



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
Author(s)	高橋, 周子; Takahashi, Hiroko
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14265号
Issue Date	2020-09-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14265">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14265</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/84218">https://hdl.handle.net/2115/84218</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroko_Takahashi.pdf



# 学 位 論 文

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

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

## 目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
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	8 頁
方法	9 頁
結果	15 頁
考察	22 頁
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	25 頁
方法	26 頁
結果	30 頁
考察	36 頁
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	39 頁
方法	40 頁
結果	43 頁
考察	49 頁
総括および結論	52 頁
謝辞	55 頁
利益相反	56 頁
引用文献	57 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Hiroko Takahashi, Shunsuke Ohnishi, Yuhei Yamamoto, Toshihiko Hayashi, Naoki Muraio, Masayuki Osawa, Taku Maeda, Kosuke Ishikawa, Naoya Sakamoto and Emi Funayama  
Topical Application of Conditioned Medium from Hypoxically Cultured Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes Wound Healing in Diabetic Mice  
*Plastic and Reconstructive Surgery* (2020 年投稿済み)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 高橋周子、大西俊介、村尾尚規、舟山恵美、山本有平  
羊膜由来間葉系幹細胞を用いた糖尿病皮膚潰瘍の研究  
第 37 回北大形成外科アカデミー, 2018 年 12 月 8 日・札幌
2. 高橋周子、大西俊介、前田拓、村尾尚規、舟山恵美、山本有平  
羊膜由来間葉系幹細胞を用いた糖尿病皮膚潰瘍の研究 (第 2 報)  
第 39 回北大形成外科アカデミー, 2019 年 12 月 14 日・札幌
3. 高橋周子、大西俊介、伊藤梨里、佐藤千草、前田拓、大澤昌之、村尾尚規、林利彦、舟山恵美、山本有平  
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を目指して  
第 12 回日本創傷外科学会総会・学術集会, 2020 年 12 月 9 日・徳島 (予定)  
(新型コロナ禍のため 7 月 9 日より変更)

## 要旨

### 【背景と目的】

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。

### 【材料と方法】

第一章において、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<sup>®</sup>を用いた CM ゲルを作製し、VEGF-A の徐放量を測定した。

第二章において、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。

第三章において、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】

第一章において、低酸素培養により VEGF-A の 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。

第二章において、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。

第三章では、糖尿病マウスにおいて、低酸素 CM ゲルは有意に創閉鎖、血管密度および上皮化を促進し、マクロファージの浸潤を抑制した。また、好中球の浸潤を抑制し、T 細胞の浸潤を増加させ、炎症関連遺伝子である IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-1 および CXCL-2 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 とともに創閉鎖および血管密度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】

第一章において、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作成した。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。

#### 【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。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AMSCs	amnion-derived mesenchymal stem cells
b-FGF	basic fibroblast growth factor
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CM	conditioned medium
CXCL-1	chemokine ligand-1
CXCL-2	chemokine ligand-2
DM	diabetes mellitus
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HCM	hypoxic conditioned medium
HIF-1 $\alpha$	hypoxia inducible factor-1
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL-1 $\beta$	interleukin-1 $\beta$
IL-6	interleukin-6
IL-8	interleukin-8
MEM	minimal essential medium
MPO	myeloperoxidase
MSCs	mesenchymal stem cells
NCM	normoxic conditioned medium
PBS	phosphate buffered saline
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
SM	standard medium
VEGF-A	vascular endothelial growth factor-A

## 緒言

### 【背景】

糖尿病足病変 (図 1) は WHO の定義により、糖尿病患者の下肢に生じる感染、潰瘍、深部組織の破壊性病変とされ (van Netten et al., 2020)、難治性で予後不良である。2019 年、糖尿病に罹患した成人は世界中に 4 億 6300 万人いると報告され、2045 年には 7 億人に達すると予測されている (International Diabetes Federation, 2019)。糖尿病患者のうち約 15% が足潰瘍を発症し、そのうち 14-24% が切断に至る (American Diabetes Association, 1999)。下肢切断後の生存率は非糖尿病患者に比べ糖尿病性患者では低く、死亡率は初回切断後の 5 年で 45.8% と報告されている (Morbach et al., 2012)。足潰瘍は細小血管障害、末梢神経障害、慢性炎症、易感染性など複雑な病態のもとに生じ、外科的治療や保存的治療に抵抗性を示すことが多い。また頻回に再発し、さらに治療を困難にする (Armstrong et al., 2017)。このため、糖尿病性潰瘍の新しい治療法の開発は非常に重要な課題である。



図 1. 糖尿病性足潰瘍 (自験例)。(A)足背側. 感染と深部組織の壊死, 腱露出を認める。(B)足底側。(C)レントゲン像. 骨髓炎を伴う。(D)切断および植皮後。

一方、近年注目されている間葉系幹細胞は、さまざまな組織に存在し、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、内皮細胞など、多様な間葉系細胞に分化する (Pittenger et al, 1999)。また、様々なサイトカインを産生し、血管新生作用、抗炎症作用、神経再生促進作用など、創傷治癒を促進するパラクライン作用を持つ (Chen et al., 2008; Arno et al., 2014; Irons et al., 2018)。これらのパラクライン作用は、低酸素により増強されることが知られている (Chen et al., 2008; Lee et al., 2009; Liu L. et al., 2013; Chen et al., 2014; Jun et al., 2014; Paquet et al., 2015)。

糖尿病性潰瘍に関する再生医療の分野において、骨髄と脂肪組織に由来する間葉系幹細胞が最も多く研究されているが (Lopes et al., 2018)、当教室では消化器内科学教室の組織再生幹細胞研究グループと共同し、羊膜由来の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は、産後に医療廃棄される胎盤から豊富に入手できるため、その採取に関しドナーに侵襲をきたさない。したがって、成人組織の間葉系幹細胞と比較して、使用に関する倫理的問題は少ない (In 't Anker et al., 2004; Alviano et al., 2007)。また、胎児組織由来のため、細胞老化がなく、増殖性が高いなど、利点の多い細胞資源である。これまでに消化器内科学教室では、羊膜由来間葉系幹細胞の全身投与により、ラットの急性重症腸炎 (Onishi et al., 2015)、放射線直腸炎 (Ono et al., 2015)、膵炎 (Kawakubo et al., 2016)、および肝線維症 (Kubo et al., 2015) が改善されたことを報告した。これらの効果は、移植細胞から分泌された生理活性物質によると示唆された。さらに、羊膜由来間葉系幹細胞を培養して得られた培養上清

(conditioned medium, CM) の局所投与は、ブタの内視鏡的粘膜下層剥離術 (Mizushima et al., 2017; Tsuda et al., 2018) およびラットの重度の大腸炎 (Miyamoto et al., 2017) 後の食道および直腸の狭窄を抑制した。一方、当教室では、CM が *in vitro* でケロイド線維芽細胞の増殖と活性化を抑制し (Sato et al., 2018)、羊膜由来間葉系幹細胞がパラクライン効果を発揮することを確認した。

本研究では、羊膜由来間葉系幹細胞の CM の外用が、糖尿病性足病変の治療を促進し、その効果は低酸素で得られた CM においてさらに増強するとの仮説を立てた。羊膜由来間葉系幹細胞の低酸素 CM が糖尿病マウスの創傷治療に及ぼす影響を評価し、その機序につき検討した。

#### 【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 の外用が創傷治療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

## 1.1 緒言

### 1.1.1 背景

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、神経再生促進作用、免疫調整作用などを発揮して、創傷治癒を促進する (Chen et al., 2008; Arno et al., 2014; Irons et al., 2018)。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、骨髄、脂肪および羊水由来の間葉系幹細胞において報告されている (Chen et al., 2008; Lee et al., 2009; Liu L. et al., 2013; Chen et al., 2014; Jun et al., 2014; Paquet et al., 2015)。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 の投与には様々な方法が用いられている。そのうち、皮内および皮下を含めた局所注射が最多であり (Lopes et al., 2018)、全身投与と比べて創傷治癒効果が高いことが報告されている (Kwon et al., 2008)。外用する方法も多く行われており、ハイドロゲルを含めたコラーゲン製の媒体が最も多く使用されている (Lopes et al., 2018)。その他に、フィブリンゲル (Pedroso et al., 2011) やフィブリンスプレー (Falanga et al., 2007)、ナノファイバー (Navone et al., 2014; He et al., 2015; Lu et al., 2016)、人工真皮 (Yoshikawa et al., 2008; Tuca et al., 2016; Ertl et al., 2018) などを用いた外用方法もとられており、いずれも創閉鎖の促進を認めているが、特に有効な方法として一致した見解はない。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。

### 1.1.2 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。

## 1.2 方法

### 1.2.1 羊膜由来間葉系幹細胞の培養と酸素濃度による影響の比較

#### 【羊膜由来間葉系幹細胞の分離、培養】

羊膜由来間葉系幹細胞の使用に関しては、北海道大学大学院医学研究院・医学部医学科 医の倫理委員会より承認を得て、「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従って実施した。胎盤の提供につき、採用されたすべての妊婦から書面による同意を得た。帝王切開時に得られる胎盤組織から羊膜を手動的に採取した（図2）。コラゲナーゼ（Brightase C; Nippi, Tokyo, Japan）とディスパーゼ I（Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）で処理を行い羊膜由来間葉系幹細胞を分離後、10% fetal bovine serum（FBS; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）と 100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン（Wako Pure Chemical Industries）を加えた minimal essential medium（MEM）- $\alpha$ （Life Technologies）を用いて初代培養を行った。培養環境は 37°C、95% air、5% CO<sub>2</sub> に設定した。3~4 日後に非接着細胞を除去し、接着細胞は 80% confluence に達するまで培養を継続した。0.5% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid（Life Technologies）を用いて細胞継代を行い、3~5 継代後に Cell Banker（Takara Bio, Shiga, Japan）を用いて凍結保存した。

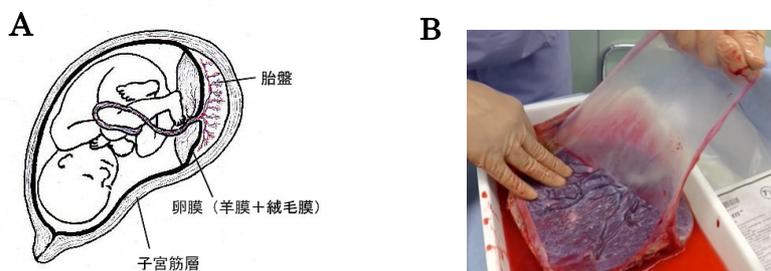


図2. 羊膜の採取. (A)妊娠中の子宮. (B)羊膜の手動的採取.

#### 【細胞の観察および撮影】

倒立型蛍光顕微鏡（Olympus IX70; Olympus, Tokyo, Japan）、顕微鏡デジタルカメラ DP72 および対応ソフト DP2-BSW (ver 2.2; Olympus) を用いて細胞を観察、撮影した。

#### 【Total RNA 抽出】

37°Cで細胞を解凍後、150 mm の培養 dish に播種し、10% FBS、100 U/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシンを加えた  $\alpha$ -MEM (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) で培養した（標準設定：37°C、95% air、5% CO<sub>2</sub>）。Subconfluent になった時点で 6-well

plate に継代し、正常酸素 (O<sub>2</sub> 21%) あるいは低酸素条件 (O<sub>2</sub> 1%) に設定したインキュベーターで培養した。24 時間後、スピнкаラム法にて total RNA を抽出した (QIA Shredder, RNeasy Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany)。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 (RNase-Free DNase Set; Qiagen)。得られた RNA の濃度は分光光度計 (Nano Drop ND-1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定した。

#### 【逆転写反応】

High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用し、total RNA から逆転写反応により cDNA を作成した。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) による逆転写反応条件は、37°C・60 分、95°C・5 分、4°C・∞に設定した。

#### 【Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)】

初期熱変性 95°C・10 分、熱変性 95°C・15 秒、アニーリング/伸長反応 60°C・1 分×40 サイクルのプロトコールで qPCR を行った。PCR 装置は StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用した。cDNA 5 μl および Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 10 μl を含む total 20 μl のリアクションミックスを用い、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、 $\Delta\Delta CT$  法により解析した。内在性コントロールとして hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) を用いた。使用したプライマーを表 1 に示す。

表 1 : プライマー配列 (ヒト)

Gene	Primer sequence
HPRT	F: GACCAGTCAACAGGGGACAT
	R: GTGTCAATTATATCTTCCACAATCAAG
HIF-1 $\alpha$	F: TGGACTCTGATCATCTGACC
	R: CTCAAGTTGCTGGTCATCAG
VEGF-A	F: AGTCCAACATCACCATGCAG
	R: TTCCCTTTCCTCGAACTGATTT

## 1.2.2 CM の作製と生理活性物質の測定

### 【CM の作製】

37°Cで細胞を解凍後、150 mm の培養 dish に播種した。1-2 継代後、subconfluent の状態に増殖した時点で phosphate buffered saline (PBS; Life Technologies) で dish を 2 回洗浄し、続けて無血清  $\alpha$ -MEM で 1 回洗浄後、無血清  $\alpha$ -MEM 20ml を加えた (図 3)。正常酸素あるいは低酸素条件で培養し、48 時間後に培養上清を回収し、0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過したものをそれぞれ正常酸素培養上清 (normoxic conditioned medium, NCM)、低酸素培養上清 (hypoxic conditioned medium, HCM) とした。回収した CM は使用するまで -80°C で保存した。

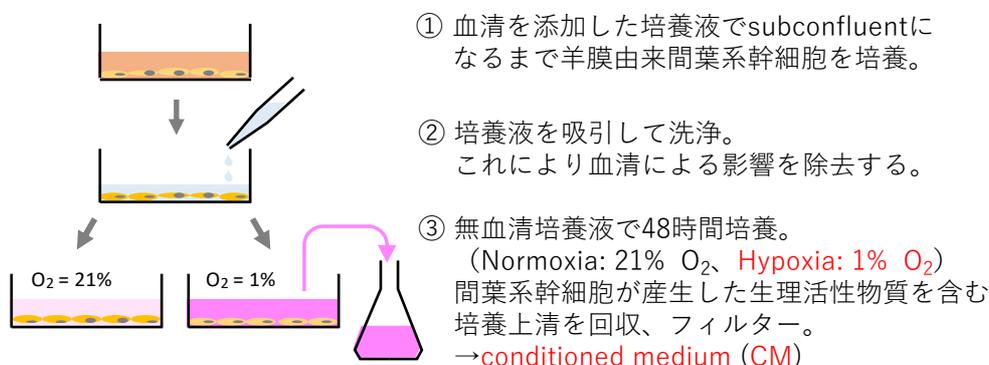


図 3. 培養上清の作製方法.

### 【Enzyme-linked immunosorbent assay】

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を行い、NCM と HCM に含まれる以下の生理活性物質量を測定し、標準培養液 (standard medium, SM) と比較した：

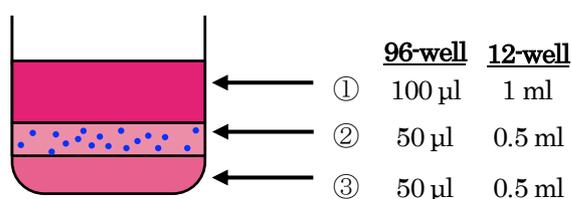
- 血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) (Quantikine ELISA, Human VEGF; R&D Systems)
- 塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor, b-FGF) (RayBio Human bFGF ELISA kit; RayBiotech, Peachtree Corners, GA, USA)
- インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) (RayBio Human IGF-1 ELISA kit; RayBiotech)
- アドレノメジュリン (LSBio Human ADM/Adrenomedullin ELISA kit; LifeSpan Biosciences, Seattle, WA, USA)

SM には無血清  $\alpha$ -MEM を用いた。

### 1.2.3 羊膜由来間葉系幹細胞含有ゲルの作製

#### 【ゲルの作製】

細胞培養用コラーゲンである Cellmatrix Type I-A (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) を用いた。水中で冷却しながら 0.3% Cellmatrix Type I-A、5 倍濃縮 DME 培養液 (Nitta Gelatin)、再構成用緩衝液 (Nitta Gelatin) を 7:2:1 の割合で混合し、コラーゲン混合溶液を作成した。このコラーゲン混合溶液を培養プレートの well に分注後、37°C のインキュベーターに入れてゲル化させ、base layer とした。次に細胞を少量の  $\alpha$ -MEM に分散させたものをコラーゲン混合溶液中に入れて攪拌し、base layer 上に分注後、直ちに 37°C でゲル化させて cell layer を作製した。Cell layer が硬化した後に、10% FBS と 100 U/mL ペニシリン-100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを加えた  $\alpha$ -MEM を重層した (overlay medium)。ゲルの作製には 96-well あるいは 12-well plate を用いた。それぞれの layer に使用したコラーゲン混合溶液あるいは培養液の量を図 4 に示す。



①overlay medium ( $\alpha$ -MEM)    ②cell layer (ゲル+細胞)    ③base layer (ゲルのみ)

図 4. Cellmatrix コラーゲン包埋培養.

#### 【Cell count】

細胞密度を  $1 \times 10^5$ /ml、 $5 \times 10^5$ /ml、 $1 \times 10^6$ /ml とし、96-well で 3 次元培養した。24、48、72 時間後にゲルを培養 well から剥がして 2 ml エッペンチューブに入れた。1% の濃度に溶解したコラゲナーゼ (Collagenase Type I; Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) を 20  $\mu$ l 添加し、37°C、300 rpm で振盪しながら 1 時間インキュベートしてゲルを溶解した。PBS 5 ml を加え、1,500 rpm で 5 分遠心して細胞を沈殿させた後、上清を吸引し、新たに PBS 10 ml を加えた。細胞が均一になるように十分にピペッティングし、自動セルカウンター (Countess; Invitrogen) を用いて細胞浮遊液中の細胞数をカウントした。

#### 【細胞増殖 assay】

Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて細胞の増殖度を測定した。細胞密度は  $1 \times 10^4$ /ml、 $1 \times 10^5$ /ml、 $1 \times 10^6$ /ml、 $1 \times 10^7$ /ml を用いた。12-well

plate で細胞を 3 次元培養し、24、48、72 時間培養後、ゲルをデルマパンチでくり抜いて直径 4 mm のディスク状にしたものを 96-well plate に移植した (図 5)。 $\alpha$ -MEM を 100  $\mu$ l、CCK-8 溶液を 10  $\mu$ l ずつ各 well に添加し、標準設定のインキュベーターで 2 時間培養した。マイクロプレートリーダー (Infinite F200; Tecan Japan, Kawasaki, Japan) を用いて、波長 450 nm で吸光度を測定した。

また、細胞密度  $5 \times 10^4$ /ml、 $5 \times 10^5$ /ml、 $5 \times 10^6$ /ml を用い、正常酸素および低酸素下で培養した。24 あるいは 48 時間培養後、96-well plate に直径 5 mm のゲルを移植し、 $\alpha$ -MEM を 100  $\mu$ l、CCK-8 溶液を 10  $\mu$ l ずつ各 well に添加、標準設定のインキュベーターで 3 時間培養して吸光度を測定した。

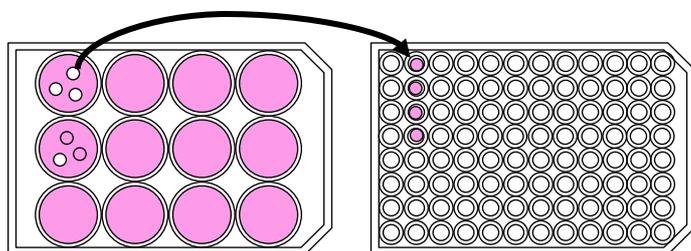


図 5. CCK-8 assay におけるゲルの準備. 12-well plate で作製したゲルをデルマパンチでくり抜き、96-well plate に移植した.

