



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                       |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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 [全文の要約]                                                                                                                                   |
| Author(s)           | 高橋, 周子                                                                                                                                                                |
| 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。<br><a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a> |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                                 |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                                                                                |
| Dissertation Number | 甲第14265号                                                                                                                                                              |
| Issue Date          | 2020-09-25                                                                                                                                                            |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/79452">https://hdl.handle.net/2115/79452</a>                                                                                     |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                       |
| File Information    | Hiroko_Takahashi_summary.pdf                                                                                                                                          |



# 学 位 論 文 (要約)

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)

2020 年 9 月

北海道大学

高橋 周子

Hiroko Takahashi



# 学 位 論 文 (要約)

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)

2020 年 9 月

北海道大学

高橋 周子

Hiroko Takahashi

## 緒言

【背景】 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。

当教室では消化器内科学教室と共同し、分娩後の胎盤からドナーの侵襲なく採取できる羊膜由来間葉系幹細胞を用いた研究を行っている。羊膜由来間葉系幹細胞および同細胞を培養して得られた培養上清（conditioned medium, CM）は、様々な消化器疾患の動物モデルに対して治療効果を示しており、クローン病に対する治験の開始など、臨床応用への準備が進められている。当教室ではCMがケロイド線維芽細胞の増殖や筋線維芽細胞への分化を抑制すること報告しており、次なる形成外科分野における応用対象として、糖尿病性足潰瘍を選択した。

糖尿病性足潰瘍は、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、新たな治療法の開発が望まれる。本研究では、低酸素培養した羊膜由来間葉系幹細胞のCMを糖尿病マウスの皮膚潰瘍に外用し、創傷治癒に及ぼす影響を評価した。羊膜由来間葉系幹細胞の血管新生、抗炎症作用に着目し、糖尿病性足潰瘍の新しい治療法としての可能性を検討した。

### 【目的】

1. 低酸素培養が羊膜由来間葉系幹細胞のパラクライン作用に及ぼす影響を検討する。
2. 羊膜由来間葉系幹細胞を用いた外用ゲルを作製する。
3. マウスを用いた糖尿病性潰瘍治療における羊膜由来間葉系幹細胞外用モデルを確立する。
4. 糖尿病マウスにおいて、低酸素培養した羊膜由来間葉系幹細胞から得られたCMの外用が創傷治癒に及ぼす影響を検討する。

## 第一章

### 羊膜由来間葉系幹細胞を用いた外用ゲルの作製

【緒言】 生理活性物質を産生、分泌し、周囲の細胞の機能を亢進あるいは抑制する作用をパラクライン作用という。間葉系幹細胞はパラクライン作用により、血管新生作用、抗炎症作用などを発揮して、創傷治癒を促進する。またこのパラクライン作用は、低酸素により増強することが、様々な組織由来の間葉系幹細胞において報告されている。しかし、羊膜由来間葉系幹細胞において、低酸素による影響は不明である。

創傷治癒の研究において、間葉系幹細胞およびその CM を外用する方法は多く行われている。臨床において外用法は簡便であり、患者本人でも行えるため、外来治療に用いることも可能である。このため、有効で応用可能な外用剤の作製は、臨床的意義が大きいと思われる。

第一章において、羊膜由来間葉系幹細胞を低酸素で培養し、パラクライン作用が増強するか検証した。また、コラーゲンゲルを用いた羊膜由来間葉系幹細胞含有ゲル、カルボキシメチルセルロースあるいは MedGel®を用いた CM ゲルを作製し、創部の外用に適するか検討した。

【方法】 羊膜由来間葉系幹細胞を正常酸素 (O<sub>2</sub> 21%) あるいは低酸素 (O<sub>2</sub> 1%) 環境で培養し、血管新生などに関わる mRNA 発現量および生理活性物質の分泌量を測定した。次に、コラーゲンゲルに異なる密度で細胞を播種し、正常酸素および低酸素で培養して細胞含有ゲルを作製した。細胞増殖速度、mRNA 発現、生理活性物質の分泌量について検討した。また、CM にカルボキシメチルセルロースを異なる濃度で混合してゲルを作製し、外用に適した濃度を検討した。最後に、MedGel®を用いた CM ゲルを作製し、VEGF-A の徐放量を測定した。

