



Title	羊膜由来間葉系幹細胞を用いた糖尿病性潰瘍の治療法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	高橋, 周子
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14265号
Issue Date	2020-09-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/79451">http://hdl.handle.net/2115/79451</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Hiroko_Takahashi_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称      博士（医 学）      氏 名      高橋 周子

主査      教授      近藤 亨  
審査担当者 副査      教授      石田 晋  
副査      教授      清野 研一郎  
副査      准教授 外丸 詩野

### 学 位 論 文 題 名

羊膜由来間葉系幹細胞を用いた糖尿病性潰瘍の治療法の開発  
(Development of therapy for diabetic ulcers  
using amnion-derived mesenchymal stem cells)

本学位論文は、糖尿病性潰瘍に対する羊膜由来間葉系幹細胞（Amnion-derived mesenchymal stem cell, AMSC）の培養上清（conditioned medium, CM）の治療効果を検討したものである。研究手法は、基本的な分子細胞生物学実験、免疫組織化学実験的、皮膚潰瘍モデルマウスを用いた治療実験と多岐にわたる。間葉系幹細胞は、骨や軟骨などの間葉系細胞への分化能を持つほか、様々な生理活性物質を分泌し血管新生、抗炎症、免疫調整などの作用を有する。これらのパラクライン作用は低酸素環境で亢進するとされる。間葉系幹細胞は、骨髄や脂肪組織、臍帯など様々な組織から分離可能であるが、形成外科学教室では、分娩後の胎盤から分離・培養しドナーの侵襲なく採取できる AMSC を用いた研究を行っている。一方、糖尿病性潰瘍は、創傷治癒遅延を特徴とし、しばしば切断を必要とする慢性創傷である。再発率も高く予後不良なため、新たな治療法が望まれる。骨髄や脂肪組織由来の間葉系幹細胞あるいはその培養上清（conditioned medium, CM）を用いた糖尿病性潰瘍の研究は多数認められるが、AMSC を創部に移植した報告は 1 件のみであり、CM を用いた研究は行われていない。本研究は、低酸素培養した羊膜由来間葉系幹細胞の CM を糖尿病マウスおよび非糖尿病マウスの皮膚潰瘍に外用し、創傷治癒に及ぼす影響を評価した。まず、低酸素培養により得られた CM は、創傷治癒に有益に働く VEGF-A および b-FGF をより多く含有することを明らかにした。また、低酸素 CM は、糖尿病マウスの皮膚潰瘍において血管新生および上皮化を促進し、炎症を抑制することで創傷治癒を促進することを示した。正常酸素 CM も創傷治癒効果を示したが、低酸素 CM に比べその効果は少なかった。非糖尿病マウスにおいては、正常酸素 CM および低酸素 CM ともに創閉鎖および血管新生を促進する傾向があったが、上皮化および炎症に対する影響に一定の傾向は見

られなかった。非糖尿病マウスにおける AMSC の創傷治癒効果は、主に血管新生促進によるものと考えられた。本研究にて、AMSC の低酸素 CM による、糖尿病性潰瘍の新しい治療法の可能性が示唆された。

審査にあたり、まず副査の清野健一郎教授から皮膚欠損部の治療に本研究方法が優れている点についての質問があり、申請者は本方法が損傷部位を改善しながら治療できる点で優れていると回答した。次に、低酸素下で AMSC が分泌する因子群について、学位論文に記載されている以外の因子の発現検討についての質問があり、申請者は複数の因子について検討を行ったが発現を検出できなかったと回答した。AMSC 自体を本研究で使用しなかった理由についての質問に対し、申請者は実臨床において CM を使用することは患者本人が塗布できる点で現実的であると回答した。

副査の石田晋教授から、低酸素状態で VEGF 発現が亢進していないため追加の検討が必要であるとのコメントに対して、申請者は今後追加で検討を進めていくと回答した。次に、AMSC が分泌する key factor を決定する上で proteomics を用いた検討が必要であるとの質問に対し、申請者は検討が必要な研究であると回答した。皮膚欠損部を修復する細胞についての質問に対し、線維芽細胞を含めて今後必要な実験により詳細を解明すると回答した。

副査の外丸詩野准教授から、全体に N 数が少ないとのコメントに対し、申請者は N=1 の結果については論文修正すると共に今後追加実験を遂行すると回答した。次に、正常マウスと糖尿病モデルマウスの比較検討において、コントロール培地を用いた実験結果にばらつきがあるためこの結果を考慮した解析が必要であるとのコメントに対し、申請者は指摘された点を考慮に再解析を行うと回答した。

最後に主査の近藤亨教授から低酸素状態で HIF1 $\alpha$  の発現が誘導されていない理由についての質問があり、申請者は今までの報告とあっていないため再検討が必要であると回答した。次に、潰瘍部位に集積するマクロファージのサブタイプについての質問について、申請者は未検定であるため今後検討する予定とすると回答した。AMSC の CM が正常マウスには炎症性サイトカイン発現を亢進し、糖尿病モデルマウスで抑制するメカニズムについての質問に対し、申請者は今後検討する必要があると回答した。

全ての質問に対して申請者は文献的知見と実験結果をもって適切に回答した。また本研究で解明した研究成果の意義、今後解明すべき点を明確に理解し、次段階の研究指針や応用の方向性も十分把握していた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し大学院課程における研鑽や取得単位なども併せて申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。