#### 【qPCR】

12-well plate、 $5 \times 10^5$ /ml の細胞密度で正常酸素および低酸素培養を行なった。48 時間後にコラゲナーゼを用いてゲルを溶解し、PBS 5 ml を加え、1,500 rpm で 5 分間遠心した。上清を吸引し、回収した細胞に RLT Buffer (Qiagen) 350  $\mu$ l を添加、攪拌して細胞を破碎した (TM-252 Test Tube Mixer; Iwaki, Shizuoka, Japan)。1.2.1 と同様に total RNA 抽出、cDNA 作製、qPCR を行った。

#### 【ELISA】

12-well plate、 $5 \times 10^5$ /ml の細胞密度で正常酸素および低酸素培養を行なった。48 時間後に CM を回収して ELISA を行い、VEGF-A、b-FGF、IGF-1、アドレノメジュリンの含有量を測定した。

#### 1.2.4 カルボキシメチルセルロースを用いた羊膜由来間葉系幹細胞の CM ゲルの作製

カルボキシメチルセルロースの濃度を決定するため、 $\alpha$ -MEM に異なる量で混合し、その流動性を確認した。50 ml の遠沈管に  $\alpha$ -MEM を 30 ml ずつ分注し、濃度が 2-8% になるように粉末状のカルボキシメチルセルロースナトリウム (Wako Pure Chemical Industries) をそれぞれ混合した。ゲルが均一になるまで 1 時間以上 4°C で静置した後、その流動性を観察した。

#### 1.2.5 MedGel<sup>®</sup>を用いた羊膜由来間葉系幹細胞の CM ゲルの作製

MedGel<sup>®</sup>シート II (Nitta Gelatin) には PI5 および PI9 の 2 種類があり、薬剤の負荷や分子量などによって徐放に最適なゲルの種類が異なるため、マニュアルに従い最適ゲルの選択を行なった。2 ml のエッペンチューブに MedGel<sup>®</sup> (PI5 あるいは PI9) を 2 mg 入れ、PBS、NCM あるいは HCM を 20  $\mu$ l 滴下して含浸させた (図 6)。30 分経過後、1/10 PBS を 1 ml ずつ加え、37°C で穏やかに振盪し、半数は 8 時間後に、残りは 24 時間後に PBS を全量回収しサンプル溶液とした。ELISA に使用するまで -80°C で保存した。4°C で解凍し、ELISA にて VEGF-A の含有量を測定した。

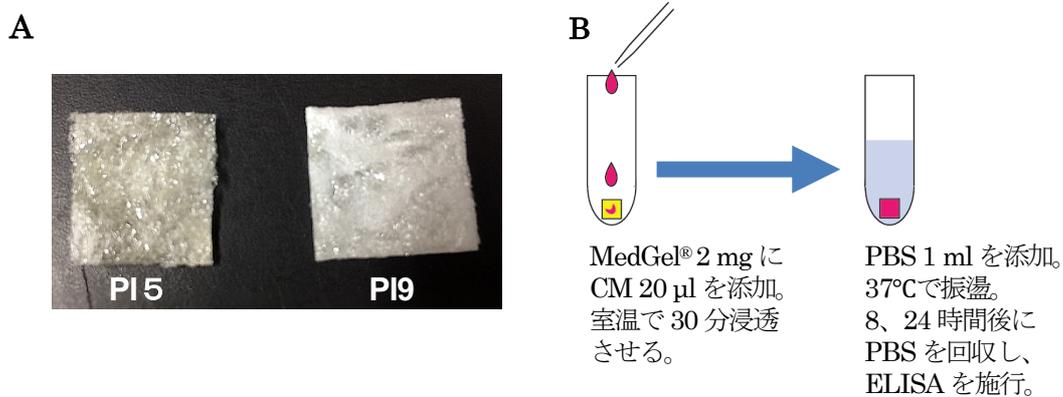


図 6. MedGel<sup>®</sup>の選択. (A) MedGel<sup>®</sup>の外観. (B) 徐放に最適なゲルの選択方法.

## 1.3 結果

### 1.3.1 羊膜由来間葉系幹細胞の低酸素培養

低酸素培養が羊膜由来間葉系幹細胞の mRNA 発現に及ぼす影響について検討した。低酸素培養により、VEGF-A の発現量は上昇したが、その差はわずかであった (図 7)。HIF-1 $\alpha$  の発現には減少が認められた。

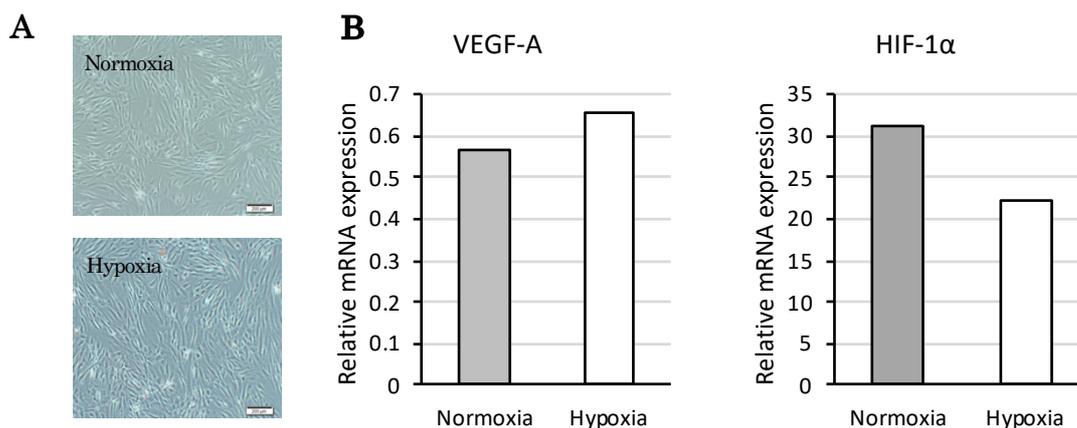


図 7. 低酸素培養が羊膜由来間葉系幹細胞に及ぼす影響. (A)鏡頭像. (B) qPCRにて定量した mRNA 発現量. Scale bars; 200  $\mu$ m. n = 1.

VEGF-A, vascular endothelial growth factor-A; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$

### 1.3.2 低酸素による CM 内の生理活性物質への影響

羊膜由来間葉系幹細胞を正常酸素および低酸素で培養して CM を回収し、それぞれに含まれる生理活性物質を ELISA で測定し比較した (図 8)。VEGF-A および b-FGF はどちらの CM にも多量に含まれていたが、低酸素培養することにより含有量が大幅に増加した。IGF-1 およびアドレノメジュリンについては酸素条件に関わらず、検出限界以下であった (IGF-1 < 100 pg/ml, アドレノメジュリン < 15.6 pg/ml)。

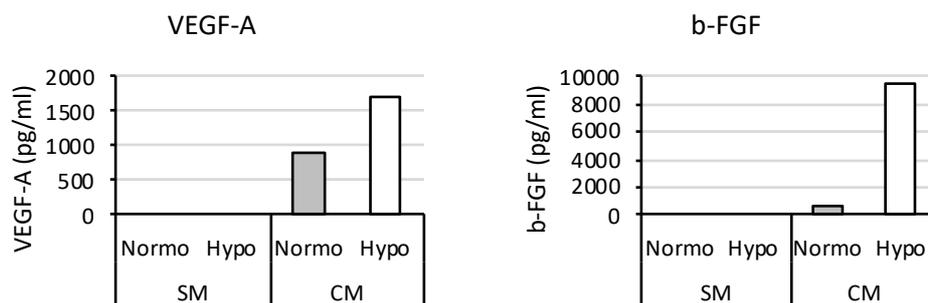


図 8. 羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清に含まれる生理活性物質. n = 1.

VEGF-A, vascular endothelial growth factor-A; b-FGF, basic fibroblast growth factor; Normo, normoxia; Hypo, hypoxia; SM, standard medium; CM, conditioned medium

### 1.3.3 羊膜由来間葉系幹細胞含有ゲルの作製

コラーゲンゲルに異なる濃度で細胞を播種して 3 次元培養を行い、一定時間後の細胞増殖度、mRNA 発現、生理活性物質の産生について検討した。

#### 【コラーゲンゲル培養における羊膜由来間葉系幹細胞の播種細胞密度と細胞増殖】

まず、 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 、 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 、 $1 \times 10^6/\text{ml}$  で 3 次元培養し、24、48、72 時間後の細胞数をカウントした (図 9)。いずれの濃度でも細胞数は経時的に増加したが、 $1 \times 10^5/\text{ml}$  および  $5 \times 10^5/\text{ml}$  ではその増加は少なく、鏡頭像と乖離が見られた。 $1 \times 10^6/\text{ml}$  では著増が認められた。コラゲナーゼでゲルを溶解した後の細胞浮遊液を顕微鏡で観察したところ、細胞塊が多数認められ、カウントされた細胞数が実際よりかなり少ないことが示唆された。ゲルの溶解が不完全であることが考えられ、コラゲナーゼの作用時間を延長して再度施行したが、同様の結果であった。

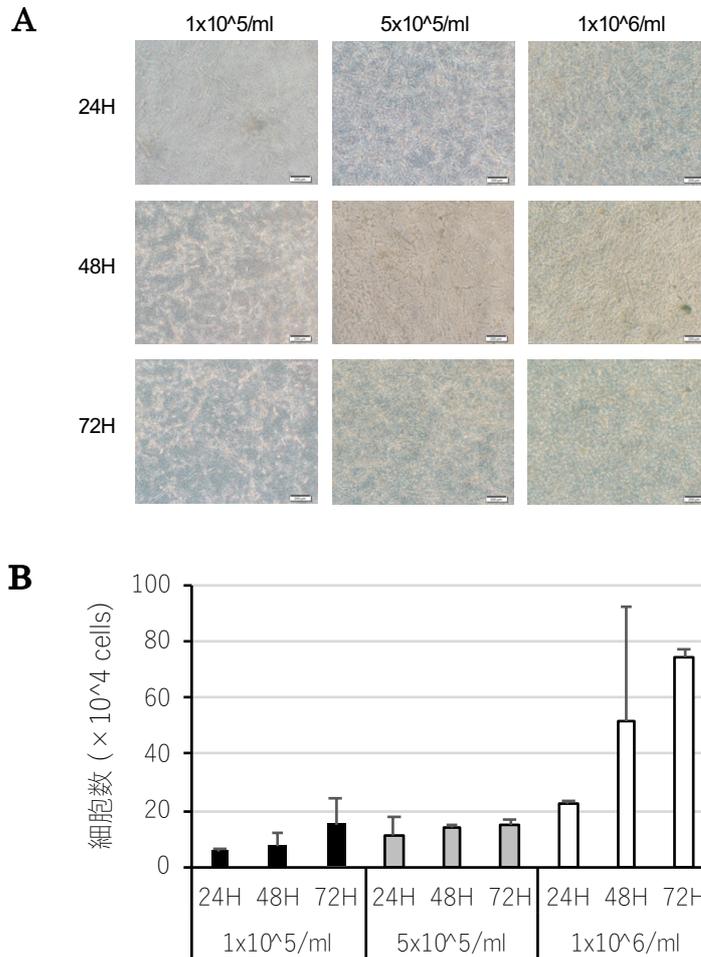


図 9. コラーゲンゲル 3 次元培養における羊膜由来間葉系幹細胞の細胞数の変化。(A)鏡頭像. (B) Cell count による細胞数. データは mean ± standard error で示した. n = 2. Scale bars; 200 μm.

続いて、細胞塊による影響を避けるため、CCK-8 assay を用いて細胞増殖度を比較した。まず正常酸素条件、細胞密度 1×10<sup>4</sup>/ml、1×10<sup>5</sup>/ml、1×10<sup>6</sup>/ml、1×10<sup>7</sup>/ml で検討した (図 10)。1×10<sup>4</sup>/ml、1×10<sup>5</sup>/ml では細胞が疎なままで、吸光度の増加は認められなかった。1×10<sup>6</sup>/ml、1×10<sup>7</sup>/ml では鏡頭像で高い細胞密度を認め、吸光度は 48 時間で上昇を認めたが、72 時間では減少した。次に細胞密度 5×10<sup>4</sup>/ml、5×10<sup>5</sup>/ml、5×10<sup>6</sup>/ml を用い、正常酸素および低酸素下で培養した (図 11)。48 時間後の吸光度は、5×10<sup>5</sup>/ml・正常酸素のみで上昇を認め、他は全て減少していた。

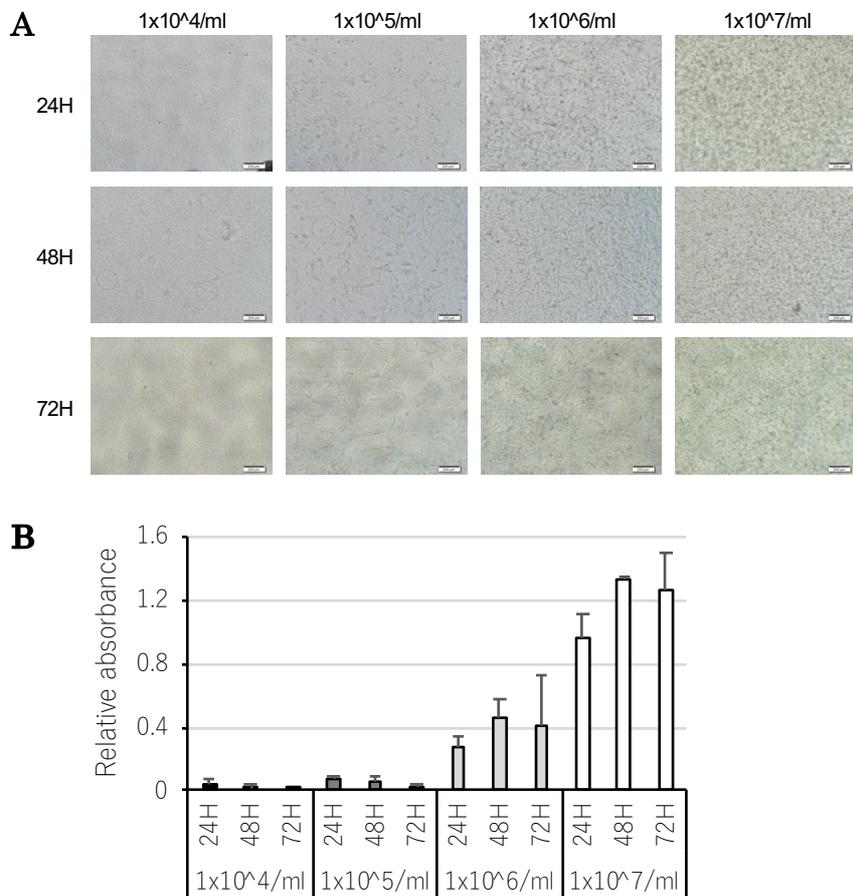


図 10. 正常酸素条件、コラーゲンゲル 3 次元培養における羊膜由来間葉系幹細胞の CCK-8 assay の結果. 顕頭像(A). CCK assay における吸光度(B). データは mean ± standard error で示した. n = 3. Scale bars; 200 μm.

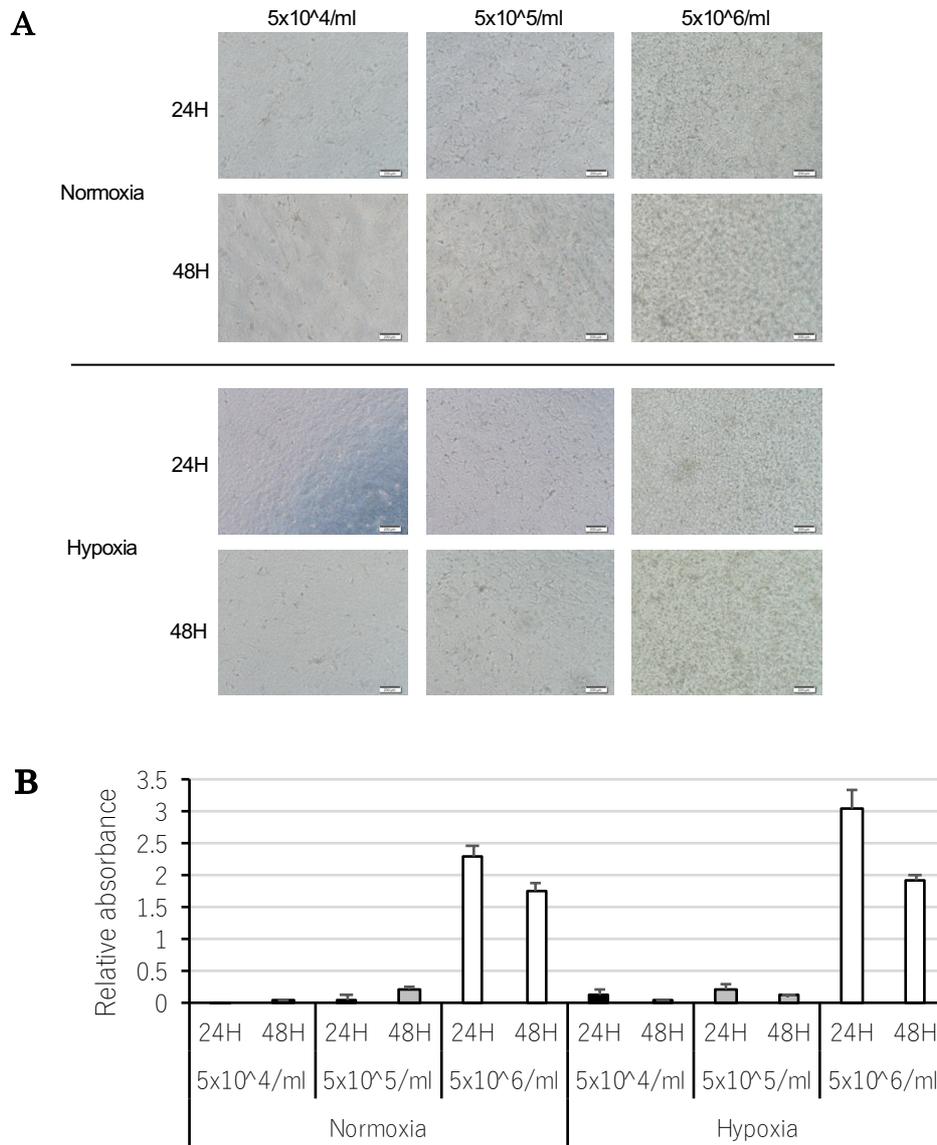


図 11. 正常酸素および低酸素条件、コラーゲンゲル 3 次元培養における羊膜由来間葉系幹細胞の CCK-8 assay の結果. 鏡頭像(A). CCK assay における吸光度(B). データは mean ± standard error で示した. n = 3. Scale bars; 200 μm.