【結果】 低酸素培養により血管新生に関連する mRNA 発現量が亢進し、VEGF-A および b-FGF の産生量も亢進した。コラーゲンゲル 3 次元培養でも同様な結果が得られた。コラーゲンゲルにおいて、播種細胞密度  $1 \times 10^5/\text{ml}$  以下では増殖は不良であったが、 $5 \times 10^5/\text{ml}$  以上では良好な増殖を認めた。しかし、 $1 \times 10^6/\text{ml}$  以上では細胞が過密になり、72 時間後には細胞数が減少に転じた。CM ゲルの作製においては、カルボキシメチルセルロース濃度 5-7% で、外用に適した固さを得られた。CM を MedGel®に含浸させたゲルでは、VEGF-A の徐放を検出できなかった。

【考察】 低酸素が、羊膜由来間葉系幹細胞の血管新生や上皮化などに関わる液性因子の分泌を促進することが示唆された。羊膜由来間葉系幹細胞のコラーゲン 3 次元培

養においても同様の傾向が見られ、低酸素下で作製した CM あるいは細胞含有ゲルは高い創傷治癒作用を持つと考えられた。細胞含有ゲルは、細胞播種密度を  $5 \times 10^5/\text{ml}$  にすることで、細胞の生存率を上げ、より長い時間、液性因子を分泌させることが可能になると予想された。CM ゲルについては、カルボキシメチルセルロース濃度 5-7% が外用に適すると思われた。MedGel®を用いた CM ゲルでは、VEGF-A の徐放を確認することができず、十分な創傷治癒効果を期待できないため、第二章以降の実験には用いなかった。

## 第二章

### 糖尿病性潰瘍治療における羊膜由来間葉系幹細胞外用モデルの確立

【緒言】 小動物モデルにおいて、ストレプトゾトシンを投与して糖尿病を誘発する方法は以前より行われてきた。しかし、その投与方法には決まったプロトコールが存在せず、糖尿病の誘発に必要な投与量は系統によっても異なる。

一方、齧歯類における皮膚潰瘍モデルは、背部に直径 6-8 mm の皮膚全層欠損創を作成した研究が多い。また、糖尿病動物における創傷治癒は、非糖尿病のものに比べて遅延することが多数の研究で確認されている。

第二章において、マウスにストレプトゾトシンを異なる量で投与し、血糖値に及ぼす効果を検討した。その結果をもとに作成した糖尿病マウスを用いて、皮膚潰瘍を作成し、第一章で作製した羊膜由来間葉系幹細胞の細胞含有ゲルおよび CM ゲルを外用した。作成する潰瘍のサイズやゲルの濃度、量などを評価し、ゲル外用の効果を比較検討するのに有用なモデルを作成した。

【方法】 マウスにストレプトゾトシンの低用量 5 日間連続投与、中用量単回投与および高用量単回投与を行い、投与後 4 週間、血糖値の変化を観察した。次に、糖尿病を誘発したマウスおよび非糖尿病マウスの背部に皮膚全層欠損創を作成し、第三章に向けた予備実験を行った。正常酸素あるいは低酸素 CM ゲルを外用し、創閉鎖の経過を観察した。術後 8 日目と 15 日目に潰瘍組織を採取し、免疫組織化学的検索および PCR を行い、血管新生に及ぼす影響について比較した。また、細胞含有ゲルが創傷治癒に及ぼす影響についても同様に検討した。

