HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	卵膜由来間葉系幹細胞培養上清によるケロイド線維芽細胞に対する抑制効果の検討［全文の要約］
Author(s)	佐藤, 千草
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2334 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12812号
Issue Date	2017-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66933
Type	doctoral thesis
File Information	Chigusa_Sato_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文（要約）

卵膜由来間葉系幹細胞培養上清による
ケロイド線維芽細胞に対する抑制効果の検討

（Conditioned Medium Obtained from Amnion-derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents Activation of Keloid-derived Fibroblasts）

2017 年 6 月

北海道大学

佐藤 千草

学 位 論 文（要約）

卵膜由来間葉系幹細胞培養上清による
ケロイド線維芽細胞に対する抑制効果の検討

（Conditioned Medium Obtained from Amnion-derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents Activation of Keloid-derived Fibroblasts）

2017 年 6 月

北海道大学

佐藤 千草

【論文の背景】

構造と機能の回復は医学が目指す究極の到達点である。組織・器官における線維性瘢痕形成は、正常な構造と機能を破壊し、ケロイド・肥厚性瘢痕、肝硬変、肺線維症、動脈硬化などのさまざまな難治疾患を惹起する。本研究は皮膚における線維性瘢痕形成であるケロイド・肥厚性瘢痕に注目した。

皮膚における創傷治癒の結果、瘢痕として傷跡が残されるが、それらは外観によって成熟瘢痕、肥厚性瘢痕、ケロイドに分けられる。白く平坦で目立たない、所謂きれいな傷跡は成熟瘢痕と呼ばれ、多くの人は気にすることもなくきれいな傷跡を持つことになる。体質、部位、創傷治癒の過程によって、肥厚性瘢痕・ケロイドと呼ばれる、紅色に隆起し、掻痒や疼痛を伴う、醜い傷跡が形成される。なかでも、傷の範囲を越えて増大していくものをケロイドとしている。その発生原因や病態については未だに不明な点が多い。ケロイドの発症は人種差があり、黒人に多く、次いで黄色人種に多い。白人にケロイドが発症することは極めて稀である。これらは、ヒトの皮膚（真皮由来）にのみ発症する良性線維性病変であり、動物モデルの作成には至っていない。そのため、その発症機序、病態、消退などのメカニズムに関して不明な点が多く、決定的な治療法の開発には難渋している。ヒトであっても、胎児における創傷治癒は出生後のそれとは大きく様相を異にし､出生後の創傷は瘢痕性修復によって治癒するが、胎児においては瘢痕すらすら残さず、組織の再生によって治癒する。

ケロイド・肥厚性瘢痕はいずれも生命に直接の危険を及ぼすことはないが、しばしば治療抵抗性で患者の生活の質を著しく低下させる。

ケロイド・肥厚性瘢痕の保存的治療においては、線維芽細胞の増殖抑制、コラーゲンの生合成のコントロールが主目的となる。実際の治療法としては、圧迫療法、ステロイド局所投与、トラニラスト内服、レーザー治療など、複数の治療法を併用して行う。外科的切除による再発率は高く、切除後に電子線照射を必要とする。

【ケロイドと卵膜由来間葉系幹細胞】

ケロイド肥厚性瘢痕は、軽微な外傷や外科的侵襲を契機として皮膚が紅色あるいは褐色調に隆起し、激しい掻痒や疼痛を伴う醜状を呈する病変であり、患者に身体的・精神的苦痛を生じる。その病態は炎症を伴う線維性増殖で、創傷治癒過程の何らかの異常によって生じると考えられているが、その詳細なメカニズムは依然として不明な部分も多い。治療法としては手術単独では再発率が高く、放射線治療やステロイド局注を併用するが、治療に難渋する。