**【コラーゲンゲル 3 次元培養において低酸素が羊膜由来間葉系幹細胞の mRNA 発現に及ぼす影響】**

正常酸素および低酸素条件下に、5×10<sup>5</sup>/ml で 3 次元培養を行い、48 時間後の mRNA 発現を qPCR にて比較した (図 12)。低酸素培養により VEGF-A、HIF-1α の発現量が亢進した。

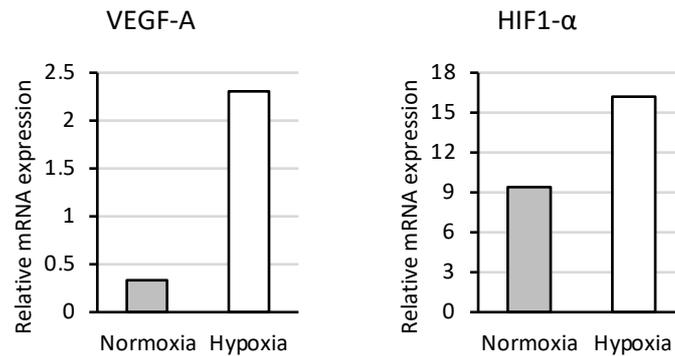


図 12. コラーゲンゲル 3 次元培養において低酸素が羊膜由来間葉系幹細胞の mRNA 発現に及ぼす影響. n = 1.

VEGF-A, vascular endothelial growth factor-A; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$

【コラーゲンゲル 3 次元培養において低酸素が羊膜由来間葉系幹細胞の生理活性物質の産生に及ぼす影響】

正常酸素および低酸素条件下に、 $5 \times 10^5$ /ml で 3 次元培養を行い、48 時間後の CM に含まれる生理活性物質の量を比較した (図 13)。VEGF-A は正常酸素条件で 515 ng/ml と十分な検出量であり、その量は低酸素により約 4 倍 (2,326 ng/ml) にまで上昇した。b-FGF は正常酸素では検出されなかったが、低酸素では 8,640 pg/ml と高値を認めた。IGF-1 は正常酸素では 0.6 ng/ml、低酸素では 1.6 ng/ml と微量ながら検出された。アドレノメジュリンはともに検出限界以下であった (< 15.6 pg/ml)。

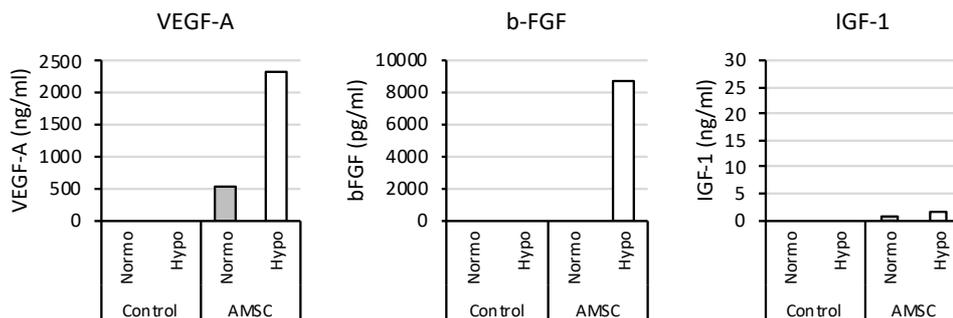


図 13. コラーゲンゲル 3 次元培養において低酸素が羊膜由来間葉系幹細胞の生理活性物質の産生に及ぼす影響. n = 1.

VEGF-A, vascular endothelial growth factor-A; b-FGF, basic fibroblast growth factor; IGF-1, insulin-like growth factor-1; Normo, normoxia; Hypo, hypoxia; AMSC, amnion-derived mesenchymal stem cells

### 1.3.4 カルボキシメチルセルロースゲルを用いた CM ゲルの作製

カルボキシメチルセルロースを  $\alpha$ -MEM に異なる濃度で溶解し、その流動性を確認した。混合直後はゲルが不均一であったが、1時間以上静置することで、均一なゲルになった。2-4%については、粘度がかなり低く、容易に流れて周囲に広がってしまった。5-7%では創部に留まる固さを保ちつつ、創面に均一に塗布するにあたり十分な流動性が残っていた。8%ではゲルが非常に固くなり、創面に伸ばすのが非常に困難と判断した。

### 1.3.5 Medgel<sup>®</sup>を用いた CM ゲルの作製

Medgel<sup>®</sup>に CM を含ませた後、徐放される VEGF-A の量を ELISA で測定した。Medgel<sup>®</sup>の種類に関わらず、VEGF-A は検出限界以下であった (< 15.6 ng/ml)。

## 1.4 考察

### 1.4.1 低酸素培養が羊膜由来間葉系幹細胞に及ぼす影響

間葉系幹細胞のパラクライン機能は低酸素にて亢進することが知られている。様々な組織由来の間葉系幹細胞で、低酸素培養による VEGF-A および b-FGF の分泌量増加が認められている (Chen et al., 2008; Lee et al., 2009; Liu L. et al., 2013; Chen et al., 2014; Jun et al., 2014; Paquet et al., 2015)。*In vitro* では、低酸素 CM は、正常酸素 CM に比べ、ヒト皮膚線維芽細胞の増殖と遊走をより強く促進する (Lee et al., 2009; Jun et al., 2014)。さらに、低酸素 CM はヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖および管腔形成を亢進する (Liu L. et al., 2013; Chen et al., 2014)。本研究では、羊膜由来間葉系幹細胞を低酸素下で培養し、正常酸素条件に比べ、VEGF-A の mRNA 発現量がわずかながら増加することが示唆された。また低酸素 CM は VEGF-A と b-FGF をより多く含有しており、過去の他組織由来間葉系幹細胞の報告と一致していた。したがって、羊膜由来間葉系幹細胞の低酸素 CM は、線維芽細胞や血管内皮細胞に対して高いパラクライン効果を発揮し、創傷治癒を促進する可能性が考えられた。

Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 $\alpha$ ) は低酸素により発現が誘導される転写因子であり、VEGF-A および b-FGF は、HIF-1 $\alpha$  依存性に上昇する (Calvani et al., 2006; Rey and Semenza, 2010)。このため、低酸素培養により羊膜由来間葉系幹細胞の HIF-1 $\alpha$  の発現が亢進することを期待したが、軽度の減少を認め、VEGF-A、b-FGF の上昇と矛盾する結果であった。しかし、n=1 であったため、サンプル数を増やして検討する必要があると思われた。また、タンパク質レベルでも検討すべきであったと考える。

また、IGF-1 およびアドレノメジュリンも、HIF-1 $\alpha$  を介して発現が増加するため (Chen et al., 2012; Du et al., 2014)、低酸素培養による分泌量の増加が期待されたが、正常酸素および低酸素 CM のどちらにも、IGF-1 とアドレノメジュリンを検出することができなかった。過去の文献では、羊膜由来間葉系幹細胞は羊膜上皮細胞に比べて IGF-1 の mRNA 発現が亢進しており、その CM に IGF-1 は 12.8 pg/10<sup>6</sup> cells 含まれていた (Wu et al., 2017)。CM の IGF-1 濃度は 88.8 pg/10<sup>6</sup> cells であったという報告もある (Yamahara et al., 2014)。今回使用した ELISA キットの検出限界は 100 pg/ml であり、15 cm dish における細胞数が 5-10 $\times$ 10<sup>6</sup> cells、CM 量が 20 ml とすると、IGF-1 の最低検出可能濃度は 200-400 pg/10<sup>6</sup> cells となる。つまり、より感度の高い方法を用いて測定する必要があると考えられた。アドレノメジュリンに関しては、骨髄由来間葉系幹細胞による産生が報告されているが (Li et al., 2009)、その CM における含有量や羊膜由来間葉系幹細胞については明らかではなく、さらなる検証が必要である。

#### 1.4.2 羊膜由来間葉系幹細胞を用いた外用ゲルの作製

コラーゲンゲルに含まれる細胞数をカウントするため、コラゲナーゼでゲルを溶解して細胞を回収した。自動細胞測定器でカウントしたが、同じグループ内でも細胞数に大きな差が見られた。また、72時間後の鏡頭像では、播種密度  $1 \times 10^5/\text{ml}$  に比べて  $5 \times 10^5/\text{ml}$  は明らかに細胞数が多かったが、カウントされた細胞数は両者とも  $1.5 \times 10^5$  cells であるなど、鏡頭像とカウント数に乖離が見られた。細胞浮遊液を顕微鏡で観察すると、多数の細胞塊が見られた。このため、コラゲナーゼでゲルが十分に分解されず、細胞塊を形成してしまったため、実際よりも少なくカウントされた可能性が高いと判断した。コラゲナーゼの作用時間を延長して再施行しても同様であり、この方法では十分な評価ができないと判断した。そこで、細胞塊による影響を避けるため、CCK-8 assay を行った。CCK-8 は、細胞中の脱水素酵素により産生される NADH の量を反映する生細胞数測定キットであり、細胞を包埋培養したまま細胞数を測定することが可能である。

CCK-8 assay の結果、播種細胞密度  $1 \times 10^5/\text{ml}$  以下では細胞間相互作用が不十分となり、細胞増殖が乏しくなると考えられた。反対に、 $5 \times 10^6/\text{ml}$  以上ではすぐに細胞が過密になるために細胞死をきたし、細胞数の減少につながると考えられた。CCK-8 assay の結果からは、 $5 \times 10^5/\text{ml}$  -  $1 \times 10^6/\text{ml}$  付近が適当な播種細胞密度と思われたが、鏡頭像にてゲルスペースに余裕の残る  $5 \times 10^5/\text{ml}$  を用いて細胞含有ゲルを作製することとした。

コラーゲンゲル3次元培養においても、低酸素による影響を検討した。48時間後の細胞増殖度は正常酸素培養と同等であったが、通常の単層培養と同様に、低酸素により VEGF-A の mRNA 発現が亢進した。また HIF-1 $\alpha$  の発現も亢進しており、低酸素応答として矛盾しない結果であった。パラクライン作用については、低酸素により VEGF-A、b-FGF の分泌量が増加した。単層培養では検出されなかった IGF-1 についても、微量ながら検出され、低酸素により分泌量が増加する傾向が見られた。したがって、コラーゲンゲル3次元培養においても、低酸素環境が羊膜由来間葉系幹細胞のパラクライン作用を増強することが分かった。

#### 1.4.2 カルボキシメチルセルロースを用いた羊膜由来間葉系幹細胞 CM ゲルの作製

カルボキシメチルセルロースは、食物繊維の成分であるセルロースの誘導体であり、臨床ではキシロカインゼリーなどの基剤として用いられている。下剤、歯磨剤、界面活性剤、食品の増粘剤・乳化安定剤などにも使われており、その安全性は確立されている。当大学消化器内科学教室の組織再生幹細胞研究グループでは、カルボキシメチルセルロースを用いて羊膜由来間葉系幹細胞の CM ゲルを作製し、内視鏡的粘膜下切除後の食道および直腸粘膜欠損部に塗布することで、術後狭窄が抑制されることを報

告した (Mizushima et al., 2017; Tsuda et al., 2018)。同グループではカルボキシメチルセルロースを 5%の濃度で用いた。本研究では 2-8%の異なる濃度でゲルを作製し、外用に適する濃度を検討した。5-7%ゲルが創部に外用に適すると判断し、第二章で行われた動物実験には 5%ゲルを用いることに決定した。

#### 1.4.2 MedGel®を用いた羊膜由来間葉系幹細胞 CM ゲルの作製

MedGel®は体内で生理活性物質の徐放を可能にするゼラチンベースの生体吸収性ハイドロゲルである。当教室では、末梢神経の成長因子であるニューレグリン-1 を MedGel®に含浸させて神経縫合部に移植することで、ラットの顔面神経麻痺の回復が促進されることを報告した (Yasui et al., 2016)。本研究では、MedGel®に羊膜由来間葉系幹細胞の CM を含浸させ創部に外用することで、様々な成長因子等が徐放され、創傷治癒が促進されることを期待した。しかし、PI5 と PI9 どちらの MedGel®からも VEGF-A の徐放を定量することができなかった。濃縮した CM を用いることで VEGF-A の放出量を増加させ、ELISA で検出することが可能になると予想されたが、カルボキシメチルセルロースを用いたゲル作製よりも手技が煩雑になるため、本実験では MedGel®を用いないこととした。

## 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

#### 2.1 緒言

##### 2.1.1 背景

小動物モデルにおける糖尿病の誘発には、遺伝的、化学的、食餌、外科的など多くの方法がある (Cheta, 1998; Chen and Wang, 2005; Rees and Alcolado, 2005; Deeds et al., 2011)。このうち、ストレプトゾトシンを用いた化学的な方法は、1963年に初めて報告されて以来、その迅速性と高い費用効果のため、糖尿病性潰瘍を含め、多くの糖尿病関連研究で用いられてきた (Rakieten et al., 1963; Deeds et al., 2011)。臨床において転移性膵島細胞癌の治療に使用されているストレプトゾトシンは、膵島のインスリン産生 $\beta$ 細胞に対して毒性のある広域抗生物質であり、多くの齧歯類でインスリン分泌不全をきたし、糖尿病を誘発することが可能である (Deeds et al., 2011)。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、マウスの大腿 (Assi et al., 2016) やラットの足底 (Kato et al., 2014) に皮膚欠損創を作成したものもあるが、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 (Wu et al., 2007; Tark et al., 2010)。また、糖尿病マウスあるいはラット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 (Kwon et al., 2008; Kuo et al., 2011)。

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。

##### 2.1.2 目的

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。

## 2.2 方法

### 2.2.1 動物実験計画

本研究は、動物実験計画「ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の糖尿病性皮膚潰瘍に対する効果」(承認番号 17-0001)の一研究として行った。「動物の愛護及び管理に関する法律」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、その他関係法令等に基づき、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則り研究を遂行した。

### 2.2.2 使用動物

雄の ICR マウス(ブリーダー：Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Shizuoka, Japan；販売：Sankyo Labo Service Corporation, Sapporo, Japan)を5週齢で購入した。マウスは北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設にて、室温 24°C、12 時間間隔の人工蛍光管理、標準飲食管理の下に飼育された。馴化のため入舎後1週間の予備飼育期間を設けた。術前は1ケージあたり3-5匹、術後は1匹ずつとした。

### 2.2.3 糖尿病マウスの作成

#### 【実験1】

ストレプトゾトシンの中用量単回投与 (Ito et al., 1999) にて糖尿病の誘発を試みた。マウス6匹を3群に分け、PBSに溶解したストレプトゾトシン (Wako Pure Chemical Industries) をそれぞれ70、100、130 mg/kg、27G 針の1 ml シリンジで腹腔内投与した。ストレプトゾトシンは7、10、13 mg を PBS 1 ml に氷上で溶解して遮光し、溶解後20分以内に投与した。

#### 【実験2】

低用量の5日連続投与 (Negishi et al., 1996) および高用量単回投与 (Dekel et al., 2009) も行った。マウス6匹を3群に分け、低用量連続投与群にはストレプトゾトシン 40 mg/kg を5日間、高用量単回投与群には150あるいは180 mg/kg をそれぞれ腹腔内投与した。ストレプトゾトシンは、低用量投与には10 mg/ml、高用量投与には40 mg/ml の濃度になるように PBS で溶解した。

#### 【血糖測定】

尾静脈を24G 針で穿刺して少量の静脈血を採取し、血糖測定器 (ONE TOUCH ウルトラビュー；Johnson and Johnson, Tokyo, Japan) を用いて、ストレプトゾトシン投与前、投与後1、2、3、4週に行った (図14)。血糖値が300 mg/dl 以上で糖尿病と判定した。

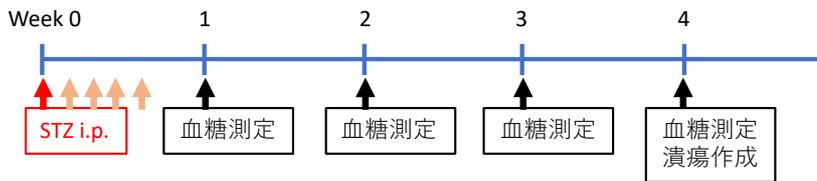


図 14. 糖尿病マウス作製のスケジュール.

