

# 博士論文

論文題目 ヒト脂肪組織由来SSEA-3陽性細胞を用いた皮膚潰瘍治療に関する研究

氏名 木下 佳保里

# 目次

略語.....	2
要旨.....	4
序文.....	5
方法.....	7
結果.....	14
考察.....	29
引用文献.....	33
謝辞.....	41

## 略語

DM: diabetes mellitus	(糖尿病)
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium	(ダルベッコ改変イーグル培地)
EGF: epidermal growth factor	(上皮成長因子)
FBS: fetal bovine serum	(ウシ胎児血清)
bFGF: basic fibroblast growth factor	(塩基性線維芽細胞増殖因子)
hASCs: human adipose-derived stem cells	(ヒト脂肪組織由来幹細胞)
HGF: hepatocyte growth factor	(幹細胞増殖因子)
KGF: keratinocyte growth factor	(表皮増殖因子)
MACS: magnetic-activated cell sorting	(磁気細胞分離装置)
MSC: mesenchymal stem cell	(間葉系幹細胞)
Muse cells: multi-lineage differentiating stress enduring cells	(Muse 細胞)
NGF: nerve growth factor	(神経成長因子)
PBS: phosphate-buffered saline	(リン酸緩衝生理食塩水)
PDGF: platelet-derived growth factor	(血小板由来成長因子)
PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule-1	(血小板内皮細胞接着分子 1)
SCF: stem cell factor	(幹細胞因子)
SDF-1: stromal cell-derived factor 1	(間質細胞由来因子 1)
STZ: streptozotocin	(ストレプトゾトシン)

SVF: stromal vascular fraction

(間質血管細胞群)

TGF: transforming growth factor

(トランスフォーミング増殖因子)

TNF: tumor necrosis factor

(腫瘍壊死因子)

VEGF: vascular endothelial growth factor

(血管内皮細胞増殖因子)

## 要旨

本研究では、ヒト脂肪組織由来幹細胞からの SSEA-3 陽性細胞の分離法を確立し、細胞集団の特性を分析した。次いで難治性皮膚潰瘍治療への有用性を検証した。ヒト脂肪組織由来幹細胞に含まれる SSEA-3 陽性細胞は高い増殖因子産生能や多能性を持つことが明らかになった。また、創傷治癒遅延マウスに皮膚潰瘍を作成した実験では、ヒト脂肪組織由来幹細胞は上皮化促進効果を示し、SSEA-3 陽性細胞はさらに高い効果を示した。これらの結果から、ヒト脂肪組織由来幹細胞および SSEA-3 陽性細胞は増殖因子の放出や組織特異的細胞に分化することで創傷治癒促進に寄与し、将来的な細胞治療の手段の一つとして有用であると考えられた。

## 序文

骨髄移植は長い間、白血病の治療手段として用いられている[1]が、骨髄移植細胞に含まれる間葉系幹細胞(MSC)が様々な臓器において組織特異的な細胞へ分化することが示されていた[2][3][4]。過去の報告において、骨髄および皮膚由来の MSC が多能性細胞の性質を示すことは示唆されていた[2][3][5][6]が、特異的な細胞マーカーが同定されなかったことや数が非常に少ないことから、その多能性細胞の再現には至らなかった。2010年に黒田ら[7]が、ヒト MSC から、間葉系マーカーの CD105 とヒト多能性幹細胞マーカーの stage-specific embryonic antigen-3(SSEA-3)が二重陽性である特徴的な細胞集団の単離に成功し、報告した。これらの細胞は、自己複製能(self-renew)を持ち、単一細胞から内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉系の細胞に分化することが出来た[7]。これらの細胞は、当初 MSC にストレスを加えた条件下で確認されたので、multi-lineage differentiating stress enduring cells(Muse 細胞)と名付けられた。Muse 細胞は、増殖能が高くないものの、三胚葉系の細胞への分化能を有し、テラトーマ形成を認めないことから、望ましくない腫瘍性増殖の可能性は低いと報告されている[7]。それゆえ、Muse 細胞は他の多能性細胞より安全性が高く、かつ、非 Muse 細胞の MSC よりも高い治療効果を持つ可能性があるとして報告されている[7]。Muse 細胞は現在の所、ヒトとヤギ[8]以外で認められておらず、ヒトでは皮膚や皮下組織などの中胚葉系臓器や組織の血管周囲に認められている[9][10][11]。また、Muse 細胞は全身投与された後に、傷害部位へ遊走し、組織特異的な細胞へ分化することが、肝臓、皮膚、骨格筋におけ

