

主論文の要旨

Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats

間葉系幹細胞はケラチノサイトの機能を改善させることにより
糖尿病ラットにおける足底潰瘍の治癒を促進する

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：大磯 ユタカ 教授)

加藤 二郎

【諸言】

足潰瘍に代表される糖尿病性足病変は外傷を除く下肢切断の主要な原因となっている。糖尿病性足潰瘍（DFU）の発症および治癒遅延の原因の詳細はいまだ解明されておらず、適切な動物実験モデルも存在しない。

これまでも多数の研究が齧歯類の背部を用いて行われてきたが、当該部位はヒトの皮膚とは創傷治癒機序が異なる。齧歯類の皮膚は皮筋層が非常に厚く、受傷後すぐに創部が収縮する。対してヒトでは最初に再上皮化と肉芽形成が起こり、その後に収縮が起きる。つまり創傷の初期に重要な治癒機序は、齧歯類では創傷の収縮、ヒトでは再上皮化と肉芽形成である。ドーナツ状の素材を用いて創傷を外側から牽引するなど収縮を抑制する試みは以前からなされているが、DFUには様々な因子が影響しているので、実際の状態に近い動物モデルが使用できることが望ましい。

骨髄由来間葉系幹細胞（BM-MSCs）は十分な安全性、多能性を有し、細胞の生存、増殖を促進するサイトカインを分泌すると報告されており、最も臨床応用が期待できる幹細胞の一つと考えられている。創傷治癒においても過剰な炎症の抑制や細胞外物質の産生、ケラチノサイトの移動、血管新生の促進による改善効果があると報告されている。我々はこの論文で DFU の有用なモデルを確立し、BM-MSCs による創傷治癒遅延の改善効果を検討した。

【方法】

6 週齢雄 Sprague-Dawley(SD)ラットに対して streptozotocin 60mg/kg を腹腔内投与し、1 週間後に血中グルコース濃度 16mmol/l 以上のものを糖尿病群（D）とした。この実験方法は名古屋大学実験動物部門の承認を得た。8 週間後に生検トレパンを用いて足底と大腿外側に 4mm の潰瘍を作成した。デジタルカメラで創の状態を経時的に記録し、ImageJ にて創の面積を計算した。

6 週齢雄 SD ラットの大腿骨、脛骨から骨髄を採取し、比重液を用いた遠心法により単核細胞を分離して培養し、接着したものを BM-MSCs として継代した。

BM-MSCs は、フローサイトメトリーにより表面抗原を確認した。

BM-MSCs の移植は、一肢あたり 1.0×10^6 個の細胞を 50ul 生理食塩液に懸濁して皮下に投与した。また、PKH で着色して追跡を行った。

組織標本は 4%PFA で固定し、コンパウンドを用いて凍結切片とした。

ヒトケラチノサイト(HKCs)は Lonza Japan よりセルラインを調達した。6, 12, 24mmol/l グルコース濃度でそれぞれ BM-MSCs 培養液（MSC-CM）を添加したものとし、72 時間の培養を行った後に解析した。

HKCs から mRNA を抽出し、定量 real-time RT-PCR 法で発現量を解析した。

同様に HKCs からタンパクを生成し、focal adhesion kinase (FAK) のタンパク発現を解析した。Western blotting は湿式法で行い、phospho Y397 pFAK 抗体(Abcam, Cambridge, MA)を用いた。

細胞活性は、MTS 法を用いて評価した。

統計学的処理は ANOVA で行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありとした。

【結果】

BM-MSCs の表面抗原は CD29 および CD90 陽性、CD34 および CD45 陰性で、既報のラット BM-MSCs と同様であった。(Figure 1A, 1B, 1C and 1D)

BM-MSCs 移植 3 日後には創周囲に多数の BM-MSCs が確認され、(Fig. 2A and 2B) 14 日後でも僅かな数の BM-MSCs が生着していた。(Fig. 2C)

受傷 7 日後には足底では新しい上皮が創表面を覆っていたが (Fig. 3A)、大腿部では収縮が起きていた。(Fig. 3B) 足底では、組織学的にも再上皮化がおきていることが確認できたが (Fig. 3C) 大腿部では再上皮化は確認されなかった。(Fig. 3D)

創傷治癒までの期間は対照群に対して D で遅延が見られ、創面積も受傷 9 日目から 20 日目まで D が有意に大きかった。(Fig. 4A, 4B and 4C) D において BM-MSCs 移植治療により創傷治癒までの期間は短縮し、創面積も 3 日目から 20 日目まで BM-MSCs 治療群で有意に小さくなった。(Fig. 4A, 4B, 4D)

HKCs の細胞活性は 6mmol/l (6-vehicle) と比較して、12mmol/l (12-vehicle) および 25mmol/l (25-vehicle) のグルコース濃度にて有意に低下していた。MSC-CM を添加することにより 12mmol/l、25mmol/l グルコース濃度にて細胞活性は有意に改善した。

HKCs のサイトカイン mRNA 発現は、MMP-2、EGF、IGF-1 ではグルコース濃度で発現の差が見られなかったが 12-vehicle、25-vehicle に MSC-CM を添加することにより有意に発現が亢進した。(Fig. 6A, 6C and 6D) MMP-9 では 25-vehicle で 6-vehicle に対して発現が低下したが MSC-CM を添加しても発現の亢進は見られなかった。(Fig. 6B)

培養 HKCs における pFAK のタンパク発現は 25-vehicle で 6-vehicle に比較して低下し、MSC-CM の添加で改善した。(Fig. 7a and 7b)

【考察】

この研究では、ヒトの DFU を再現したラット足底 DFU モデルを作成し、BM-MSCs 移植治療による改善効果を確認した。また、その改善効果は再上皮化に重要な役割を果たすケラチノサイト機能の改善によるものであることを *in vitro* の実験から解明した。

in vitro の HKCs 培養は 72 時間と慢性期の評価にはやや時間が短い可能性がある。5 日間の HKCs 培養で MMP2 mRNA レベルが低下したという報告は他にもある。長期間の HKCs 培養による慢性期の評価が望ましいが現状では困難である。

難治性潰瘍で MMP9 の mRNA およびタンパクレベルが上昇しているという報告があるが、MMP9 は HKCs 以外にも DFU にある線維芽細胞や炎症系細胞にも発現していると報告されているので、今後これらに細胞での MMP9 発現を調べる必要がある。

栄養因子の中で HKCs の活性化に重要な役割を果たす EGF と IGF-1 の mRNA 発

現レベルは MSC-CM を添加した HKCs で上昇した。これはオートクライン、パラクラインの活性化を意味する。BM-MSCs も多数の成長因子を産生するが、それが HKCs の活性や増殖を高めたり、EGF や IGF-1 の分泌を増加させたりすると考えられる。一方、このラット DFU モデルでは下肢虚血については評価できていないが、将来的には中等度の虚血と糖尿病を組み合わせたモデルを使用したいと考えている。

【結語】

ラット足底潰瘍は創傷治癒過程で収縮が起きないのでヒト DFU での創傷治癒遅延を再現することができる。このモデルにおいて MSCs 移植治療が DFU に対して有効であることを確認した。さらに、ケラチノサイト機能の低下が DFU での創傷治癒遅延の一因になっていることを示した。