## 2.2.4 皮膚潰瘍モデルの作成と創部処置

### 【麻酔・前処置】

全ての処置・手術は、イソフルラン(イソフルラン吸入麻酔液; Pfizer, Tokyo, Japan)2.5%吸入による全身麻酔下に行った。手術の前日、サージカルクリッパー(3M Surgical Clipper; 3M Health Care, Borken, Germany)およびチオグリコール酸を含む除毛フォーム(Ask Hair Remove; Manet, Tokyo, Japan)を用いて、マウスの背部を除毛した。

### 【実験 1】

2.2.3 で作成した糖尿病マウス 6 匹を用いた。デルマパンチ (生検トレパン; Kai Industries, Seki, Japan) を用いて、直径 6 mm の皮膚全層欠損創を背部両側に 1 ヶ所ずつ作成した (図 15)。必要に応じてバイポーラを使い止血した。術直後の創部に、5%カルボキシメチルセルロースで作製した SM ゲルあるいは NCM ゲルを 0.1 ml 外用し、フィルムドレッシング (Tegaderm; 3M Japan, Tokyo, Japan) で被覆した。術後 1、4、6、7、12 日目に創部を PBS で洗浄して観察後、再度ゲルを外用して被覆した。術後 4 日目以降はゲルのカルボキシメチルセルロース濃度を 7%に変更し、外用量を 0.05 ml に減量した。CM ゲルは、凍結保存しておいた CM にカルボキシメチルセルロース粉末を上記濃度で混合し、均一になるまで 4℃で 1 時間以上静置して作製した。作製後 48 時間以内のものを使用した。



図 15. 皮膚潰瘍の作成と創部処置.

## 【実験2】

新たに購入したマウス5匹を用いた。3匹にストレプトゾトシン 180 mg/kg を単回投与し糖尿病を誘発した。残りの2匹には同等量の PBS を投与し、非糖尿病マウスとした。それぞれ背部に直径 8 mm の皮膚全層欠損創を2ヶ所作成し、糖尿病マウスには SM、NCM、HCM を、非糖尿病マウスには SM、HCM ゲル (7%) を 0.05 ml ずつ外用した。術後 1、3、8、10、15 日後に創部の処置および観察を行なった。術後 8 日目に各マウスの両側の潰瘍の大きさを比較し、創閉鎖の早い方の組織を、潰瘍底を含めて採取した。対側の組織は術後 15 日目に採取した。組織はそれぞれ半割し、一方は組織学的検討に、他方は mRNA 抽出に使用した。

## 【実験3】

実験2と同様に糖尿病マウス、非糖尿病マウスを2匹ずつ準備し、潰瘍を作成した。それぞれ1匹には羊膜由来間葉系幹細胞をコラーゲンで3次元培養した amnion-derived mesenchymal stem cell (AMSC) ゲル、もう1匹には細胞を含まないコントロールゲルを外用し、被覆した。AMSC ゲルは、使用の48時間前に細胞を  $5 \times 10^5$ /ml 播種し(12-well plate)、標準設定のインキュベーターで培養したものをを用いた。外用直前に直径 8 mm のデルマパンチでくり抜き、ディスク状にして外用した。術後 2、4、7、9、14、16 日目に創部の処置および観察を行なった。9日目と16日目に片側ずつ組織を採取した。

## 【創傷閉鎖割合】

術直後および毎処置時、創部の写真撮影を行った。デジタル一眼レフカメラ (EOS Kiss X2; Canon, Tokyo, Japan) にマクロレンズ (EF 50 mm f/2.5 Compact Macro Lens; Canon) および接写専用ストロボ (Macro Ring Lite MR-14EX; Canon) を装着して撮影した。画像解析ソフト (ImageJ software; NIH, USA) を用いて残存する潰瘍面積を測定し、以下の数式で創傷閉鎖割合を算定した。

$$\text{創傷閉鎖割合(wound closing ratio, WCR)} = \left( 1 - \frac{\text{残存潰瘍面積}}{\text{術直後の潰瘍面積}} \right) \times 100\%$$

## 2.2.5 組織学的検討

組織は4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Wako Pure Chemical Industries) で固定後、パラフィン包埋し、H&E 染色を行った。Goat anti-CD31 (1:600; Cat#sc-1506; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を用いて免疫染色も行なった。組織スライドは、バーチャルスライドスキャナ (NanoZoomer S210; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を用いてスキャンした。デジタルデータは、画像閲覧ソフトウェア NanoZoomer Digital Pathology.view2 (Hamamatsu Photonics) を用いて観察した。免疫染色では、ラン

ダムに選択された 10 視野 (400 倍) の平均陽性面積を画像解析ソフト ImageJ で測定した。

## 2.2.6 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

【Total RNA 抽出】 組織は採取直後に RNAlater (Qiagen) 0.5 ml に浸漬し、total RNA 抽出まで -80°C で保存した。解凍後の組織を PBS で洗浄し、Micro Smash MS-100 (TOMY, Tokyo, Japan) を使用して破碎した。QIA Shredder (Qiagen) で組織をろ過後、プロテイナーゼ (Proteinase K; Qiagen) を 3  $\mu$ l 添加し、55°C で 10 分間インキュベートした。1.2.1 と同様に total RNA の抽出、cDNA の作製、qPCR を行なった。内在性コントロールとして glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。実験 3 ではヒト GAPDH も用いた。使用したプライマーを表 2 に示す。

表 2 : プライマー配列

Gene	Primer sequence
GAPDH (mouse)	F: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	R: TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG
VEGF-A (mouse)	F: CCCACGTCAGAGAGCAACAT
	R: TGCGCTTTCGTTTTTGACCC
b-FGF (mouse)	F: GGCTGCTGGCTTCTAAGTGT
	R: GTCCCGTTTTGGATCCGAGT
GAPDH (human)	F: TGTGGTCATGAGTCCTTCCA
	R: CGAGATCCCTCCAAAATCAA

## 2.3 結果

### 2.3.1 糖尿病の誘発

マウスにストレプトゾトシンの低用量連続投与、中用量単回投与および高用量単回投与を行い、血糖の変化を観察した(図16)。まずは中用量の単回投与を行ったが、70、100、130 mg/kgのいずれも血糖値の上昇を認めなかった。次に低用量連続投与あるいは高用量単回投与を行なった。いずれのグループでも投与21日後には高血糖値(>300 mg/dl)を認め、28日後には500 mg/dlを超えていた。40 mg/kgの5日間連続投与では比較的上昇が緩やかであったが、180 mg/kgの単回投与では2匹とも7日後には300 mg/dlを、21日後には600 mg/dlを超え、血糖値の急激な上昇を認めた。

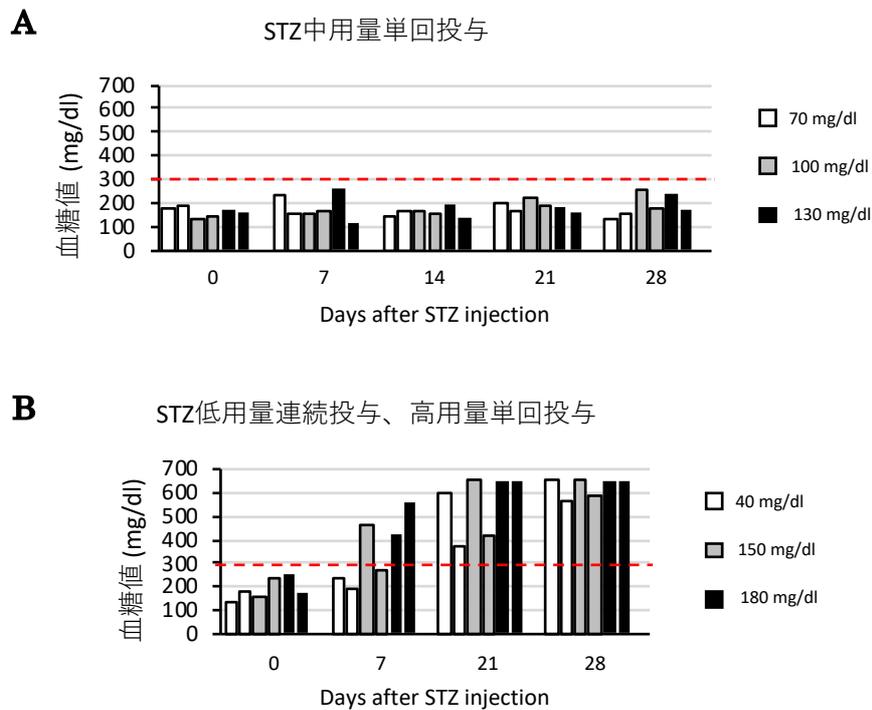


図16. ストレプトゾトシン投与による血糖値の変化。(A)中用量単回投与による血糖値の経過。(B)低用量連続投与および高用量単回投与による血糖値の経過。STZ, streptozotocin

### 2.3.2 皮膚潰瘍モデルの作成

糖尿病マウスの背部に直径 6 mm の皮膚潰瘍を作成し、SM ゲルあるいは NCM ゲルを外用して創傷治癒の経過を観察した (図 17)。SM 群では術後 1 日目に潰瘍面積の拡大を認めたが、以降は NCM 群と同様に順調に創閉鎖が進み、2 群間に明らかな差は見られなかった。術後 12 日目に全てのマウスで創閉鎖が得られた。術直後、術後 1 日目はゲルを 0.1 ml ずつ外用したが、量が多く潰瘍辺縁から溢出してしまい、フィルムドレッシングが剥がれ易くなってしまった。創面が乾燥して結果に影響を及ぼす可能性が考えられたため、以降はゲルを 0.05 ml に減量し、フィルムドレッシングの十分な接着を得ることができた。また、カルボキシメチルセルロースの濃度を 5% としたが、外用後に創部の浸出液を吸収してゲルの流動性が上がるため、濃度を 7% に変更した。

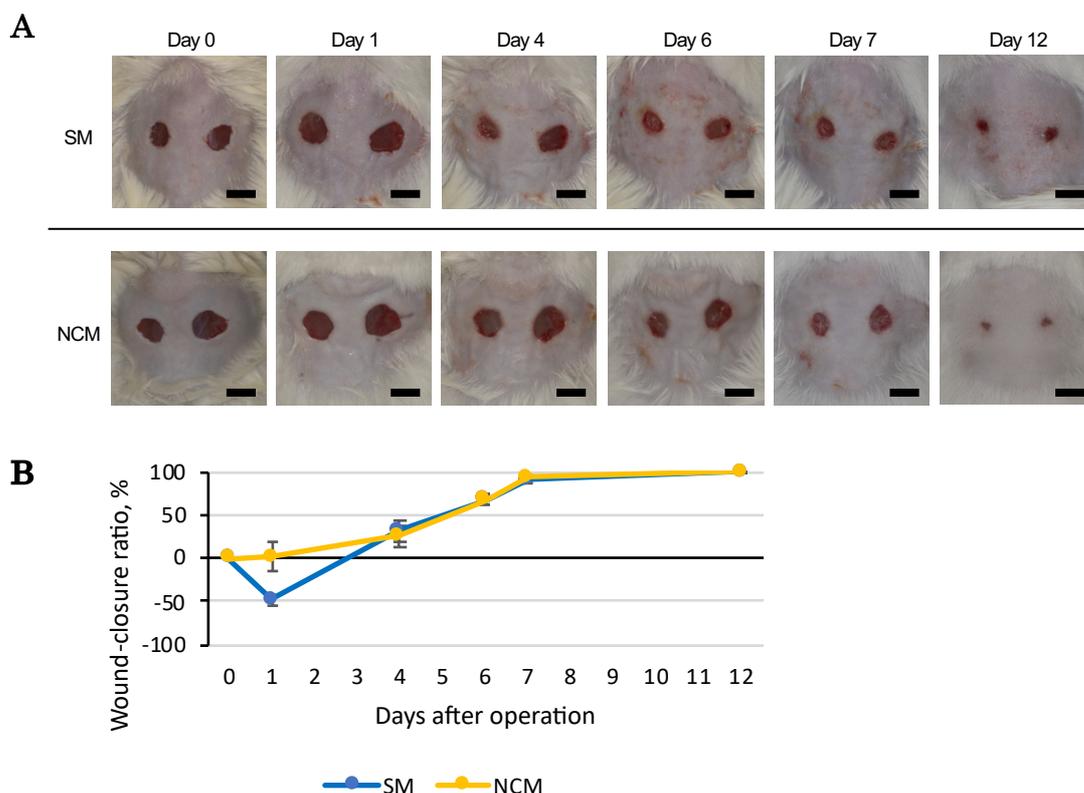


図 17. 培養上清ゲル外用が糖尿病マウスの創傷治癒に及ぼす影響. (A)肉眼的所見. (B)創傷閉鎖割合の経過. データは mean  $\pm$  standard error で示した. n = 6. Scale bars; 5 mm.

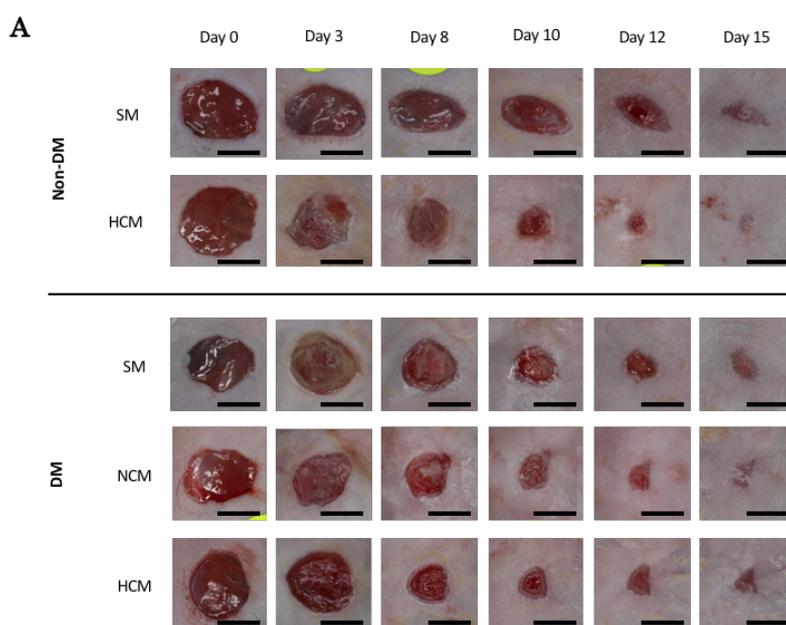
SM, standard medium; NCM, normoxic conditioned medium

### 2.3.3 CM ゲルが創傷治癒に及ぼす影響

非糖尿病マウスと糖尿病マウスの背部皮膚潰瘍に SM、NCM あるいは HCM ゲルを外用し、創傷治癒の経過を観察した (図 18A, B)。実験 1 で直径 6 mm の潰瘍が術後 12 日とやや早い経過で完全上皮化したため、潰瘍を直径 8 mm に拡大した。非糖尿病マウスでは、SM に比べ HCM で創閉鎖が早かった。糖尿病マウスにおいては、SM で創治癒遅延が見られたが、NCM と HCM では創閉鎖が促進された。完全上皮化までの期間は non-DM/HCM および DM/HCM で術後 12 日と最も早く、次いで DM/NCM の 14 日、最後に non-DM/SM および DM/SM の 15 日であった。術後 8-12 日目で創閉鎖割合の差が大きかった。

次に組織の CD31 染色を行い、血管密度を比較した (図 18C, D)。術後 8 日目、非糖尿病マウスでは SM に比べ HCM で CD31 陽性面積が大きかった。糖尿病マウスでは SM < NCM < HCM の順で面積の拡大を認め、非糖尿病マウスよりも糖尿病マウスで陽性面積が大きかった。術後 15 日目の組織では、全群間に明らかな差は見られず、8 日目に比べ全体的に CD31 陽性面積が減少していた。

さらに qPCR を行い、mRNA 発現を比較した (図 18E)。術後 8 日目の VEGF-A の発現は、非糖尿病マウスでは SM が HCM より高かった。糖尿病マウスでは SM と NCM で同程度に発現が抑えられていたが、HCM で上昇を認めた。術後 15 日目では DM/NCM の発現が 8 日目より上昇したが、その他は減少し、全体的には 8 日目と同様の傾向であった。術後 8 日目の b-FGF は、non-DM/SM に比べて non-DM/HCM で上昇したが、DM/SM では更に上昇し、DM/NCM、DM/HCM では減少していた。術後 15 日目では、non-DM/SM に比べて DM/HCM のみで上昇を認め、それ以外は減少していた。



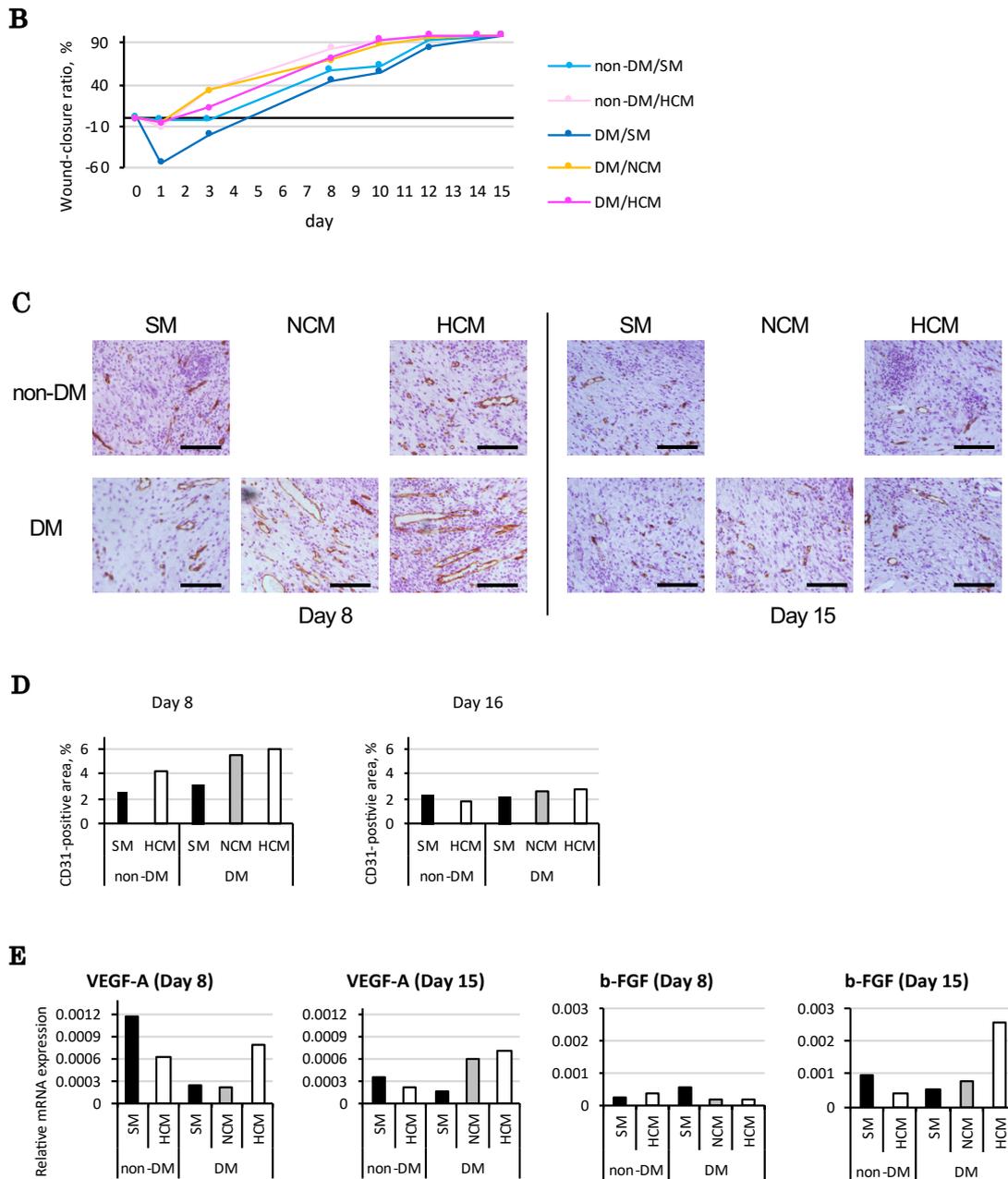


図 18. 正常酸素および低酸素培養により得られた培養上清ゲルがマウスの創傷治癒に及ぼす影響. (A)肉眼的所見. (B)創傷閉鎖割合の経過. (C) CD31 免疫染色の鏡頭像. (D) CD31 陽性面積の比較. (E) mRNA 発現量の比較. データは mean  $\pm$  standard error で示した.  $n = 1$  (B については  $n = 2$  for Day 0-8,  $n = 1$  for Day 9-15). Scale bars; 5 mm (A), 100  $\mu$ m (C).