る動物実験で証明されている[7]。

本研究では、骨髄および皮膚由来の MSC に SSEA-3 陽性細胞 (Muse 細胞) が含まれているのと同様に、MSC であるヒト脂肪組織由来幹細胞(hASCs)にも SSEA-3 陽性細胞が含まれていると考え、hASCs からの SSEA-3 陽性細胞の分離方法の確立を試み、その特性を *in vitro* にて評価した。次に、糖尿病性難治性皮膚潰瘍への治療効果を *in vivo* にて評価した。虚血状態の皮膚潰瘍は創傷治癒遅延を来し、MSC を用いた細胞治療の効果的な治療対象となることが予想される。Muse 細胞が他の MSC よりも優れているかを検証する為に、本研究では Muse 細胞および非 Muse MSC の 2 種類の細胞集団の局所投与を糖尿病免疫不全マウスの皮膚潰瘍に行なった。

## 方法

### ヒト脂肪組織由来幹細胞(hASCs)の単離および培養：

ヒト由来検体の使用にあたり、東京大学倫理委員会の承認(承認番号 2552-(2))および事前に患者から書面でのインフォームドコンセントを得て、実験を開始した。

非肥満患者(女性 5 人、年齢  $26.6 \pm 8.7$  歳、BMI  $21.5 \pm 2.0 \text{ kg/m}^2$ )から脂肪吸引手術で得られた脂肪組織片をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄後、0.075% コラゲナーゼ溶液と混和し、恒温振盪器で 200rpm、 $37^\circ\text{C}$ 、30 分間処理した。処理した溶液を遠心(760g、5 分)して脂肪細胞と線維性組織をペレットから分離し、ペレットを回収、PBS で洗浄後、 $100\mu\text{m}$ 、 $70\mu\text{m}$ 、 $40\mu\text{m}$  のセルストレーナーに通し、10% ウシ胎児血清(FBS)を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  の条件下で培養した。培養過程で接着・増殖するものを hASCs とし、第 2 継代を実験に使用した。我々の先行研究により、第 2 継代の培養 hASCs が自己増殖して 3 胚葉分化能を維持し、間葉系幹細胞としての性質を保持していることが確認されている[12]。

### Muse 細胞の分離：

磁気細胞分離装置(MACS) (autoMACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を SSEA-3 陽性細胞(Muse 細胞)の分離に用いた。過去の研究で Muse 細胞は SSEA-3 陽性/CD105 陽性と報告されているが、SSEA-3 陽性 Muse 細胞のほぼ 100%が CD105 陽性である為[7][11][13]、我々は抗 SSEA-3 抗体を用いた。anti-SSEA-3 antibody



conjugated with phycoerythrin (PE) (Miltenyi Biotec)と、anti-PE microbeads (Miltenyi Biotec)を用いると、標識された細胞は磁場に留まり、陽性細胞群として分離される。一方、磁場に留まらなかった細胞は陰性細胞群として分離される。こうして得られた分離陽性細胞群を「Muse-rich 群」、分離陰性細胞群を「Muse-poor 群」と定義した。稀少細胞である Muse 細胞の純度を高めるために、MACS の分離プログラムでは、遅い速度で磁場を二回通す、稀少細胞に適したプログラムを採用した。

#### フローサイトメトリー解析：

Muse 細胞分離前後における SSEA-3 陽性細胞の割合を、フローサイトメーター (MACSQuant, Miltenyi Biotec)で解析した。抗体は、anti-SSEA-3 antibody conjugated with PE (Miltenyi Biotec)を用いた。

#### サイトカイン産生分析(ELISA 法)：

Muse-rich 群、Muse-poor 群を 60-mm ディッシュに  $4.0 \times 10^5$  細胞の密度で播種し、無血清の DMEM で、各々を低酸素濃度 (1% O<sub>2</sub>)および正常酸素濃度 (6% O<sub>2</sub>)下で 48 時間培養した。培養後、細胞上清を回収、0.22 $\mu$ m フィルターで濾過し、ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)と Cytokine array kit (Signosis, Santa Clara, CA)を用いてサイトカイン産生量を測定した。サイトカインは、幹細胞増殖因子(HGF)、間質細胞由来因子 1(SDF-1)、血小板由来成長因子(PDGF)-BB、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、上皮