一方、近年注目されている間葉系幹細胞は、免疫調整作用、抗線維化作用、創傷治癒促進作用があることが明らかにされており、骨髄や脂肪から分離培養された細胞が

様々な炎症性疾患や線維化疾患へと応用されている。中でも、卵膜由来間葉系幹細胞は通常分娩時に破棄される胎児付属物からドナーの侵襲なく大量に得ることができる。卵膜は胎児と羊水を囲む薄い膜で、それ自体が妊娠成立に重要となる免疫寛容能を持つ。

卵膜由来間葉系幹細胞がもつ、抗炎症、抗線維化、創傷治癒促進作用が、創傷治癒過程の異常であるケロイドの慢性炎症、線維性増殖に対し、抑制的に働く可能性がある。これまでに、卵膜由来間葉系幹細胞のケロイドへの応用を検討した報告はなく、難治性疾患であるケロイドに対し、有効な作用を持つ卵膜由来間葉系幹細胞を用いて検証することは意義があると考えた。

【ケロイドについて】

ケロイドは局所の持続する炎症と線維化がその病態であり、創傷治癒の遅延も関与すると考えられているがその詳細な病態の解明には至っていない。適切な動物モデルが存在しないという研究障害もある。

当教室では現在までに、ケロイド組織内で制御性 T 細胞が相対的に不足し炎症反応が遷延している可能性や、prostaglandin E_2 (PGE_2) の産生低下がケロイドの成因に関与していること等を示してきた。[1,2]

ケロイドの分子生物学的性質については未だ不明な点が多いが、これまでにケロイド由来線維芽細胞（以下、KF）は正常皮膚由来線維芽細胞（以下、NF）に比して TGF(transforming growth factor)-β を過剰に産生していること、また TGF-β に対する特異な感受性を示し、その結果として線維芽細胞の高い細胞増殖能とⅠ型コラーゲンを主体とした細胞外基質の産生亢進をきたしていることなどが報告されている。また、TGF-β は正常な線維芽細胞を瘢痕やケロイド部位で見られる myofibroblast に分化させることが知られている。この分化の過程で myofibroblast は αSMA と呼ばれる特殊なタンパク質を細胞内に蓄積する。傷を収縮することに関与する αSMA の過剰な発現もケロイドの病態に関与していると考えられている。

[3] TGF-β はケロイドの病態形成において中心的な役割を果たしている重要な因子である。本研究では、ケロイド由来線維芽細胞を TGF-β で刺激し活性化したものを実験に用いた。

【卵膜由来間葉系幹細胞について】

間葉系幹細胞は間葉系に属する細胞への分化能を有する細胞であり、近年、遺伝子操作なく入手可能な再生医療の新たなソースとして注目されている。分化能のみならず、パラクライン効果による制御性 T 細胞(Treg)の誘導促進や prostaglandin

E2(PGE2)産生を介する免疫調整能、抗炎症作用が認められており、さらには、線維化抑制や創傷治癒促進作用を有することも報告されている。[4] これまでに慢性炎症性疾患や線維化疾患への応用のための研究が進んでいる。

間葉系幹細胞の中でも、卵膜に由来する間葉系幹細胞は、本来分娩時に破棄される胎児付属物である胎盤からドナーの侵襲なく大量に採取培養することができる。免疫寛容をもつ胎盤から得られる間葉系細胞であることも、その治療応用の可能性は高い。

卵膜由来間葉系幹細胞の培養上清は、細胞から分泌されるさまざまな作用を持つ生理活性物質を含有している。本研究ではこの培養上清を実験に用いた。

【本研究で明らかにすること】

慢性炎症性線維化疾患で、創傷治癒の遷延がその病態を増悪させる性質をもつケロイドに対し、免疫調整作用、抗線維化作用、創傷治癒促進作用のある卵膜由来間葉系幹細胞を作用させ、その効果を明らかにすることを本研究の目的とした。

ケロイドには適切な動物モデルが存在しないため、ケロイドの性質を有するケロイド由来線維芽細胞を TGF-β で活性化し、卵膜由来間葉系細胞の培養上清を作用させ、その反応について評価することとした。