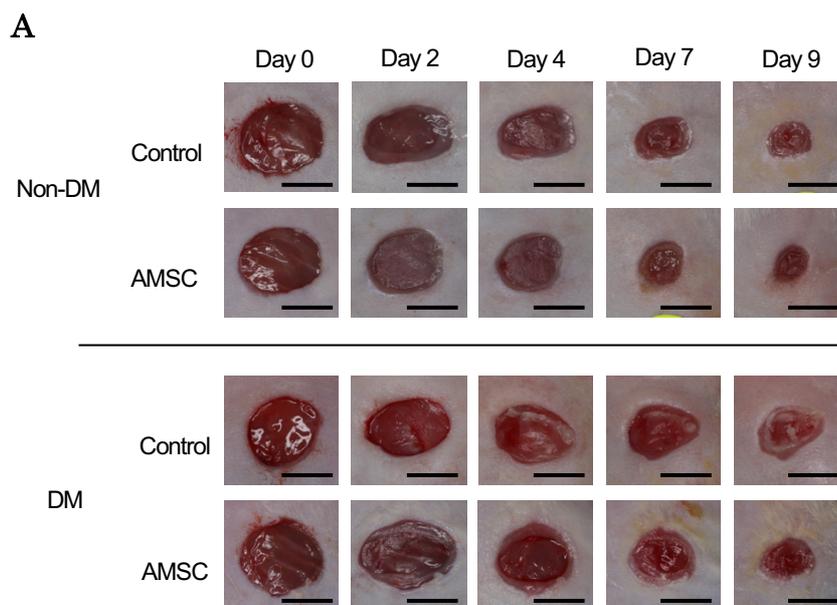
DM, diabetic mellitus; SM, standard medium; NCM, normoxic conditioned medium; VEGF-A, vascular endothelial growth factor-A; b-FGF, basic fibroblast growth factor

### 2.3.4 羊膜由来間葉系幹細胞含有ゲルが創傷治癒に及ぼす影響

非糖尿病マウスと糖尿病マウスの背部皮膚潰瘍に AMSC ゲルを外用し、創傷治癒の経過を観察した (図 19A, B)。全体的には、non-DM/AMSC > non-DM/control ≒ DM/AMSC > DM/control の順で創閉鎖が早かった。完全上皮化までの期間は全ての群で 12 日であった。術後 4-9 日目で創閉鎖割合の差が大きかった。

次に組織の CD31 染色を行い、血管密度を比較した (図 19C, D)。術後 9 日目、non-DM/control に比べ non-DM/AMSC では CD31 陽性面積のわずかな減少を認めた。DM/control ではさらに減少したが、DM/AMSC では non-DM/AMSC と同レベルまで上昇した。術後 16 日目の組織では、non-DM、DM それぞれの 2 群間に明らかな差は見られなかったが、non-DM より DM の陽性面積が大きかった。9 日目に比べ DM/control のみで上昇を認め、その他は減少していた。

最後に qPCR を行い mRNA 発現を比較した (図 19E)。術後 9 日目の VEGF-A の発現は、non-DM/control に比べ non-DM/AMSC および DM/control では減少していたが、DM/AMSC では同程度であった。術後 16 日目では 9 日目に比べ発現が大幅に減少し、全群間で明らかな差は見られなかった。術後 9 日目の b-FGF は、DM/control が他群に比べわずかに上昇していたが、大きな差は見られなかった。術後 16 日目では、全体で 8 日目より発現が上昇しており、non-DM、DM とともに control が AMSC より高かった。全群においてヒト GAPDH は増幅されず、外用した羊膜由来間葉系幹細胞は潰瘍組織内には存在しないことが示唆された。



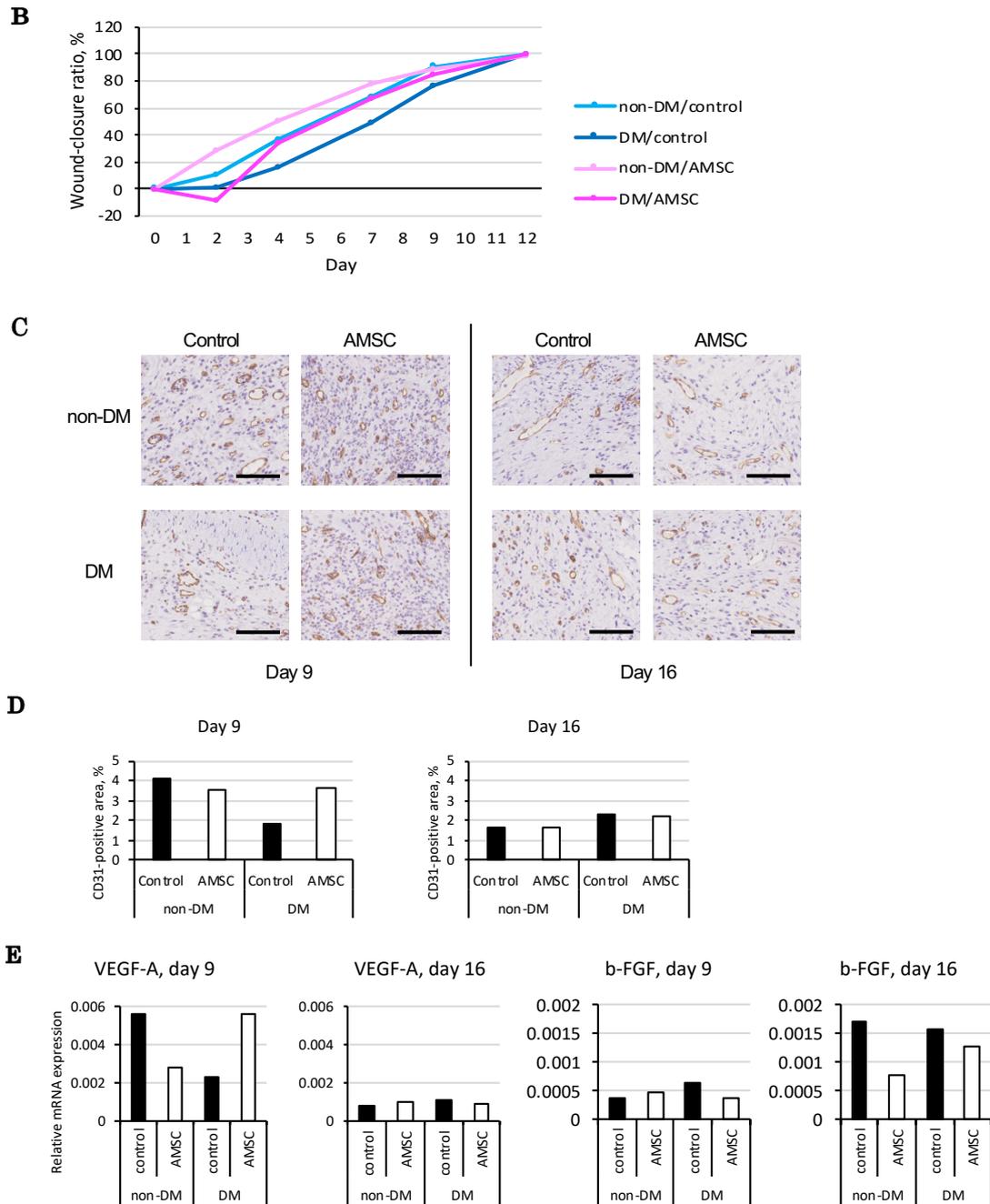


図 19. 羊膜由来間葉系幹細胞含有ゲルがマウスの創傷治癒に及ぼす影響。(A) 肉眼的所見。(B)創傷閉鎖割合の経過。(C) CD31 免疫染色の鏡頭像。(D) CD31 陽性面積の比較。(E) mRNA 発現量の比較。データは mean  $\pm$  standard error で示した。n = 1 (B については n = 2 for Day 0-9, n = 1 for Day 10-13)。Scale bars; 5 mm (A), 100  $\mu$ m (C)。

DM, diabetic mellitus; AMSC, amnion-derived mesenchymal stem cell; VEGF-A, vascular endothelial growth factor-A; b-FGF, basic fibroblast growth factor

## 2.4 考察

### 2.4.1 糖尿病の誘発

確実に糖尿病を誘発するために、ストレプトゾトシンの投与量の検討を行った。本研究で用いた ICR マウスに関しては、低用量 (40 mg/kg) の 5 日連続投与 (Negishi et al., 1996)、中用量 (100 mg/kg) の単回投与 (Ito et al., 1999) および高用量 (150-180 mg/kg) の単回投与 (Dekel et al., 2009) など様々な投与量で糖尿病が誘発されることが報告されている。まず、中用量の単回投与を試みたが、70、100、130 mg/kg のいずれの投与量でも糖尿病を誘発することができなかった。次に、低用量連続投与および高用量単回投与の効果を検討した。いずれの投与量でも血糖値は十分に上昇し、4 週間後の血糖は 500 mg/dl を超えていた。40 mg/kg の 5 日間連続投与では、血糖値の上昇は比較的緩やかであったのに対し、180 mg/kg では急激な上昇が見られ、投与 1 週間後には糖尿病域に達した。高血糖に暴露される時間が長い方がより臨床に則していると考え、投与量は 180 mg/kg の単回投与を採用した。

### 2.4.2 皮膚潰瘍モデルの作製

マウスの背部に皮膚潰瘍を作成したモデルを試作し、CM ゲルを外用して、モデルの有用性について評価した。直径 6 mm の皮膚全層欠損創に対し、正常酸素 CM および SM ゲルを外用し、創閉鎖に対する効果を比較したが、両群とも術後 12 日目で上皮化が完了し、経過中も潰瘍面積に明らかな差を生じなかった。正常酸素 CM と SM では効果に差がない可能性が挙げられたが、その他の原因も考えられた。一つは、直径 6 mm の皮膚潰瘍では、治療効果の差を観察するには小さすぎた可能性がある。このため、次の実験では皮膚潰瘍の大きさを直径 8 mm に拡大して、外用ゲルの効果を評価した。もう一つは、今回の実験では、異なる投与量で糖尿病を誘発したマウスを使用したため、高血糖に暴露された期間も異なっており、皮膚潰瘍を作成した時点で組織障害の程度に大きな差が生じて結果に影響した可能性がある。以降はストレプトゾトシンを 180 mg/kg 単回投与で統一して糖尿病を誘発することで、この影響は最小限に抑えられると思われた。

### 2.4.3 羊膜由来間葉系幹細胞および CM を用いた外用ゲルが創傷治癒に及ぼす影響

2.4.2 に述べたように、実験 1 の結果を踏まえ、実験 2 と 3 では皮膚潰瘍の大きさを 6 mm から 8 mm に変更し、ストレプトゾトシンを 180 mg/kg 単回投与で統一した。CM を外用した実験 2 では、術後 12 日であった完全上皮化までの期間は最長 15 日まで延長され、特に術後 8-12 日目で各群の創傷閉鎖割合に差が見られた。細胞含有ゲルを用

いた実験3では、完全上皮化までの期間は全群で術後12日目であり、直径6mmの潰瘍と同じであったが、特に術後4-9日目で創傷閉鎖割合に差が生じた。SMゲルあるいはコントロールゲルを外用したマウスでは、非糖尿病に比べ糖尿病マウスの創閉鎖が遅れる傾向にあり、過去の報告(Kuo et al., 2011; Kwon et al., 2008)と同様であった。このため、皮膚潰瘍の大きさを直径8mm、ストレプトゾトシンの投与量を180 mg/kgとしたモデルは糖尿病性皮膚潰瘍のモデルとして適当であると判断した。

実験2では、CM外用により創傷治癒が促進され、その効果は低酸素CM外用で特に高い傾向が見られた。同様に、創閉鎖割合に差が見られた術後8日目の組織では、CMゲルが血管新生を促進しており、特に低酸素CMでその効果が高い印象であった。これらの結果は、本研究の仮説を肯定する傾向であったが、VEGF-Aとb-FGFのmRNA発現量は一致しない点も多く、さらなる検討が望まれた。予備実験として、いずれの群もn=2のみで比較したため、第三章にて、サンプル数を増やしてCMゲルの影響を検証することとした。

実験3では、細胞含有ゲルの外用により術後9日目までは創閉鎖が促進されたが、上皮化が完了するまでの期間には差がなかった。血管新生については、糖尿病マウスのみで細胞含有ゲルにより血管密度の増加を認めたが、非糖尿病マウスでは効果が認められなかった。これらの結果より、細胞含有ゲルは創傷治癒を促進するが、その効果は実験2のCMゲルに比べて低い可能性が示唆された。一方、羊膜由来間葉系幹細胞を播種した人工真皮を、非糖尿病マウスの皮膚潰瘍に外用し、創閉鎖および血管新生が有意に促進されることを示した報告もある(Tuca et al., 2016)。細胞自体を外用するにあたっては、足場となる素材によって効果が異なる可能性が考えられた。また、同研究では、術後8日目にはヒト由来細胞はほぼ消失しており、新生血管の内皮細胞はマウス由来であった(Tuca et al., 2016)。本実験においても、マウスの潰瘍組織からはヒトGAPDH遺伝子は検出されず、間葉系幹細胞が生着しないことが示された。したがって、羊膜由来間葉系幹細胞の外用による創傷治癒および血管新生促進効果は、主にパラクライン作用によるものと考えられた。また、糖尿病マウスにおいて、細胞含有ゲルがVEGF-AのmRNA発現量を亢進したが、これはヒト羊膜由来間葉系幹細胞から分泌されたVEGF-Aが、マウスの血管内皮細胞の増殖のみならず、自己のVEGF-A産生を促進したと考えられた。

CMゲルの作製は非常に簡易であり、特別な技術などを必要としない。外用の1-2時間前までに凍結保存しておいたCMを解凍し、カルボキシメチルセルロース粉末を混合するだけである。消化器内科学教室では、CMの生理活性は1週間程度保たれるとの予備データがあり、ゲル作製後は数日間冷蔵庫保存して使用することも可能と考えられる。通常の軟膏と同様に創部に塗布し、絆創膏などで被覆するだけであるので、

自己処置にも適している。外来通院治療にも使用可能となれば、多くの糖尿病足病変の患者に有益となることが予想される。

一方、細胞含有ゲルの作製は、CMゲルに比較するとやや複雑である。外用のタイミングに合わせて予めゲルを作製する必要があるため、本実験では2日毎に、凍結保存しておいた細胞を解凍してゲルを作製した。外用の直前までインキュベーターで培養するため、臨床で使用する場合は、細胞培養が可能な施設に限られることとなる。また、外用の際には、弾力があり、柔らかいゼリー状のゲルを鑷子などを用いて創部に乗せる必要があるため、患者あるいは家族などが自宅処置に用いるには不適當と思われる。この方法では臨床応用はやや困難であると考え、第三章ではCMゲルのみについて検討することとした。

## 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

#### 3.1 緒言

##### 3.1.1 背景

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 (Kuo et al., 2011; Kong et al., 2013; Kato et al., 2014; Wang et al., 2016; Irons et al., 2018)。ただし、羊膜由来の間葉系幹細胞を使用した報告は 1 件のみである (Kim et al., 2012)。同研究では、免疫不全糖尿病マウスの創部に、ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の局所注射を行い、パラクライン機序により創傷閉鎖が促進されることを示した。これらの結果は、非糖尿病動物における羊膜由来間葉系幹細胞研究の所見および関連する *in vitro* データと一致していた (Liu X. et al., 2013; Tuca et al., 2016; Ertl et al., 2018)。しかし、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。筆者の渉猟しうる限りでは、本研究は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、その効果を検証するという初めての試みである。

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。Jun らは、ヒト羊水由来間葉系幹細胞の CM を皮膚欠損創に外用し、正常酸素 CM に比べ、低酸素 CM が創閉鎖を大幅に改善することを示した (Jun et al., 2014)。同様に、骨髄 (Chen et al., 2014) と脂肪組織 (Lee et al., 2009) 由来の低酸素 CM は、遊走促進因子、細胞分裂促進因子、および血管新生促進因子をより多く分泌することにより、創傷治癒を促進した。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 VEGF-A および b-FGF 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。

##### 3.1.2 目的

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。

## 3.2 方法

### 3.2.1 外用ゲルの作製

1.2.1 に述べた方法で NCM および HCM を作製し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。使用の 48 時間以内に  $4^{\circ}\text{C}$  で解凍し、カルボキシメチルセルロースを 7% の濃度で混合してゲルを作製した。同様に  $\alpha$ -MEM を用いて SM ゲルを作製した。ゲルは使用直前まで  $4^{\circ}\text{C}$  で保管した。