成長因子(EGF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)- $\beta$ 、神経成長因子(NGF)- $\beta$ 、幹細胞因子(SCF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$  を測定した。吸光度は 450nm 波長をプレートリーダー(M1000, Tecan Group, Männedorf, Switzerland) で測定した。

#### マイクロアレイ解析：

Muse-rich 群と Muse-poor 群の遺伝子発現の相違を調べる為に、マイクロアレイ解析を行なった。培養 hASCs を 2mM EDTA 含有 0.25%トリプシンで 5 分間処理してディッシュ表面から剥がし、細胞懸濁液を回収した。MACS 分離前の hASC をコントロールとして用いる為に、一部の細胞懸濁液を ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan)に溶解した。残りの細胞懸濁液は MACS 分離により Muse-rich 群、Muse-poor 群に分け、それぞれを同様に ISOGEN に溶解して検体とした。それぞれの検体から Total RNA を RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて抽出し、Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を用いて蛍光標識された cRNA を合成した。標識 cRNA は SurePrint G3 Human GE microarray 8 60K (G4851A, Agilent Technologies)とハイブリダイズした。マイクロアレイの読み取りは、G2505C microarray scanner、Feature Extraction Software (Agilent Technologies)を用いた。遺伝子発現は GeneSpring GX 12.5 software (Agilent Technologies)で解析した。

## 動物実験：

動物実験・動物管理は、東京大学の定めたガイドラインに沿って行なった(承認番号 医-P13-104)。

### (1)免疫不全糖尿病マウスの作成

5 週齢オスの免疫不全 SCID マウスを 24 時間絶食にさせた後、クエン酸緩衝液(pH 4.5)で溶解したストレプトゾトシン(STZ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 150 mg/kg を腹腔内投与した。STZ 投与 3 日後に血糖値を測定し、300mg/dl 以上で糖尿病(DM)とみなした(DM-SCID)。300mg/dl 以下のマウスは、2 回目の STZ150mg/kg の追加投与を行ない、さらに 3 日後に再度血糖値を測定し、300mg/dl 以上で DM-SCID とみなした。DM-SCID 状態で 4 週経過したマウスを後述する皮膚潰瘍モデル作成に用いた。DM-SCID 作成の概要および血糖値推移の代表値を図 1 に示す。

### (2)皮膚潰瘍モデルの作成

ペントバルビタール(65mg/kg)で麻酔し、過去の報告[14][15]と同様に、マウス背部に皮膚全層欠損創を作成した。背部 2 ヶ所に直径 6mm の潰瘍をスキンパンチ 6mm(Kai Industries Co., Tokyo, Japan)を用いて作成し、創部の拘縮予防に、内径 9 mm、外径 15mm、厚さ 1mm のシリコンリング(Kyowa Industries, Saitama, Japan)を 6-0 ナイロン糸で縫着した。創部の乾燥予防に、創傷被覆材(パーミロール®, Nitto Medical, Osaka, Japan)を用いた。創傷治癒効果の評価の為、次の 5 つの実験群を作成した。①wild-type 群(ICR

マウス)、②非 DM-SCID 群(SCID マウス)、③DM-SCID 群(STZ 投与による高血糖状態の SCID マウス)、④DM-SCID に Muse-rich 細胞を投与した群、⑤DM-SCID に Muse-poor 細胞を投与した群である(各群 n=6)。細胞は、Muse-rich 群、Muse-poor 群共に  $1.0 \times 10^5$  細胞を潰瘍作成時に潰瘍周囲へ投与した。day0、day3、day7、day10、day14 の上皮化経過をデジタルカメラ(IXY Digital 90, Canon, Tokyo, Japan)で撮影した。写真データから上皮化の割合を Photoshop CS6 (Adobe Systems, San Jose, CA)を用いて評価した。day14 の撮影後に潰瘍組織の採取を行なった。