線維芽細胞の増殖に与える影響を検証する他、αSMA、SM22αの変化や、細胞外基質であるⅠ型、Ⅲ型コラーゲンの他、細胞外基質の蓄積と分解に関与する MMP2、TIMP1 について測定し評価する。

ケロイドに対する卵膜由来間葉系幹細胞の有効性を検討し、治療応用を目指すことが目的である。

【本研究の結論】

本研究では、卵膜由来間葉系幹細胞がケロイド治療に応用できる可能性が明らかとなった。

実験方法

1. 組織の採取、病理標本作製、線維芽細胞の培養

ケロイド（7 例）、成熟瘢痕(3 例)、正常皮膚(3 例)より手術時に組織を採取した。臨床検体の採取、取扱いについては、北海道大学大学院医学研究科・医学部医学科医の倫理委員会、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に申請して承認を得た。同委員会の規定に沿って研究を実施した。

正常皮膚(3 例)に関しては、非炎症性疾患の別手術時に余剰として破棄する予定の正常部分を対象とした。採取したそれぞれの組織の一部は、病理組織観察目的にブロックを作成し、HE、αSMA の染色を行った。その他の部分の組織は、explant 法にて線維芽細胞の初代培養を行った。2～5 継代の細胞を実験に使用した。

初代培養は以下の方法で行った。組織を滅菌操作で、表皮部分を含まない真皮層を 1 辺 2mm 程度の大きさに細分化し、100mm dish に付着させ、そこへ 10% fetal bovine serum ＋ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ＋ 100 units/mL penicillin,100μg/mL streptomycin で構成した培養液を添加し、インキュベーター内で 37℃、5%CO_2 の環境で培養した。培養液は同じ構成で適宜交換し、組織片は培養開始 1 週間後に同 dish 内で位置を移動させ、2 週間後に破棄した。線維芽細胞の増殖を観察しながら必要に応じて継代をした。

2. 卵膜由来間葉系幹細胞の培養と培養上清の作成

帝王切開時、胎盤組織から羊膜を用手的に採取して胎児側の膜である卵膜を分離する。コラゲナーゼ処理を行い卵膜由来間葉系幹細胞の初代培養を行う。数継代後に 250mm dish に播種、10% fetal bovine serum ＋ αMEM ＋ 100 units/mL penicillin,100μg/mL streptomycin で構成した培養液にて培養し、confluent の状態になったところで、PBS で 2 回洗浄、続けて無血清 αMEM で 1 回洗浄後、無血清 αMEM20ml で培養する。48 時間経過したところで 0.45μm のフィルターを通して MSC 培養上清を回収した。

回収した MSC-CM の一部は Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 3K を用いて 5 倍濃縮し、3kDa 以上の高分画培養上清(CM-H)と 3kDa 以下の低分画培養上清(CM-L)に分けた。

3. MTS assay

96well plate に 1well あたり 3000cells/100µl で細胞を播種し、10% fetal bovine serum ＋ αMEM ＋ 100 units/mL penicillin,100µg/mL streptomycin で 24 時間培養後、PBS で 2 回洗浄し、各 well に対し次の 8 種の添加培地 100µl で置換した。①αMEM ② CM ③ CM-H ④ CM−L ⑤αMEM＋TGFβ1 ⑥ CM＋TGFβ1 ⑦ CM-H＋TGFβ1 ⑧ CM−L＋TGFβ1 （TGFβ1 濃度は 10ng/ml）

培地置換 48 時間後に各 well に CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を 20µl 加え、インキュベーター内で 37℃、5%CO_2 の環境で 24 時間反応後に 490nm の波長で吸光度を測定した。（GloMax® -Multi Detection System）