### 3.2.2 糖尿病の誘発

2.2.3 に述べた方法で、マウス 17 匹にストレプトゾトシン  $180\text{ mg/kg}$  を単回、腹腔内投与した。投与後 1 週間毎に尾静脈より採血して血糖を測定し、4 週間経過時に血糖値が  $300\text{ mg/dl}$  以上であった 15 匹を糖尿病マウスとして使用した。残り 2 匹は十分な血糖上昇を得られず、除外した。非糖尿病群は、マウス 15 匹に PBS を同等量腹腔内投与後、1 週間毎に尾静脈を採取し、血糖値上昇がないことを確認した。

### 3.2.3 皮膚潰瘍の作成と術後処置

2.2.4 に述べた方法で、各マウスの背部に直径  $8\text{ mm}$  の皮膚全層欠損創を 2 ヶ所作成した。非糖尿病群、糖尿病群共に 3 群に分け、それぞれ SM、NCM、HCM ゲルを各創部に  $0.05\text{ ml}$  外用した。創部は Tegaderm™ で被覆した。術後 1、3、5、7、9 日目に処置を行い、創部を撮影した。術後 9 日目に組織を採取した。

### 3.2.4 組織学的検討

2.2.5 と同様に組織を固定し、H&E 染色および免疫染色を行った。免疫染色には次の 7 種の抗体を用いた： goat anti-CD31 ( $1:600$ ; Cat#sc-1506; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit anti-Ki-67 ( $1:200$ ; Cat#RM-9106-S1; Thermo Fisher Scientific)、rabbit anti-myeloperoxidase (MPO) ( $1:200$ ; Cat# RB-373-A1; Thermo Fisher Scientific)、rat anti-F4/80 ( $1:200$ ; Cat#CL8940AP; Cedarlane, Burlington, Canada)、rat anti-CD3 ( $1:1500$ ; Cat#GTX62682; GeneTex, Irvine, CA, USA)、rabbit anti-FoxP3 ( $1:100$ ; Cat#12653; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)。ImageJ を用いて画像解析を行なった。CD31、MPO、F4/80、CD3、FoxP3 については、ランダムに選択された 10 視野 (400 倍) の平均陽性面積を測定した。Ki-67 については、潰瘍辺縁を中心にした 200 倍の視野で、基底層の陽性細胞数を数えて比較した。

### 3.2.5 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

2.2.6 に述べた方法で total RNA の抽出、cDNA の作製、qPCR を行なった。使用したプライマーおよびターゲット遺伝子に関連する主な炎症細胞を表 3 に示す。

表 3 : プライマー配列 (マウス) およびターゲット遺伝子に関連する主な炎症細胞

Gene	Primer sequence	Main cells whose activity is reflected by the targeted gene
GAPDH	F: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA R: TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	(house keeping gene)
IL-1 $\beta$	F: CCTCACAAGCAGAGCACAAG R: AAACAGTCCAGCCCATACTTTAG	macrophages, neutrophils, T cells
IL-6	F: TCTGGGAAATCGTGGAATGAG R: TCTCTGAAGGACTCTGGCTTTGTC	macrophages, T cells
TNF- $\alpha$	F: ACGTGGAAGTGGCAGAAGAG R: GAGGCCATTTGGGAAGTTCT	macrophages
MCP-1	F: CTCAAGAGAGAGGTCTGTGCTG R: GTAGTGGATGCATTAGCTTCAG	macrophages
CXCL-1	F: GCCTATCGCCAATGAGCTG R: GAACCAAGGGAGCTTCAGG	neutrophils
CXCL-2	F: AGTGAAGTGCCTGTCAATG R: GCCCTTGAGAGTGGCTATGA	macrophages, neutrophils

### 3.2.6 統計学的検討

データは mean  $\pm$  standard error で示した。一元配置分散分析 (one-way analysis of variance) および Tukey's *post-hoc* test による多重比較検定を行なった。  $p < 0.05$  を統計学的有意水準とした。統計解析には、統計ソフトウェア Prism (ver. 6.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いた。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 CM が創傷閉鎖に及ぼす影響

まず、CM が創傷閉鎖に及ぼす影響について検討した。非糖尿病マウスでは、SM に比べ NCM、HCM の両方で創傷閉鎖が促進されたが、有意差は見られなかった (図 20)。糖尿病マウスでは HCM で創傷閉鎖が有意に促進された。NCM でも創傷閉鎖割合の上昇を認めたが、有意差は認められなかった。non-DM/SM に比べ、DM/SM で創傷閉鎖の遅延を認めたが、有意差は認められなかった。

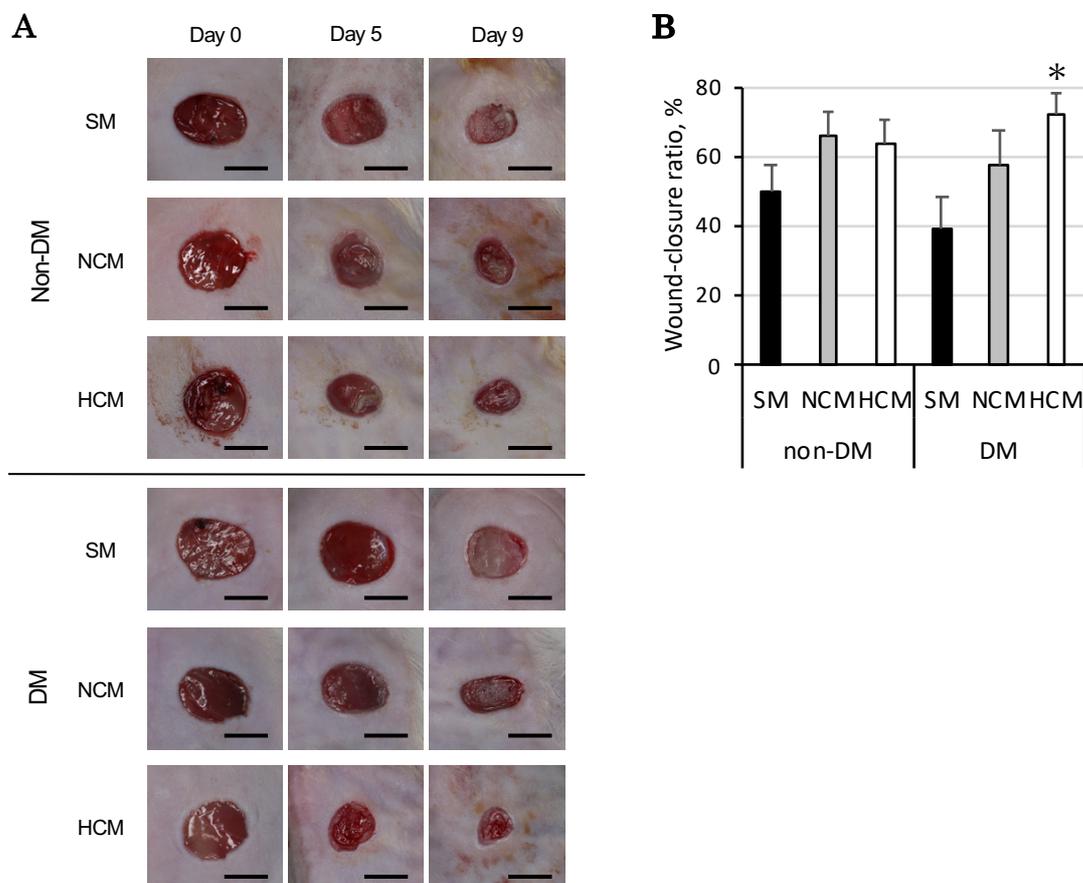


図 20. 羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清が創傷閉鎖に及ぼす影響. (A)肉眼的所見. (B)術後 9 日目の創傷閉鎖割合の比較. データは mean  $\pm$  standard error で示した. n = 10, \* $p$  < 0.05 vs. DM/SM group. Scale bars; 5 mm.

DM, diabetes mellitus; SM, standard medium; NCM, normoxic conditioned medium; HCM, hypoxic conditioned medium

### 3.3.2 CM が血管新生に及ぼす影響

次に、潰瘍組織の血管内皮細胞を標識するために CD31 染色を行い、CM が血管新生に及ぼす影響につき検討した。non-DM/SM に比べ、non-DM/NCM、DM/NCM、DM/HCM で CD31 陽性面積の有意な増加を認めた (図 21)。non-DM/HCM でも増加が見られたが、有意差は認められなかった。DM/SM では減少が見られたが、こちらも有意差は認められなかった。また DM/SM に比べると、non-DM/NCM、non-DM/HCM、DM/NCM、DM/HCM で有意な増加を認めた。NCM、HCM とともに血管新生を促進することが示された。

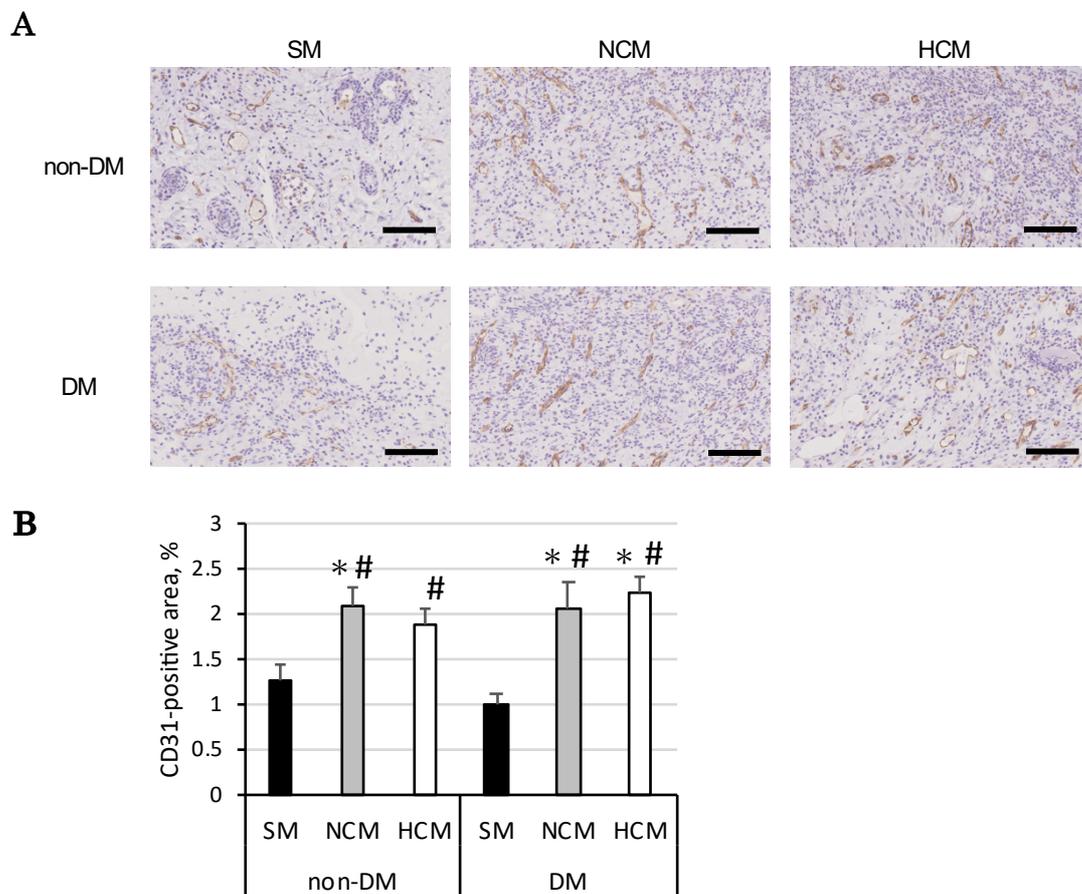


図 21. 羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清が血管新生に及ぼす影響. (A)鏡頭像. (B) CD31 陽性面積の比較. データは mean  $\pm$  standard error で示した. n = 10, \* $p$  < 0.05 vs. non-DM/SM, # $p$  < 0.05 vs. DM/SM. Scale bars; 100  $\mu$ m. DM, diabetes mellitus; SM, standard medium; NCM, normoxic conditioned medium; HCM, hypoxic conditioned medium

### 3.3.3 CM が上皮化に及ぼす影響

さらに、CM が上皮化に及ぼす影響につき検討するため、免疫染色で細胞増殖マーカーである Ki-67 を標識し、表皮基底層の染色された細胞数をカウントした。non-DM/SM と比べ、DM/SM では陽性細胞数の減少を認め、糖尿病マウスでは上皮化が遅延していることが示唆されたが、2 群間に有意差は見られなかった (図 22)。非糖尿病マウスでは SM に比べ NCM、HCM で陽性細胞数の増加が見られたが、有意差は認められなかった。糖尿病マウスでは SM < NCM < HCM の順で陽性細胞数の増加を認め、遅延した上皮化が NCM、HCM では改善することが考えられた。6 群間の多重比較検定では、non-DM/NCM と DM/SM の間のみでしか有意差は見られなかったが、糖尿病マウスの 3 群のみを用いた多重比較検定では、DM/SM と DM/HCM に有意差が認められた。従って、糖尿病マウスにおいて HCM が上皮化を亢進することが示された。

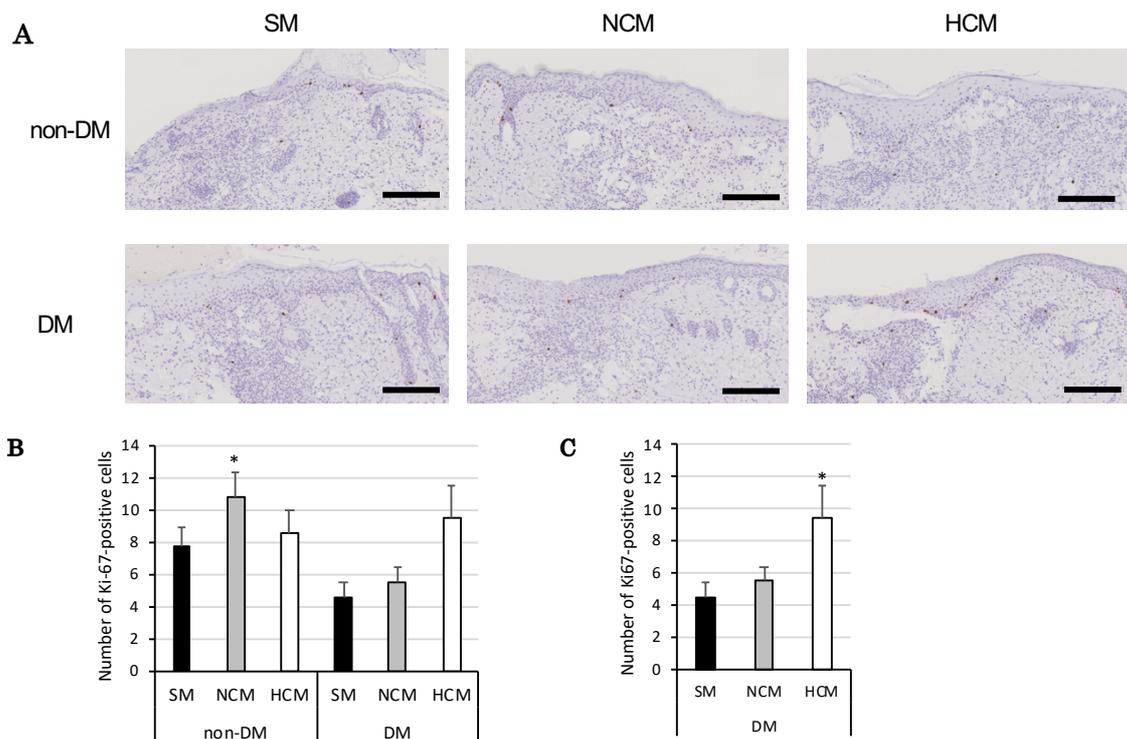


図 22. 羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清が上皮化に及ぼす影響. (A)鏡頭像. (B) Ki-67 陽性基底細胞数の比較. (C)糖尿病マウスにおける Ki-67 陽性基底細胞数の比較. データは mean ± standard error で示した. n = 10, \* $p < 0.05$  vs. DM/SM. Scale bars; 200  $\mu$ m.