#### 組織学的評価：

採取した皮膚皮下組織は、OCT コンパウンド(Sakura Finetek, Tokyo, Japan)に埋入し、液体窒素で凍結させて、 $8\mu\text{m}$  厚で切片を作成した。切片は 4%パラホルムアルデヒドで固定後、HE 染色と免疫染色を行ない、カメラ付き蛍光顕微鏡(BioZero, Keyance, Osaka, Japan)で観察および撮影した。局所投与されたヒト由来細胞の同定には、0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  メタノール溶液で 30 分間処理して内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化させた後、rabbit anti-human 58K Golgi protein (Abcam, Cambridge, UK)と donkey anti-rabbit IgG-horse radish peroxidase (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)で反応させて DAB 発色で可視化した。核染色にはヘマトキシリンを用いた。蛍光免疫染色には、1 次抗体として rabbit anti-human 58K Golgi protein、goat anti-human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)[血管内皮細胞マーカー] (Santa Cruz Biotechnology,

Santa Cruz, CA)を使用した。2次抗体として、donkey anti-rabbit IgG-Alexa568、donkey anti-goat IgG-Alexa488 (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いた。血管内皮細胞の染色に Alexa Fluor 488-conjugated isolectin GS-IB4 (Molecular Probes, Eugene, OR)を、核染色には Hoechst 33342 (Dojindo, Kumamoto, Japan)を用いた。

#### 統計学的解析：

結果は平均±標準偏差で表記した。2群間の比較には Student t 検定を用いた。多群間の比較には一元配置の分散分析後に Tukey 法による多重比較検定を用いた。ELISAの結果には二元配置の分散分析を行ない、交互作用を認めた項目に対しては Bonferroni 法にて単純主効果検定を行なった。両側検定で p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意とした。

