



Title	羊膜由来間葉系幹細胞による黄色ブドウ球菌感染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)	石井, 陸
Description	配架番号 : 2887
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16395号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95384
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	ISHII_Riku_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 石井 陸

学 位 論 文 題 名

羊膜由来間葉系幹細胞による黄色ブドウ球菌感染糖尿病性潰瘍の治療法の開発

(Development of a treatment for diabetic ulcers infected with *Staphylococcus aureus* using amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells)

【背景と目的】

間葉系幹細胞は骨や軟骨といった間葉系細胞への分化能を持ち、パラクライン作用と呼ばれる種々の生理活性物質を放出して血管新生、抗炎症、創傷治癒促進、抗菌作用などの効果をもたらすといった特徴がある。当研究室では羊膜由来間葉系幹細胞（AMSCs）に関する研究を消化器内科学教室および薬学部分子細胞医薬学研究室を共同で研究を行ってきた。我々は羊膜由来間葉系幹細胞を培養して得られる培養上清(conditioned medium, CM) は、ケロイド線維芽細胞の増殖を抑制すること、また糖尿病マウスの創傷治癒を促進し、低酸素培養条件下ではその作用がさらに増強されることを明らかにしてきた。糖尿病性足潰瘍はその難治性のみならず、易感染性でかつ感染により容易に下肢の切断や死に至る点が大きな問題である。下肢の切断は生活の質の大幅な低下に至り、また生命予後を非常に悪化させることが知られている。感染の起因为菌としては、黄色ブドウ球菌（*Streptococcus aureus*）を主とすることが多い。ここでは、低酸素条件下で培養した間葉系幹細胞（AMSC）の培養上清を、黄色ブドウ球菌に感染した糖尿病マウスの創傷に局所的に塗布し、細菌数と創傷治癒に対する効果を評価した。糖尿病性足潰瘍に対する感染制御と創傷治癒促進作用を持つ新規治療法の開発につなげることを目指す。

【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（21%）または低酸素（1%）の酸素濃度で培養してCMを作成し、抗菌ペプチドであるLL-37の濃度をELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)で測定した。羊膜由来間葉系幹細胞が抗菌ペプチドを分泌するか、またその分泌量は低酸素培養で増加するかを評価した。

第二章において、羊膜由来間葉系幹細胞の *S. aureus* の増殖抑制作用について評価するため、実験系の構築を試みた。まずは羊膜由来間葉系幹細胞と *S. aureus* を共培養することで、細胞そのものの細菌増殖抑制作用を評価した。次に羊膜由来間葉系幹細胞のCM単体での細菌増殖抑制作用について評価した。最後にCMと細菌増殖用のトリプティックソイ液体培地と混合した場合の細菌増殖抑制作用について評価し、低酸素培養がCMの *S. aureus* に対する増殖抑制作用を増強させるかを検討した。

第三章では *in vitro* における羊膜由来間葉系幹細胞の細菌増殖抑制作用を検討するための実験系の構築とその作用の評価を行った。まずは先行研究に則って糖尿病モデルマウスを作成した。次に他の細菌のコンタミネーションを防ぐための適切な清潔操作による皮膚潰瘍の作成と *S. aureus* の感染方法を検討した。最後にこの手法を用いてと感染性糖尿病性潰瘍マウスモデルを作成し、各CMを含むハイドロゲルを塗布し、細菌増殖抑制作用と創傷治癒効果を評価した。

【結果】

第一章では羊膜由来間葉系幹細胞のCMには抗菌ペプチドであるLL-37が含まれていた。またその濃度は1%の低酸素下で培養することで増加し、それは通常酸素濃度で培養したCMよりも有意に大きかった。

第二章では、羊膜由来間葉系幹細胞と *S. aureus* の共培養では *S. aureus* の増殖は抑制されなかった。また CM 中で *S. aureus* を培養した場合は、LL-37 を含まないコントロール群でも細菌増殖が見られず、CM 単体では実験系として不適と考えられた。CM とトリプティックソイ液体培地と混合した液体内で *S. aureus* を培養すると、細菌増殖抑制作用が認められた。また低酸素培養 CM では通常酸素培養 CM に比べ有意に *S. aureus* の増殖を抑制することが明らかになった。