DM, diabetes mellitus; SM, standard medium; NCM, normoxic conditioned medium; HCM, hypoxic conditioned medium

### 3.3.4 CM が炎症に及ぼす影響

最後に、CM が炎症に及ぼす影響につき、免疫組織染色および qPCR で検討した (図 23)。

まずはマクロファージを標識するため、F4/80 免疫染色を行った。non-DM/SM より DM/SM で F4/80 陽性面積が大きく、糖尿病マウスでマクロファージの浸潤が多いことが示唆されたが、有意差は認められなかった。糖尿病マウスにおいては、SM に比べ HCM で F4/80 陽性面積が有意に減少しており、マクロファージの浸潤が抑制されていた。NCM でも陽性面積の減少が見られたが、有意差は認められなかった。非糖尿病マウスでは、NCM で減少が見られたが、HCM は SM と同程度であり、いずれの群間にも有意差は見られなかった。

次に MPO 免疫染色を行い、好中球を標識した。Non-DM/SM より DM/SM で陽性面積が大きく、糖尿病マウスで好中球の浸潤が多いことが示唆された。糖尿病マウスでは、SM に比べ HCM では MPO 陽性面積の減少を認め、NCM では軽度増加を認めたが、いずれも有意差は見られなかった。非糖尿病マウスについては、NCM、HCM の両者とも MPO 陽性面積が増加していたが、こちらも有意差は認められなかった。

そして CD3 免疫染色を行い、T 細胞を標識した。CD3 陽性面積は、non-DM/SM に比べて DM/SM で減少を認め、T 細胞の浸潤が少ないことが示唆された。糖尿病マウスでは、NCM、HCM 両者で同等の増加が見られた。反対に非糖尿病マウスでは、SM に比べて HCM で軽度の減少を認め、NCM ではさらに減少していた。いずれの群間でも有意差は認められなかった。

さらに FoxP3 免疫染色で制御性 T 細胞を標識した。Non-DM/SM に比べて DM/SM で陽性面積の軽度減少を認め、制御性 T 細胞の浸潤が少ないことが示唆された。糖尿病マウスでは、CD3 と同様に NCM、HCM 両者で SM より陽性面積が増加していた。非糖尿病マウスでは SM に比べて HCM で面積増加が見られたが、NCM では同程度であった。いずれの群間でも有意差は認められなかった。

qPCR では、炎症性サイトカインの mRNA 発現について検討した。糖尿病マウスの IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-1 および CXCL-2 の発現において類似した傾向が見られ、SM > NCM > HCM の順で発現が抑制されていた。非糖尿病マウスでは CXCL-1 および CXCL-2 の発現において SM < NCM < HCM の順で発現が亢進しており、糖尿病マウスと逆の結果が得られた。IL-1 $\beta$  では SM に比べ NCM で発現量の低下、IL-6 では SM と NCM は同程度の発現量が見られたが、HCM ではどちらも亢進した。TNF- $\alpha$  の発現については、全ての群で明らかな差は見られなかった。MCP-1 は、非糖尿病、糖尿病ともに SM に比べて NCM では低下、HCM では上昇が見られた。qPCR についてはいずれも有意差が認められなかった。

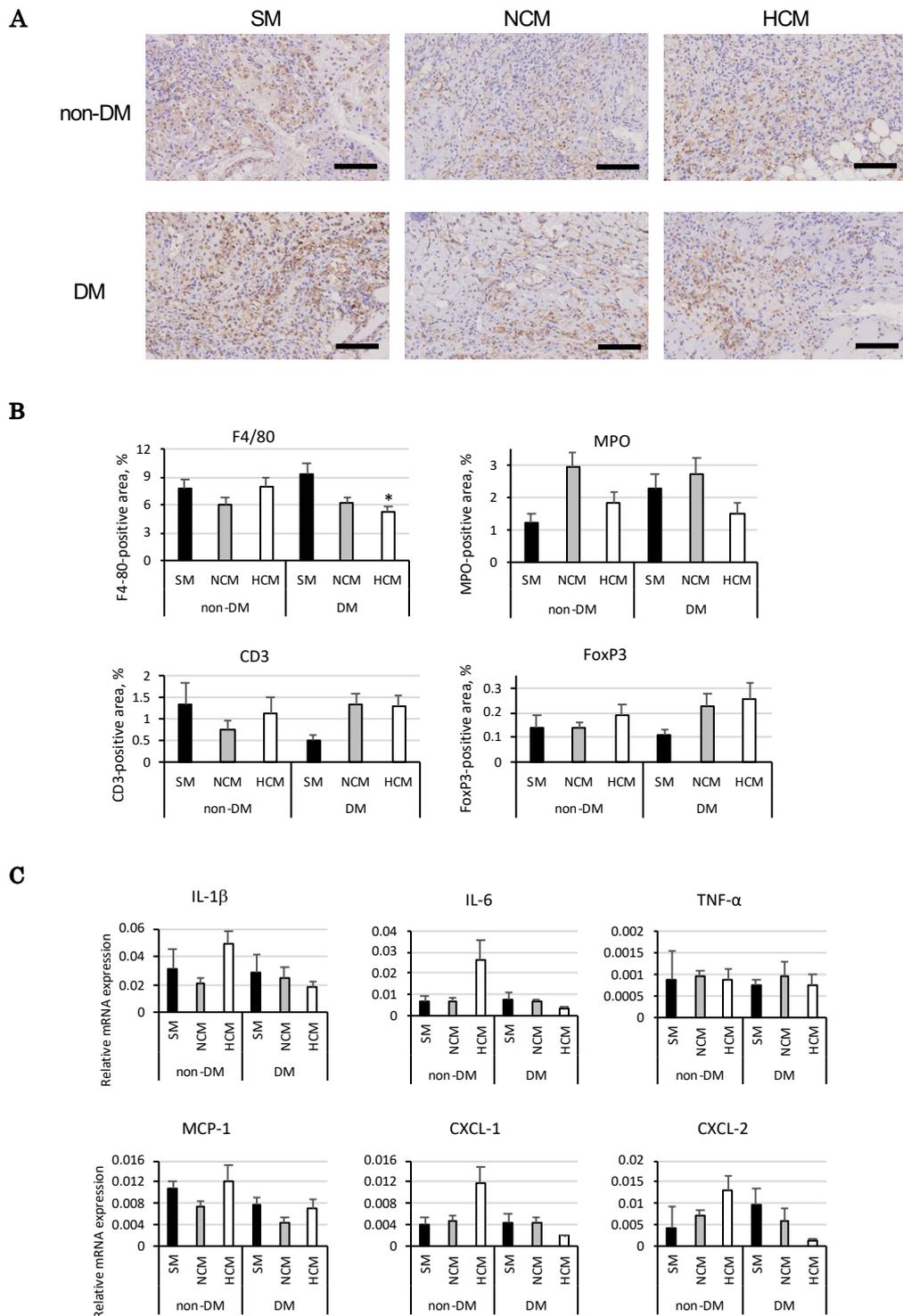


図 23. 羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清が炎症に及ぼす影響. (A)F4/80 免疫染色の鏡頭像. (B) F4/80, MPO, CD3 および FoxP3 陽性面積の比較. (C) mRNA 発現量の比較. データは mean ± standard error で示した. n = 10, \* $p < 0.05$  vs. DM/SM. Scale bars; 100  $\mu$ m.

DM, diabetes mellitus; SM, standard medium; NCM, normoxic conditioned medium; HCM, hypoxic conditioned medium; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; IL-6, interleukin-6; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; CXCL-1, chemokine ligand-1; CXCL-2, chemokine ligand-2

## 3.4 考察

### 3.4.1 羊膜由来間葉系幹細胞の CM が糖尿病マウスの創閉鎖に及ぼす影響

第三章では、糖尿病マウスの創傷治癒に対する低酸素培養羊膜由来間葉系幹細胞の CM 外用の影響を検討した。SM ゲルを外用したマウスでは、非糖尿病群に比べ、糖尿病群で創閉鎖が遅れていた。2 群間に統計学的有意差は見られなかったが、過去の報告 (Kuo et al., 2011; Kwon et al., 2008) と同様に、糖尿病マウスでは創傷治癒遅延をきたす傾向が見られた。低酸素 CM は、糖尿病マウスにおける創閉鎖の遅延を有意に改善した。正常酸素 CM においても創閉鎖の促進が見られたが、その効果は低酸素 CM に比べて低く、SM との間に有意差は見られなかった。低酸素 CM による創閉鎖の促進効果は、潰瘍組織における血管新生の亢進、上皮化の促進、および炎症の抑制によるものとする。以下にそれぞれについて述べる。

### 3.4.2 羊膜由来間葉系幹細胞の CM が血管新生に及ぼす影響

糖尿病性潰瘍の創傷治癒の主な特徴として、血管新生の障害が挙げられるが (Peng et al., 2018; Patel et al., 2019)、羊膜由来間葉系幹細胞は、パラクライン作用により血管新生促進効果を発揮し、創閉鎖を加速すると考えられている (Kim et al., 2012; Tuca et al., 2016; Ertl et al., 2018)。羊膜由来間葉系幹細胞は、VEGF-A、b-FGF、epidermal growth factor (EGF)、IGF-1、IL-8 などの血管新生因子を大量に分泌し (Kim et al., 2012; Liu X. et al., 2013; Yamahara et al., 2014)、CM は、内皮細胞の増殖と遊走、および内皮細胞による管腔形成を大幅に促進する (Kim et al., 2012)。さらに、細胞の投与により、非糖尿病または糖尿病の動物の潰瘍組織内の血管数が増加することも報告されている (Kim et al., 2012; Yamahara et al., 2014; Tuca et al., 2016; Ertl et al., 2018)。本実験においても、羊膜由来間葉系幹細胞の CM が潰瘍組織内の血管新生を増加させた。血管新生促進因子 (VEGF-A や b-FGF など) の上昇に伴い、内皮機能障害が回復し、血管新生が促進することで、治癒に適した創床形成が起こる可能性が考えられる。しかし、本研究では、正常酸素 CM と低酸素 CM の両者によって血管新生が促進されたのに対し、低酸素 CM のみで創閉鎖が大幅に改善された。創部の組織再生には、血管新生以外の機序の関与も示唆された。

### 3.4.3 羊膜由来間葉系幹細胞の CM が上皮化に及ぼす影響

糖尿病性潰瘍では上皮化の障害も見られるが (Peng et al., 2018; Patel et al., 2019)、羊膜由来間葉系幹細胞は上皮形成を促進する。Kim らは、糖尿病マウスの皮膚潰瘍に移植した羊膜由来間葉系幹細胞が、高度に生着した後、ケラチノサイトに特異的なタンパク質を産生することを示した (Kim et al., 2012)。移植細胞による直接的な作用に

加え、パラクリン因子も上皮化に対して重要な役割を果たす。EGF および IGF-1 などの分泌は、線維芽細胞およびケラチノサイトの増殖および遊走を刺激する (Kim et al., 2012; Liu X. et al., 2013)。本研究では、低酸素 CM が基底層の Ki-67 陽性細胞の数を増加させ、上皮細胞の増殖を促進することを明らかにした。b-FGF はケラチノサイトの増殖を刺激するため (Tsuboi and Rifkin, 1990; Wang et al., 2017)、低酸素 CM に含まれる高濃度の b-FGF が上皮化の促進に寄与したと考えられる。正常酸素 CM の b-FGF 濃度は、低酸素 CM に比べて低く、このため正常酸素 CM が Ki-67 陽性細胞を増加させなかった可能性がある。

#### 3.4.4 羊膜由来間葉系幹細胞の CM が炎症に及ぼす影響

遷延する炎症も、糖尿病性潰瘍の主要な特徴であり (Peng et al., 2018; Patel et al., 2019)、間葉系幹細胞の創傷治癒効果は、抗炎症作用にも基づいている。骨髄由来間葉系幹細胞の局所注射は、糖尿病ラットの皮膚潰瘍における白血球浸潤を著しく減少させた (Kuo et al., 2011)。羊膜由来間葉系幹細胞の抗炎症効果も報告されている。羊膜由来間葉系幹細胞は、*in vitro* で末梢血単核球の増殖を抑制すると同時に抗炎症性サイトカインの分泌を刺激し、動物実験ではマウスの急性移植片対宿主病を改善した (Kang et al., 2012; Yamahara et al., 2014)。北海道大学消化器内科学教室では、ラットの大腸炎 (Onishi et al., 2015) およびブタの内視鏡的粘膜下層剥離術後の食道壁と直腸壁において、羊膜由来間葉系幹細胞および CM が好中球やマクロファージの浸潤を抑制したことを報告した (Mizushima et al., 2017; Tsuda et al., 2018)。しかし、糖尿病性潰瘍に対する羊膜由来間葉系幹細胞の抗炎症効果は不明である。これら報告と一致して、本研究は、羊膜由来間葉系幹細胞の CM が、糖尿病マウスの潰瘍組織におけるマクロファージ浸潤を抑制することを示した。正常酸素 CM は好中球浸潤に影響しなかったが、低酸素 CM では減少させる傾向が見られた。さらに、低酸素 CM は IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-1、および CXCL-2 の発現量を抑制した。これにより、マクロファージおよび好中球の活性が抑制されたことが示唆され (Uchida et al., 2010; Sindrilaru and Sharffetter-Kochanek, 2013)、羊膜由来間葉系幹細胞の CM が糖尿病性潰瘍に対して抗炎症効果を及ぼすことが確認された。しかしながら、CM がマクロファージと好中球の浸潤を抑制したのと反対に、T 細胞の浸潤は増強した。この結果により、CM は急性炎症を抑制し、創傷治癒の次段階への移行を促進することで創傷治癒を改善する可能性が考えられた。今回は、第二章の結果を元に、術後 9 日目の組織のみを比較した。糖尿病マウスの創傷治癒過程における炎症の経過に関して、継時的な検索が望まれる。

### 3.4.5 非糖尿病マウスにおける羊膜由来間葉系幹細胞 CM の創傷治癒効果

本研究では、非糖尿病マウスについても、羊膜由来間葉系幹細胞の創傷治癒効果の検討を行った。CM 外用により、創閉鎖および血管新生の促進が認められ、羊膜由来間葉系幹細胞を創部に移植した研究と同様の結果が得られた (Tuca et al., 2016)。しかし、糖尿病マウスと異なり、酸素濃度による効果の差は見られなかった。また、表皮基底細胞の増殖、炎症細胞の浸潤、炎症系サイトカインの mRNA 発現については、一定の傾向が見られず、非糖尿病マウスにおいては、血管新生が、CM による創傷治癒促進の主な機序であることが示唆された。非糖尿病マウスでは、正常な創傷治癒が保たれているため、創傷治癒過程が障害された糖尿病マウスとは、間葉系幹細胞の影響が異なる可能性も考えられる。しかし、他組織由来の間葉系幹細胞では、非糖尿病動物モデルにおいて上皮化の促進および炎症の抑制による創閉鎖の促進が報告されている。Wu et al. (2007)は、骨髄由来間葉系幹細胞をマウスの皮膚潰瘍に移植し、上皮の伸展が加速することを示した。また、臍帯由来間葉系幹細胞はラットの皮膚潰瘍において、炎症細胞数および IL-1 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの発現が減少した (Liu et al., 2014)。由来する組織によって、間葉系幹細胞の創傷治癒効果は異なる可能性が考えられるが、羊膜由来間葉系幹細胞を用いた創傷治癒の研究はまだ少数であり、さらなる検証が望まれる。

## 4 総括および結論

### 4.1 本研究から得られた新知見

#### 第一章

- 低酸素培養は、羊膜由来間葉系幹細胞の VEGF-A の mRNA 発現および VEGF-A、b-FGF の分泌を促進することが推測された。
- コラーゲンゲルで羊膜由来間葉系幹細胞の 3 次元培養を行い、細胞含有ゲルを作製した。
- 羊膜由来間葉系幹細胞の CM にカルボキシメチルセルロースを 5-7%の濃度で混合し、CM ゲルを作製した。

#### 第二章

- ICR マウスにストレプトゾトシンを 40 mg/kg の 5 日間連続投与あるいは 150-180 mg/kg 単回投与を行うことで、糖尿病を誘発することができた。
- 糖尿病マウスにおける創傷治癒モデルを作成した。
- 羊膜由来間葉系幹細胞あるいはその CM を用いて作製したゲルは、マウスの創傷治癒を促進する傾向があった。

#### 第三章

- 低酸素培養して得られた羊膜由来間葉系幹細胞の CM は、糖尿病マウスの創閉鎖を促進した。
- 低酸素 CM は、創部の血管新生および上皮化を促進した。
- 低酸素 CM は、マクロファージおよび好中球浸潤、ならびに炎症性サイトカインの mRNA 発現量を抑制した。

### 4.2 新知見の意義

第一章において、羊膜由来間葉系幹細胞を低酸素培養して得られた CM は、正常酸素 CM に比べ、創傷治癒をより促進する可能性が示唆された。外用ゲルを作製することにより、糖尿病マウスの皮膚潰瘍に対し、羊膜由来間葉系幹細胞およびその CM の治療効果を検討する一方法を確立した。

第二章において、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ことで、第三章にて外用ゲルの治療効果を検証することが可能となった。

これまで創傷治癒に関して、骨髄や脂肪組織など、他組織由来の間葉系幹細胞を用

いた研究は多くなされてきた。本研究では、第三章において、羊膜由来間葉系幹細胞が糖尿病マウスの皮膚潰瘍に対して高い治療効果を持つことを示した。成人組織由来のものとは異なり、羊膜由来間葉系幹細胞は、ドナーの侵襲なく大量に採取可能であり、安全に他家移植もできるため、臨床応用に望ましい細胞資源と思われる。また、細胞そのものではなく、細胞が分泌した生理活性物質を含有する CM ゲルを外用するという方法は、作製過程も含め非常に簡便であり、臨床では外来治療などでも起用しやすいと考える。

#### 4.3 今後の展開

まずは、羊膜由来間葉系幹細胞が皮膚潰瘍の炎症に及ぼす影響について、さらなる検討が望まれる。今回は炎症細胞の浸潤について評価したが、マクロファージに関しては、浸潤に加え、極性化が炎症の抑制に重要な役割を果たすことが近年注目されている。活性化されたマクロファージは、炎症性の M1 タイプまたは抗炎症性 M2 タイプに極性化する (Lucas et al., 2010; Mantovani et al., 2013)。骨髄由来間葉系幹細胞を非糖尿病マウスに移植すると、潰瘍組織の M2 マクロファージの比率が高まる (He et al., 2019)。羊膜由来間葉系幹細胞が糖尿病性潰瘍のマクロファージ極性化に影響を与えるか否か、さらなる検討を要する。

また、羊膜由来間葉系幹細胞を用いた、他の難治性皮膚潰瘍の治療法の開発も期待される。難治性皮膚潰瘍には、糖尿病性足潰瘍をはじめとし、虚血性潰瘍、静脈鬱滞性潰瘍、褥瘡、熱傷、放射線潰瘍、膠原病・血管炎に伴う皮膚潰瘍など様々な慢性創傷が含まれる (Eming et al., 2014; 神林ら, 2016)。それぞれ原因は異なるが、背景には血管障害、慢性炎症、増殖因子の産生不全など、糖尿病足潰瘍と共通する病態も認められる。糖尿病モデルにおける羊膜由来間葉系幹細胞の創傷治癒効果およびその機序を解明することで、その他の難治性皮膚潰瘍に対する新しい治療法の確立にも繋がると考える。また、これらの難治性皮膚潰瘍は、遷延する感染を伴うことも多く、さらに治療を困難にする (Larouche et al., 2018)。近年では間葉系幹細胞が感染を抑制することが報告されており (Harman et al., 2017)、羊膜由来間葉系幹細胞についても、創部感染に対する影響の検証が望まれる。

#### 4.4 今後の課題

本研究では、羊膜由来間葉系幹細胞が糖尿病マウスにおける皮膚潰瘍に対し治癒促進作用を発揮することを明らかにし、糖尿病足潰瘍の新たな治療法となる可能性を示した。投与の手法として外用法を採用することで、外来治療にも適応を広げることが可能になると考えられる。しかし、臨床応用に至るまでには課題が残る。

まずは、羊膜由来間葉系幹細胞の CM に含まれる生理活性物質について、さらなる

解析が必要である。詳細な成分解析と、有効成分の解明、またそれらの作用機序を明らかにすることで、安全性の検証や副作用の予防などにもつながると思われる。

また、羊膜由来間葉系幹細胞の創傷治癒効果について、骨髄や脂肪など、他組織由来の間葉系幹細胞との比較も行うべきである。羊膜には、採取の安全性という大きな利点があるが、最低でも他組織と同等の効果が認められることが、臨床応用する上で重要となると思われる。

そして、羊膜由来間葉系幹細胞を外用するための媒体について、さらなる検討が必要である。外用剤は主成分を混合する基剤によっても、その効果に差が生じる。今回CMゲルに用いたカルボキシメチルセルロースは、低コストであり、すでに安全性が確立され、キシロカインゼリーの基剤などとして臨床でも用いられている。消化器内科学教室では、カルボキシメチルセルロースを用いたCMゲルの消化器疾患に対する有効性を認めている (Mizushima et al., 2017; Tsuda et al., 2018)。本研究でもその有効性を認めたが、皮膚潰瘍に対する外用剤として、さらに適した基剤の有無について検索を要する。

## 謝辞

本研究は、JSPS 科研費 17K09342 の助成を受けたものである。

本研究の全てに渡ってご指導、ご協力、ご援助をいただいた北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室・山本有平教授、舟山恵美准教授、村尾尚規先生、佐藤千草先生、同教室員ならびに秘書の皆様、北海道大学 大学院歯学研究院 口腔病態学分野 口腔顎顔面外科学教室・林利彦准教授、および北海道大学 大学院医学研究院 内科学分野 消化器内科学教室・大西俊介准教授、帝王切開による羊膜採取にご協力いただいた北海道大学病院 産科・千葉健太郎先生、統計解析において御助言をいただいた北海道大学 大学院医学研究院 社会医学分野 医学統計学教室・高木諒先生、動物実験においてご指導、ご協力いただいた北海道大学 大学院医学研究院 附属動物実験施設・土佐紀子先生ならびに技術職員の皆様に深く感謝申し上げます。

(順不同)

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

Alviano, F., Fossati, V., Marchionni, C., Arpinati, M., Bonsi, L., Franchina, M., Lanzoni, G., Cantoni, S., Cavallini, C., and Bianchi, F. (2007). Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells *in vitro*. *BMC Dev. Biol.* 7, 11.