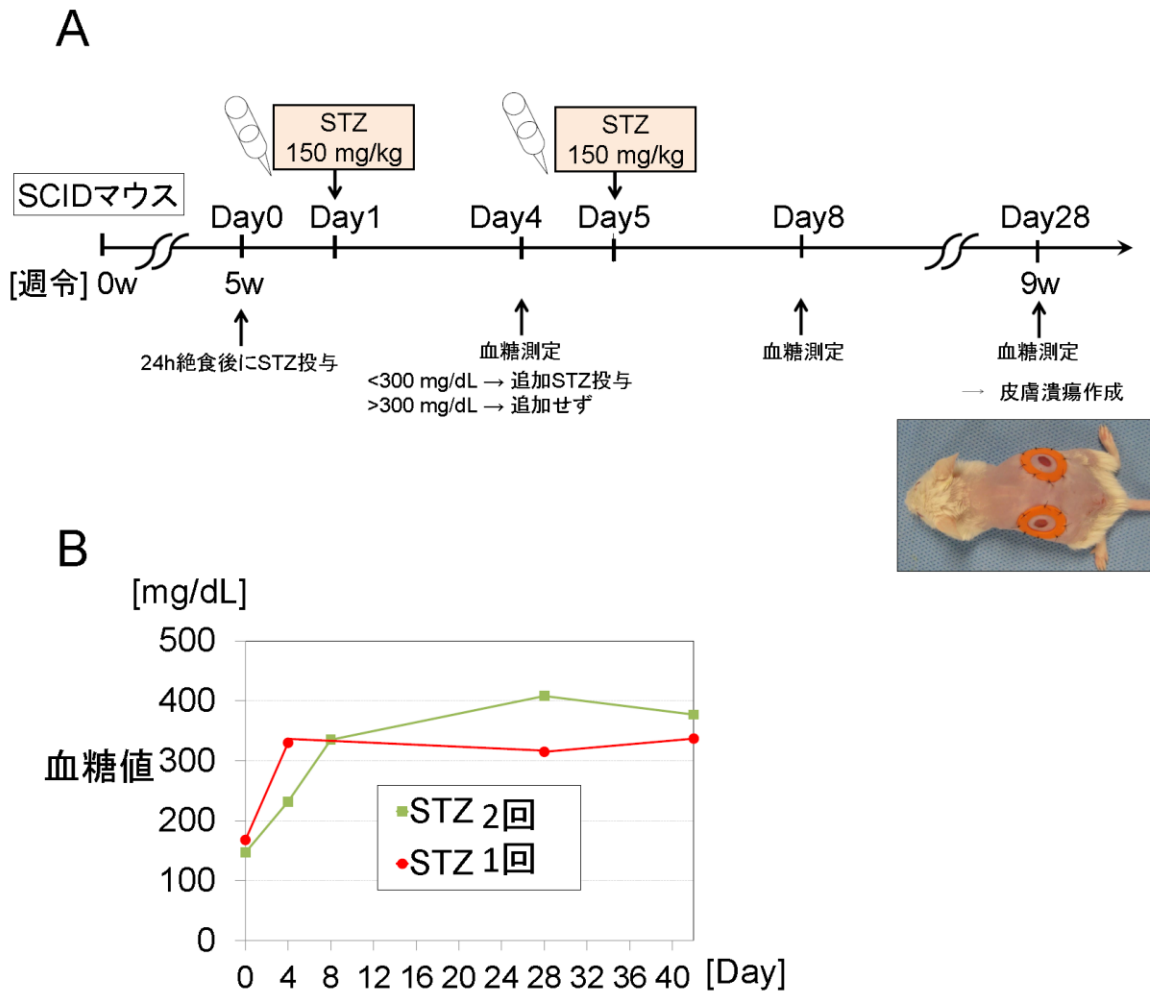


図 1：免疫不全糖尿病マウスの作成

(A) 免疫不全マウスへの高血糖誘発方法の概要。5 週令の免疫不全 SCID マウスを 24 時間絶食させ、STZ150mg/kg を投与した。投与 3 日後に血糖を測定し、300mg/dl 以上の場合には追加投与せず、それ以下の場合には追加 STZ150mg/kg を投与した。さらに 3 日後に血糖測定を行なった。高血糖状態の誘発に成功したマウスは投与 4 週後に皮膚潰瘍を作成し、創傷治癒検討の実験に用いた。

(B) STZ 投与による血糖値の推移の代表値。高血糖が 4 週以上継続していることが認められた。

## 結果

### (1) 培養 hASCs からの Muse 細胞の同定と分離

hASCs は健常成人から摘出した吸引脂肪組織から得られる SVF の培養過程で得られた。第 2 継代の培養 hASC には、フローサイトメトリー解析において SSEA-3 陽性細胞(Muse 細胞)が  $1.91 \pm 0.42\%$  含まれていた(図 2)。MACS を用いることで、分離陽性細胞を Muse-rich 群、分離陰性細胞を Muse-poor 群に分離回収することが出来、それぞれの細胞群を後述するマウス創傷治癒実験に用いた。Muse-rich 群では、 $77.1 \pm 14.35\%$  が SSEA-3 陽性であったのに対し、Muse-poor 群では  $1.20 \pm 0.6\%$  が SSEA-3 陽性であり、これは元の hASCs に近い細胞集団だと考えられた(図 2)。

### (2) 正常酸素濃度および低酸素濃度下における Muse 細胞のサイトカイン産生

Muse-rich 群と Muse-poor 群における培養 48 時間経過後のサイトカイン濃度を、正常酸素濃度(6% O<sub>2</sub>)および低酸素濃度(1% O<sub>2</sub>)の条件下で比較した(図 3)。6%の正常酸素濃度条件下で、Muse-rich 群は Muse-poor 群と比較し PDGF-BB、TGF-β、NGF-β、SCF、bFGF、TNF-α を有意に多く産生していた(F 値: PDGF-BB: 425.91、TGF-β: 589.15、NGF-β: 780.25、SCF: 462.90、bFGF: 271.10、TNF-α: 1494.22、自由度: 1)。加えて、PDGF-BB、VEGF、EGF、TGF-β、NGF-β、SCF、bFGF、TNF-α では、Muse-rich 群において 1%の低酸素濃度下で正常酸素濃度下よりも産生が亢進し、Muse-rich 群と 1%O<sub>2</sub>

での交互作用が認められた(F 値: VEGF: 8.59, EGF: 552.10, PDGF-BB: 735.48, NGF- $\beta$ : 913.60, SCF: 53.62, TNF- $\alpha$ : 6.26, bFGF: 616.75, TGF- $\beta$ : 339.73、自由度: 1)。