3. **CCK8 (cell counting kit 8)**

96well plate を用いて、線維芽細胞を 4000cells/100µl で播種。24 時間後、次の 4 種で培地交換 ①αMEM ② CM ③αMEM＋TGFβ1 ④ CM＋TGFβ1。(TGFβ1 濃度は 10ng/ml) 培地交換直後、24 時間後、48 時間後、72 時間後に CCK8(Dojindo) 10µl 添加し、2 時間後、450nm の波長で吸光度を測定した。（GloMax® -Multi Detection System）

4. **6well plate による線維芽細胞の培養と MSC-CM の添加 RNA 抽出**

線維芽細胞を 6well plate に 1well あたり 6×10^4 で播種し、10% fetal bovine serum ＋ αMEM ＋ 100 units/mL penicillin,100µg/mL streptomycin で 24 時間培養後、PBS で 2 回洗浄し、各 well に対し次の 8 種の添加培地で置換した。①αMEM ② CM ③ CM-H ④ CM−L ⑤αMEM＋TGFβ1 ⑥ CM＋TGFβ1 ⑦ CM-H＋TGFβ1 ⑧ CM−L＋TGFβ1

培地置換 48 時間後に培養細胞を回収し、細胞のホモジナイズを行い (QIAGEN QIAshredder)、スピンカラム法にて total RNA を抽出した（QIAGEN RNeasy Mini Kit)。抽出の過程においてゲノム DNA のコンタミネーションを防ぐ目的で DNase 処理を行った（QIAGEN RNase-Free DNase Set)。RNA の濃度は分光光度計（Nano Drop ND-1000,Thermo Fisher Scientific）で測定した。

5. 逆転写（RT:reverse transcription）反応

total RNA から RT により cDNA を作成した。逆転写酵素として The High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit(thermo fisher)を用いた。サーマルサイクラー（Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems）による RT 反応条件は 37℃ 15 分、85℃ 5 秒、4℃∞とした。

6. Real time PCR

熱変性 95℃・10 分，熱変性 95℃・15 秒-アニーリング／伸長反応 60℃・60 秒×40 サイクル, 融解曲線分析 95℃・15 秒-60℃・15 秒のプロトコールで real time PCR を行った。Real time PCR 装置は 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。使用したプライマー配列は以下の表 2 の通りである、内在性コントロールとして 18SrRNA を用いた。[5] Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems)を用いたインターカレーション法により PCR 増幅産物生成量を測定し、ΔΔCT 法により解析した。

7. 蛍光染色

チャンバースライドに、10000cells/1well で細胞播種。24 時間後、PBS 300μl/well で 2 回洗浄後、次の 4 種で培地添加 ①αMEM ② CM ③αMEM＋TGFβ1 ④ CM＋TGFβ1。（250μl/well,TGFβ1 濃度 10ng/ml）

培地交換より 48 時間後に蛍光染色した。PBS 300μl/well で洗浄後 4%パラホルムアルデヒド 300μl、室温で 15 分固定した。2%FBS 含有 HBSS(-) 300μl でリンスし、0.05% Triton 150μl 2 分間浸透処理。2% FBS 含有 HBSS 300μl で洗浄。一次抗体（Rb pAb to αSMA ab5694 0.2mg/ml）を 2% FBS 含有 HBSS で 500 倍希釈して細胞に 150μl/well 滴下，室温で 30 分インキュベートした。2% FBS 含有 HBSS 300μl で 5 分おいて洗浄した。二次抗体（Hoechst 33342,FITC anti

Rabbit）を 2% FBS 含有 HBSS で 500 倍と 5000 倍に希釈し、細胞に 150μl/well 滴下，室温で 30 分インキュベートした。2% FBS 含有 HBSS 300μl で 5 分おいて洗浄した。All-in-One Fluorescence Microscope　BZ-X700 で撮影した。

8. 統計学的解析

実験群と対照群について、One-way ANOVAおよびTurkey's post-hoc analysisによる多重比較を行った。$P<0.05$を有意差ありとした。(Graph Pad Prism Software, Ver. 6.0, San Diego, California, USA).

実験結果・考察

本文では、以上の方法により得られた結果を示し、考察を加えた。