【結果】 ストレプトゾトシンの中用量単回投与は血糖上昇を生じなかった。低用量連続投与および高用量単回投与は、全てのマウスで高血糖をきたしたが、低用量では高用量に比べて血糖の上昇が緩徐であった。創傷治癒は、非糖尿病マウスに比べ、糖尿病マウスで遅延した。CM ゲルおよび細胞含有ゲル外用により、創閉鎖および血管新生が促進され、その傾向は低酸素 CM で特に高かった。

【考察】 ストレプトゾトシンの低用量連続投与および高用量単回投与にて糖尿病を誘発することが可能であったが、高血糖に暴露される期間が長い方がより臨床に則していると考え、180 mg/kg 単回投与を採用した。糖尿病マウスにおける創傷治癒遅延、CM および細胞含有ゲル外用による創閉鎖の改善、血管新生の促進が見られたため、本実験で作成した皮膚潰瘍モデルは、羊膜由来間葉系幹細胞の糖尿病性潰瘍に対する治療効果を評価する上で、適当なモデルであると思われた。

### 第三章

#### 糖尿病マウスの創傷治癒に対する 羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清ゲル外用の治療効果の検討

【緒言】 様々な組織由来の間葉系幹細胞あるいはその CM の投与によって、糖尿病動物モデルの皮膚潰瘍が改善することが報告されている。ただし、羊膜由来の間葉系幹細胞を使用した報告は1件のみであり、CM を使用して羊膜由来間葉系幹細胞のパラクライン効果を評価した動物実験の報告はない。

また、低酸素で得られた CM は、非糖尿病マウスにおいて創傷治癒を促進する効果がさらに高いことが知られている。本研究では、第一章にて、羊膜由来間葉系幹細胞の低酸素 CM に血管新生促進因子、上皮化促進因子などが特に多く含まれることを明らかにした。また第二章において、低酸素 CM の外用が非常に簡易な方法であること、そして糖尿病マウスの創傷治癒を促進する可能性があることを示した。第三章では、サンプル数を増やし、糖尿病マウスにおいて低酸素 CM が創傷治癒を促進するか、統計学的評価も含めて検証した。

【方法】 非糖尿病マウスおよび糖尿病マウスの皮膚潰瘍に、正常酸素あるいは低酸素 CM ゲルを外用した。コントロールには標準培養液で作製したゲルを用いた。術後9日目に組織を採取し、免疫組織化学的検索およびPCRを行い、血管新生、上皮化、炎症に及ぼす影響について比較検討した。

【結果】 糖尿病マウスにおいて、低酸素 CM ゲルは有意に創閉鎖、血管新生および上皮化を促進し、炎症細胞の浸潤を抑制した。また、炎症関連遺伝子の発現を抑制する傾向も見られた。正常酸素 CM ゲルにも同様の傾向が見られたが、低酸素のものに比べ、その効果は低かった。非糖尿病マウスにおいては、両 CM ともに創閉鎖および血管新生を亢進する傾向が見られたが、その他については一定の傾向は認められなかった。

【考察】 羊膜由来間葉系幹細胞を低酸素培養して得た 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と考えられた。正常酸素 CM の創傷治癒効果は低酸素 CM に比べ低く、この差はそれぞれの CM に含まれる創傷治癒促進因子の量によるものと思われた。非糖尿病マウスにおける羊膜由来間葉系幹細胞の創傷治癒効果は、主に血管新生促進によるものと考えられた。

## 総括および結論

第一章において、低酸素環境は羊膜由来間葉系幹細胞のパラクライン作用を促進することが推測された。また、羊膜由来間葉系幹細胞およびCMを用いたゲルを作製し、それらが創傷治癒促進効果を持つ可能性を示した。

第二章において、糖尿病性潰瘍治療における羊膜由来間葉系幹細胞外用モデルを検討した。

第三章において、羊膜由来間葉系幹細胞を低酸素培養して得た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。本研究にて、羊膜由来間葉系幹細胞の低酸素CMによる、糖尿病足病変の新しい治療法の可能性が示唆された。