第三章では、種々の清潔操作プロトコルを評価した。イソジン消毒液の使用はマウス皮膚にびらんを形成し細菌コンタミネーションやマウスへのストレスの観点から不適であった。また非滅菌手袋や非滅菌器具の使用も同様の理由から不適であった。結果として、滅菌手袋、0.05%クロルヘキシジングルコン酸塩液によるマウス皮膚消毒、滅菌器具と滅菌覆布の使用といったヒトへの外科手術と同様の構成が他の細菌のコンタミネーションを防止した。このプロトコルを用いて清潔操作を行い、マウスモデルを作成し評価した。その結果、低酸素培養 CM ゲルはコントロールゲルと通常酸素培養 CM ゲルと比べ有意に糖尿病マウスの皮膚潰瘍中の *S. aureus* 数を減少させ、創傷治癒を促進した。また組織学的にも、細菌数の減少、好中球浸潤の減少、血管新生の増強と細胞分裂の促進が見られた。また組織学的スコアリングシステムを用いた創傷治癒の評価でも、低酸素培養 CM ゲル塗布群は有意に高スコアであった。

【考察】

第一章では、羊膜由来間葉系幹細胞が抗菌ペプチドである LL-37 を分泌することが初めて明らかになった。また、他ソース由来も含めて、間葉系幹細胞が低酸素培養で LL-37 の分泌量を増加させることを初めて明らかにした。

第二章では、*in vitro*における CM の細菌増殖抑制作用について評価した。羊膜由来間葉系幹細胞との共培養では細菌増殖抑制作用がみられなかったが、これは低酸素培養を行ったことが仮説として挙げられる。また CM 単体でも細菌増殖抑制作用がみられなかったが、これは先行研究と異なり CM を作成する際にフィルターで濾過したため考えられた。CM とトリプティックソイ液体培地を混合することで CM の細菌増殖抑制作用が評価可能となった。その結果、羊膜由来間葉系幹細胞 CM は細菌増殖抑制作用を持ち、かつ低酸素培養でその作用が増強されることが明らかになった。羊膜由来間葉系幹細胞が細菌増殖抑制作用をもつこと、また他ソース由来も含めて間葉系幹細胞の細菌増殖抑制作用が低酸素培養で増強されることが始めて明らかになった。

第三章では、感染性糖尿病性潰瘍マウスモデルを作成し、また同モデルにおける細菌増殖抑制作用と創傷治癒促進作用を評価した。この実験では正確な細菌数の評価や他の細菌による影響を防ぐため、マウスモデル作成において細菌のコンタミネーションを防ぐことが重要であった。種々の清潔操作プロトコルを検討した結果、我々形成外科医が日常的に行うヒトに対する手術と同様のものが良い結果を示した。この手法で作成したマウスモデルを用いて実験を行った結果、低酸素培養 CM が *in vivo*においても細菌増殖抑制作用を示し、それが LL-37 によるものであると考えられた。また、非感染創と同様に創傷治癒促進作用を示したが、これは LL-37 の効果でもあることが考えられた。

【結論】

第一章において、羊膜由来間葉系幹細胞は、抗菌ペプチドである LL-37 を分泌し、その分泌量は 1%の低酸素培養で増強されることを明らかにした

第二章において、羊膜由来間葉系幹細胞は *in vitro*において *S. aureus* の増殖抑制作用を持ち、その作用は、1%の低酸素培養で増強されることを明らかにした。

第三章において、低酸素培養 CM は *S. aureus* が感染した糖尿病マウスの皮膚潰瘍の細菌数を減少させ、創傷治癒を促進することを明らかにし、細菌増殖抑制作用と創傷治癒促進の二つの効果をもつ新規治療法の開発につながる可能性が示唆された。