American Diabetes Association (1999). Consensus development conference on diabetic foot wound care: 7-8 April 1999, Boston, Massachusetts. American Diabetes Association. *Diabetes care* 22, 1354-1360.

Armstrong, D.G., Boulton, A.J.M., and Bus, S.A. (2017). Diabetic foot ulcers and their recurrence. *N. Engl. J. Med.* 376, 2367-2375.

Arno, A.I., Amini-Nik, S., Blit, P.H., Al-Shehab, M., Belo, C., Herer, E., Tien, C.H., and Jeschke, M.G. (2014). Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 28.

Assi, R., Foster, T.R., He, H., Stamati, K., Bai, H., Huang, Y., Hyder, F., Rothman, D., Shu, C., Homer-Vanniasinkam, S., et al., (2016). Delivery of mesenchymal stem cells in biomimetic engineered scaffolds promotes healing of diabetic ulcers. *Regen. Med.* 11, 245-60.

Calvani, M., Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Shoemaker, R.H., and Melillo, G. (2006). Hypoxic induction of an HIF-1 $\alpha$ -dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells. *Blood* 107, 2705-2712.

Chen, D., and Wang, M.W. (2005). Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 7, 307-17.

Chen, L., Tredget, E.E., Wu, P.Y., and Wu, Y. (2008). Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3, e1886.

Chen, L., Qiu, J.H., Zhang, L.L., and Luo, X.D. (2012). Adrenomedullin promotes human endothelial cell proliferation via HIF-1 $\alpha$ . *Mol. Cell Biochem.* 365, 263-73.

Chen, L., Xu, Y., Zhao, J., Zhang, Z., Yang, R., Xie, J., Liu, X., and Qi, S. (2014). Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One* 9, e96161.

Cheta, D. (1998). Animal models of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 11, 11–9.

Deeds, M.C., Anderson, J.M., Armstrong, A.S., Gastineau, D.A., Hiddinga, H.J., Jahangir, A., Eberhardt, N.L., and Kudva, Y.C. (2011). Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim.* 45, 131-140.

Dekel, Y., Glucksam, Y., Elron-Gross, I., and Margalit, R. (2009). Insights into modeling streptozotocin-induced diabetes in ICR mice. *Lab Anim.* 38, 55–60.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.

Du, L., Yu, Y., Ma, H., Lu, X., Ma, L., Jin, Y., and Zhang, H. (2014). Hypoxia enhances protective effect of placental-derived mesenchymal stem cells on damaged intestinal epithelial cells by promoting secretion of insulin-like growth factor-1. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 1983–2002.

Eming, S.A., Martin, P., and Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signalling, and translation. *Wound Healing* 6, 265sr6.

Ertl, J., Pichlsberger, M., Tuca, A.C., Wurzer, P., Fuchs, J., Geyer, S.H., Maurer-Gesek, B., Weninger, W.J., Pfeiffer, D., Bubalo, V., *et al.* (2018). Comparative study of regenerative effects of mesenchymal stem cells derived from placental amnion, chorion and umbilical cord on dermal wounds. *Placenta* 65, 37-46.

Falanga, V., Iwamoto, S., Chartier, M., Yufit, T., Butmarc, J., Kouttab, N., Shrayar, D., and Carson, P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng.* *13*, 1299-1312.

Harman, R.M., Yang, S., He, M.K., and Van de Walle, G.R. (2017). Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds. *Stem Cell Res. Ther.* *8*, 157.

He, S., Shen, L., Wu, Y., Li, L., Chen, W., Hou, C., Yang, M., Zeng, W., and Zhu, C. (2015). Effect of brain-derived neurotrophic factor on mesenchymal stem cell-seeded electrospinning biomaterial for treating ischemic diabetic ulcers via milieu-dependent differentiation mechanism. *Tissue Eng. Part A* *21*, 928-938.

He, X., Dong, Z., Cao, Y., Wang, H., Liu, S., Liao, L., Jin, Y., Yuan, L., and Li, B. (2019). MSC-derived exosome promotes M2 polarization and enhances cutaneous wound healing. *Stem Cells Int.* *2019*, 7132708.

In 't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G.M.J.S., Claas, F.H.J., Fibbe, W.E., and Kanhai, H.H.H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* *22*, 1338–1345.

International Diabetes Federation (2019). IDF Diabetes Atlas 9th edition. Available at: <https://www.diabetesatlas.org/en/>. Accessed April 10, 2020.

Irons, R.F., Cahill, K.W., Rattigan, D.A., Marcotte, J.H., Fromer, M.W., Chang, S., Zhang, P., Behling, E.M., Behling, K.C., and Caputo, F.J. (2018). Acceleration of diabetic wound healing with adipose-derived stem cells, endothelial-differentiated stem cells, and topical conditioned medium therapy in a swine model. *J. Vasc. Surg.* *68*, 115S-125S.

Ito, M., Kondo, Y., Nakatani, A., and Naruse, A. (1999). New model of progressive non-insulin-dependent diabetes mellitus in mice induced by streptozotocin. *Biol. Pharm. Bull.* *9*, 988–989.

Jun, E., Zhang, Q., Yoon, B., Moon, J.-H., Lee, G., Park, G., Kang, P., Lee, J., Kim, A., and You, S. (2014). Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF- $\beta$ /SMAD2 and PI3K/Akt pathways. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 605-628.

Kang, J.W., Koo, H.C., Hwang, S.Y., Kang, S.K., Ra, J.C., Lee, M.H., and Park, Y.H. (2012). Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet. Sci.* *13*, 23-31.

Kato, J., Kamiya, H., Himeno, T., Shibata, T., Kondo, M., Okawa, T., Fujiya, A., Fukami, A., Uenishi, E., Seino, Y., *et al.* (2014). Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats. *J. Diabetes Complications* *28*, 588-595.

Kawakubo, K., Ohnishi, S., Fujita, H., Kuwatani, M., Onishi, R., Masamune, A., Takeda, H., and Sakamoto, N. (2016). Effect of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell transplantation in rats with acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* *45*, 707–713.

Kim, S.W., Zhang, H.Z., Guo, L., Kim, J.M., and Kim, M.H. (2012). Amniotic mesenchymal stem cells enhance wound healing in diabetic NOD/SCID mice through high angiogenic and engraftment capabilities. *PLoS One* *7*, e41105.

Kong, P., Xie, X., Li, F., Liu, Y., and Lu, Y. (2013). Placenta mesenchymal stem cell accelerates wound healing by enhancing angiogenesis in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *438*, 410-419.

Kubo, K., Ohnishi, S., Hosono, H., Fukai, M., Kameya, A., Higashi, R., Yamada, T., Onishi, R., Yamahara, K., Takeda, H., *et al.* (2015). Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates liver fibrosis in rats. *Transplant. Direct.* *1*, 1–9.

Kuo, Y.R., Wang, C.T., Cheng, J.T., Wang, F.S., Chiang, Y.C., and Wang, C.J. (2011). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced diabetic wound healing through recruitment of tissue regeneration in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Plast. Reconstr. Surg.* *128*, 872-880.

Kwon, D.S., Gao, X., Liu, Y.B., Dulchavsky, D.S., Danyluk, A.L., Bansal M., Chopp, M., McIntosh, K., Arbab, A.S., Dulchavsky, S.A., et al. (2008). Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. *Int. Wound. J.* 5, 10.

Larouche, J., Sheoran, S., Maruyama, K., and Martino, M.M. (2018). Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. *Adv. Wound Care* 7, 209–231.

Lee, E.Y., Xia, Y., Kim, W.S., Kim, M.H., Kim, T.H., Kim, K.J., Park, B.S., and Sung, J.H. (2009). Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Rep. Reg.* 17, 540-547.

Li, L., Zhang, S., Zhang, Y., Yu, B., Xu, Y., and Guan, Z.Z. (2009). Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. *Mol. Biol. Rep.* 36, 725–731.

Liu, L., Gao, J., Yuan, Y., Chang, Q., Liao, Y., and Lu, F. (2013). Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biol. Int.* 37, 551-560.

Liu, L., Yu, Y., Hou, Y., Chai, J., Hongjie, D., Chu, W., Zhang, H., Hu, Q., and Du, J. (2014). Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PLoS One* 9, e88348.

Liu, X., Wang, Z., Wang, R., Zhao, F., Shi, P., Jiang, Y., and Pang, X. (2013). Direct comparison of the potency of human mesenchymal stem cells derived from amnion tissue, bone marrow and adipose tissue at inducing dermal fibroblast responses to cutaneous wounds. *Int. J. Mol. Med.* 31, 407-415.

Lopes, L., Setia, O., Aurshina, A., Liu, S., Hu, H., Isaji, T., Liu, H., Wang, T., Ono, S., Guo, X., et al. (2018). Stem cell therapy for diabetic foot ulcers: a review of preclinical and clinical research. *Stem Cell Res. Ther.* 9, 188.

Lu, H., Wu, X., Wang, Z., Li, L., Chen, W., Yang, M., Huo, D., Zeng, W., and Zhu, C. (2016). Erythropoietin-activated mesenchymal stem cells promote healing ulcers by improving microenvironment. *J. Surg. Res.* 205, 464-473.

Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Muller, W., Roers, A., and Eming, S.A. (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J. Immunol.* *184*, 3964-3977.

Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., and Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* *229*, 176-185.

Mizushima, T., Ohnishi, S., Hosono, H., Yamahara, K., Tsuda, M., Shimizu, Y., Kato, M., Asaka, M., and Sakamoto, N. (2017). Oral administration of conditioned medium obtained from mesenchymal stem cell culture prevents subsequent stricture formation after esophageal submucosal dissection in pigs. *Gastrointest. Endosc.* *86*, 542-552 e541.

Miyamoto, S., Ohnishi, S., Onishi, R., Tsuchiya, I., Hosono, H., Katsurada, T., Yamahara, K., Takeda, H., and Sakamoto, N. (2017). Therapeutic effects of human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation and conditioned medium enema in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Am. J. Transl. Res.* *9*, 940–952.

Morbach, S., Furchert, H., Gröblichhoff, U., Hoffmeier, H., Kersten, K., Klauke, G.T., Klemp, U., Roden, T., Icks, A., Haastert, B., et al. (2012). Long-term prognosis of diabetic foot patients and their limbs: Amputation and death over the course of a decade. *Diabetes Care* *35*, 2021–2027.

Navone, S.E., Pascucci, L., Dossena, M., Ferri, A., Invernici, G., Acerbi, F., Cristini, S., Bedini, G., Tosetti, V., Ceserani, V., et al. (2014). Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice. *Stem Cell Res. Ther.* *5*, 7.

Negishi, M., Shimizu, H., Ohtani, K., and Mori, M. (1996) Acarbose partially prevents the development of diabetes mellitus by multiple low-dose streptozotocin administration. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1996 Jun; *33*(1):15–9.

Onishi, R., Ohnishi, S., Higashi, R., Watari, M., Yamahara, K., Okubo, N., Nakagawa, K., Katsurada, T., Suda, G., Natsuzaka, M., *et al.* (2015). Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates dextran sulfate sodium-induced severe colitis in rats. *Cell Transplant.* *24*, 2601-2614.

Ono, M., Ohnishi, S., Honda, M., Ishikawa, M., Hosono, H., Onishi, R., Nakagawa, K., Takeda, H., and Sakamoto, N. (2015). Effects of human amnion-derived mesenchymal stromal cell transplantation in rats with radiation proctitis. *Cytotherapy* 17, 1545-1559.

Paquet, J., Deschepper, M., Moya, A., Logeart-Avramoglou, D., Boisson-Vidal, C., and Petite, H. (2015). Oxygen tension regulates human mesenchymal stem cell paracrine functions. *Stem Cell Trans. Med.* 4, 809-821.

Patel, S., Srivastava, S., Singh, M.R., and Singh, D. (2019). Mechanistic insight into diabetic wounds: pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomed. Pharmacother.* 112, 108615.

Pedroso, D.C.S., Tellechea, A., Moura, L., Fidalgo-Carvalho, I., Duarte, J., Carvalho, E., and Ferreira, L. (2011). Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. *PLoS One* 6, e16114.

Peng, B.Y., Dubey, N.K., Milshra, V.K., Tsai, F.C., Dubey, R., Deng, W.P., and Wei, H.J. (2018). Addressing stem cell therapeutic approaches in pathobiology of diabetes and its complications. *J. Diabetes Res.* 2018, 7806435.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Rakieten, N., Rakieten, M.L., and Nadkarni, M.V. (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother. Rep.* 29, 91-8.

Rees, D.A. and Alcolado, J.C. (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 22, 359-70.

Rey, S. and Semenza, G.L. (2010). Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc. Res.* 86, 236-42.

Sato, C., Yamamoto, Y., Funayama, E., Furukawa, H., Oyama, A., Murao, N., Hosono, H., Kawakubo, K., Sakamoto, N., and Ohnishi, S. (2018). Conditioned medium obtained from amnion-derived mesenchymal stem cell culture prevents activation of keloid fibroblasts. *Plast. Reconstr. Surg.* *141*, 390-398.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* *9*, 671–675.

Sindrilaru, A., and Sharffetter-Kochanek, K. (2013). Disclosure of the culprits: Macrophages-versatile regulators of wound healing. *Adv. Wound Care* *2*, 357–368.

Tark, K.C., Hong, J.W., Kim, Y.S., Hahn, S.B., Lee, W.J., and Lew, D.H. (2010). Effects of human cord blood mesenchymal stem cells on cutaneous wound healing in leprdb mice. *Ann. Plast. Surg.* *65*, 565-72.

Tsuboi, R., and Rifkin, D.B. (1990). Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *Int. J. Clin. Exp. Med. Res.* *172*, 245–251.

Tsuda, M., Ohnishi, S., Mizushima, T., Hosono, H., Yamahara, K., Ishikawa, M., Abiko, S., Katsurada, T., Shimizu, Y., and Sakamoto, N. (2018). Preventive effect of mesenchymal stem cell culture supernatant on luminal stricture after endoscopic submucosal dissection in the rectum of pigs. *Endoscopy* *50*, 1001-1016.

Tuca, A.C., Ertl, J., Hingerl, K., Pichlsberger, M., Fuchs, J., Wurzer, P., Pfeiffer, D., Bubalo, V., Parvizi, D., Kamolz, L.P., *et al.* (2016). Comparison of Matrigel and Matriderm as a carrier for human amnion-derived mesenchymal stem cells in wound healing. *Placenta* *48*, 99-103.

Uchida, Y., Freitas, M.C., Zhao, D., Busuttill, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2010). The protective function of neutrophil elastase inhibitor in liver ischemia/reperfusion injury. *Transplant.* *89*, 1050–1056.

van Netten, J.J., Bus, S.A., Apelqvist, J., Lipsky, B.A., Hinchliffè, R.J., Game, F., Rayman, G., Lazzarini, P.A., Forsythe, R.O., Peters, E.J.G., *et al.* (2020). Definitions and criteria for diabetic foot disease. *Diabetes Metab. Res. Rev.* *36*, e3268.

Wang, H., Chen, L., Liu, Y., Luo, B., Xie, N., Tan, T., Song, L., Erli, P., and Luo, M. (2016). Implantation of placenta-derived mesenchymal stem cells accelerates murine dermal wound closure through immunomodulation. *Am. J. Transl. Res.* 8, 4912-4921.

Wang, P., Shu, B., Xu, Y., Zhu, J., Liu, J., Zhou, Z., Chen, L., Zhao, J., Liu, X., Qi, X. et al. (2017). Basic fibroblast growth factor reduces scar by inhibiting the differentiation of epidermal stem cells to myofibroblasts via the Notch1/Jagged1 pathway. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 114.

Wu, Q., Fang, T., Lang, H., Chen, M., Shi, P., Pang, X., and Qi, G. (2017). Comparison of the proliferation, migration and angiogenic properties of human amniotic epithelial and mesenchymal stem cells and their effects on endothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 39, 918-926.

Wu, Y., Chen, L., Scott, P.G., and Tredget, E.E. (2007). Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 25, 2648-59.

Yamahara, K., Harada, K., Ohshima, M., Ishikane, S., Ohnishi, S., Tsuda, H., Otani, K., Taguchi, A., Soma, T., Ogawa, H., et al. (2014). Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 9, e88319.

Yasui, G., Yamamoto, Y., Shichinohe, R., Funayama, E., Oyama, A., Hayashi, T., and Furukawa, H. (2016). Neuregulin-1 released by biodegradable gelatin hydrogels can accelerate facial nerve regeneration and functional recovery of traumatic facial nerve palsy. *J. Plast. Reconstr. Aesth. Surg.* 69, 328-334.

Yoshikawa, T., Mitsuno, H., Nonaka, I., Sen, Y., Kawanishi, K., Inada, Y., Takakura, Y., Okuchi, K., Nonomura, A. (2008). Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. *Plast. Reconstr. Surg.* 121, 860-877.

神林由美, 相場節也. (2016). 膠原病, 血管炎に伴う皮膚潰瘍と壊疽性膿皮症. *PEPARS* 119, 20-26.