沢克己、澤村 尚、神戸未来、亀井 譲  
第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会  
2014 年 10 月 9 日・10 日  
(キッセイ文化ホール・長野県・松本市)  
最優秀ポスター演題賞受賞
2. ラットにおける下腿静脈鬱滞性潰瘍モデルの作成  
高成啓介、鳥山和宏、佐藤秀吉、八木俊路朗、蛭沢克己、澤村 尚、神戸未来、亀井 譲  
第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会  
2013 年 11 月 7 日・8 日  
(朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター・新潟県・新潟市)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高成 啓介 (TAKANARI Keisuke)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80378190

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

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

八木 俊路朗 (YAGI Shunjiro)  
鳥取大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：00378192

鳥山 和宏 (TORIYAMA Kazuhiro)  
名古屋市立大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：40314017

亀井 譲 (KAMEI Yuzuru)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：10257678