

主論文の要旨

Effects of exosomes derived from the induced pluripotent stem cells on skin wound healing

〔 ヒト iPS 細胞由来エクソソームの皮膚創傷治癒への影響 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 形成外科学分野

(指導：亀井 讓 教授)

小林 倫

【緒言】

国際糖尿病連盟 (IDF) の糖尿病アトラスによると、世界で約 4 億 1,500 万人が糖尿病に罹患していると推定されている。糖尿病には様々な合併症があり、なかでも糖尿病性足潰瘍は、糖尿病患者の約 25% に発症し、治療に難渋することがあり、医療経済的にも深刻な課題となっている。その原因は糖尿病による末梢神経障害による皮膚損傷に始まり、動脈硬化による末梢動脈閉塞性疾患や創傷治癒遅延、さらに免疫低下による感染等が加わり、重傷化していくことがあげられる。糖尿病性足潰瘍の治療には血糖コントロール、創管理、血行再建術等などがあるが治療効果の限界もあり、新たな治療法が模索されている。

近年、新たな治療法を開発する目的で様々な疾患で細胞治療研究が行われている。これらには、血小板、前駆細胞、体性幹細胞および胚性幹 (ES) / 誘導性多能性幹 (iPS) 細胞を含む様々なタイプの幹細胞の適用および移植が含まれる。糖尿病性足潰瘍に対しては、血小板や前駆細胞、各種体性幹細胞等の臨床応用、また ES 細胞や iPS 細胞などの基礎研究の報告もある。しかしながら、細胞移植時の肺梗塞や移植細胞自体の腫瘍化など安全面での問題も指摘されている。これらのリスクは、皮膚創傷の治療に有効であることが実証されている培養細胞上清を用いることによって回避することができる。また、細胞培養上清の治療効果のメカニズムの一因として、培養上清中に含まれる微小胞「エクソソーム」の関与が指摘されている。エクソソームは、細胞膜から exocytosis される直径 50–200nm 大の微小胞で、リン脂質の二重膜構造をとり、その表面に特異な表面抗原が発現している。その内部には miRNA やタンパク質が存在し、細胞間の情報伝達などに関与していることが報告されている。

しかしながら、ヒト iPS 細胞由来エクソソーム (ヒト iPS-Exo) に関する報告は、他の幹細胞由来のものと比較して少なく、治療モデルでの解析が進んでいない。本研究では、ヒト iPS-Exo が皮膚創傷治癒に与える影響について検討した。

【対象及び方法】

山中らの方法 (*Cell* 126 : 663 - 676, 2006) に従い、ヒト iPS 細胞 (201 B 7 株、理化学研究所) を培養し、その培養上清から MagCapture Exosome Isolation Kit PS (Wako, Osaka, Japan) を用いエクソソームを回収した (ヒト iPS-Exo)。また、iPS 細胞用培地を同時間培養し、同様にエクソソームを回収し (培地 Exo)、ヒト iPS-Exo の対象群として用いた。まず、ヒト iPS-Exo の形態観察を透過型顕微鏡 JEM-1400 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) で行い、表面抗原発現の特性解析をフローサイトメーター FACSCalibur (Becton Dickinson and Company) で行った。次に、ヒト iPS-Exo の糖尿病マウス由来皮膚線維芽細胞に与える影響を Incucyte ZOOM-HD-2CLR を用いスクラッチアッセイと増殖試験にて解析した。さらに、糖尿病マウス (*db/db*, 10 週齢 オス) を用いて皮膚創傷治癒モデルを作成し、ヒト iPS-Exo、培地 Exo、PBS をそれぞれ創部内に局所投与し、創傷治癒に与える影響を 3 群間で比較検討した。

【結果】

透過型顕微鏡の観察で、ヒト iPS-Exo が培地 Exo (100nm 以下) より優意に大きい直径 120 ± 24.49 nm の二重膜の微小胞であることを確認した (図 1)。フローサイトメトリーの結果、iPS-Exo では、CD 9 ,CD 63 および CD 81 に対して陽性であったが、HLA-ABC および HLA-DR の発現については陰性であることを確認した (図 2)。スクラッチアッセイでは、ヒト iPS-Exo と共培養した糖尿病マウス由来皮膚線維芽細胞の遊走能は、培地 Exo と共培養した糖尿病マウス由来皮膚線維芽細胞よりも、有意に亢進していた (図 3)。皮膚創傷治癒モデルでは、術後 7 日後の創部面積は、PBS 群、培地 Exo 群と比較し、iPS-Exo 群で有意に小さかった (図 4)。術後 7 日目の組織標本に対し α -SMA と CD31 による免疫染色を行ったところ iPS-Exo 群は PBS 群、培地 Exo 群と比較し血管数が有意に多いことが確認された。(図 5)

【考察】

in vitro の実験ではヒト iPS-Exo は糖尿病マウス皮膚線維芽細胞の遊走能を亢進したが、細胞増殖には影響を与えなかった。*in vivo* の実験ではヒト iPS-Exo が糖尿病性潰瘍における初期の治癒を促進させた。また、7 日目における血管密度を増加させた。ヒト iPS-Exo は HLA-ABC および HLA-DR の発現を認めないため、他家由来ヒト iPS-Exo を用いた製剤化や、他疾患が原因である皮膚創傷治癒への応用への可能性もあると考えた。

【結語】

ヒト iPS-Exo は糖尿病性潰瘍モデルマウスへの局所投与により創傷治癒初期における治癒を促進させた。ヒト iPS-Exo は線維芽細胞の遊走能亢進と創傷治癒初期における血管数を増加させることで糖尿病性潰瘍初期における治癒を促進する。よって、糖尿病性足潰瘍の治療におけるツールとしての可能性が示唆された。