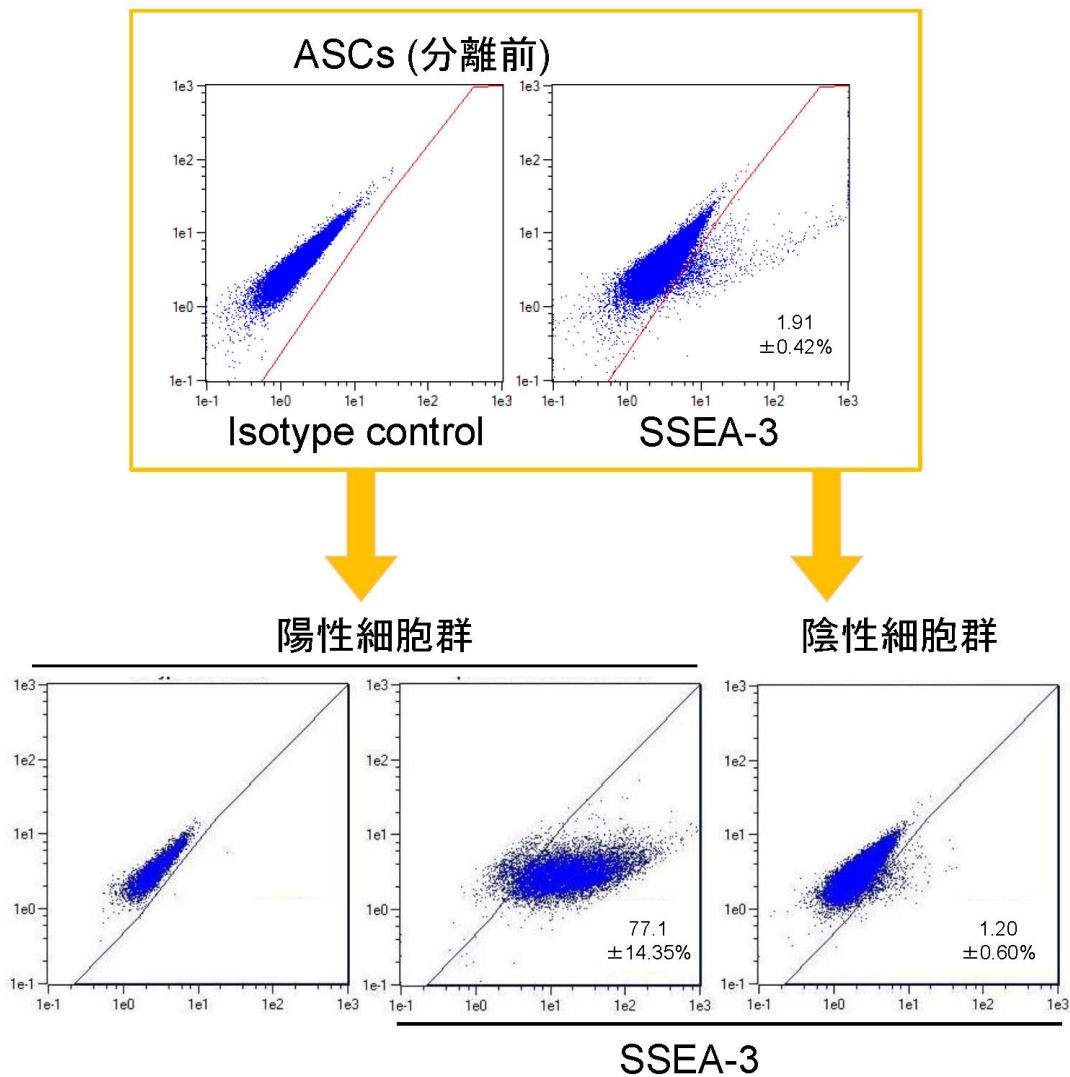


図 2 : MACS を用いた Muse 細胞濃縮前後における SSEA-3 陽性細胞のフローサイトメトリー解析

培養 ASCs は約 1-2% の SSEA-3 陽性細胞を有していた。SSEA-3 陽性細胞を濃縮する為に、MACS を用いて分離した(左下は陰性コントロール)。MACS 分離後の分離陽性細胞群と陰性細胞群は、それぞれ Muse-rich 群、Muse-poor 群として、続く実験に用いた。

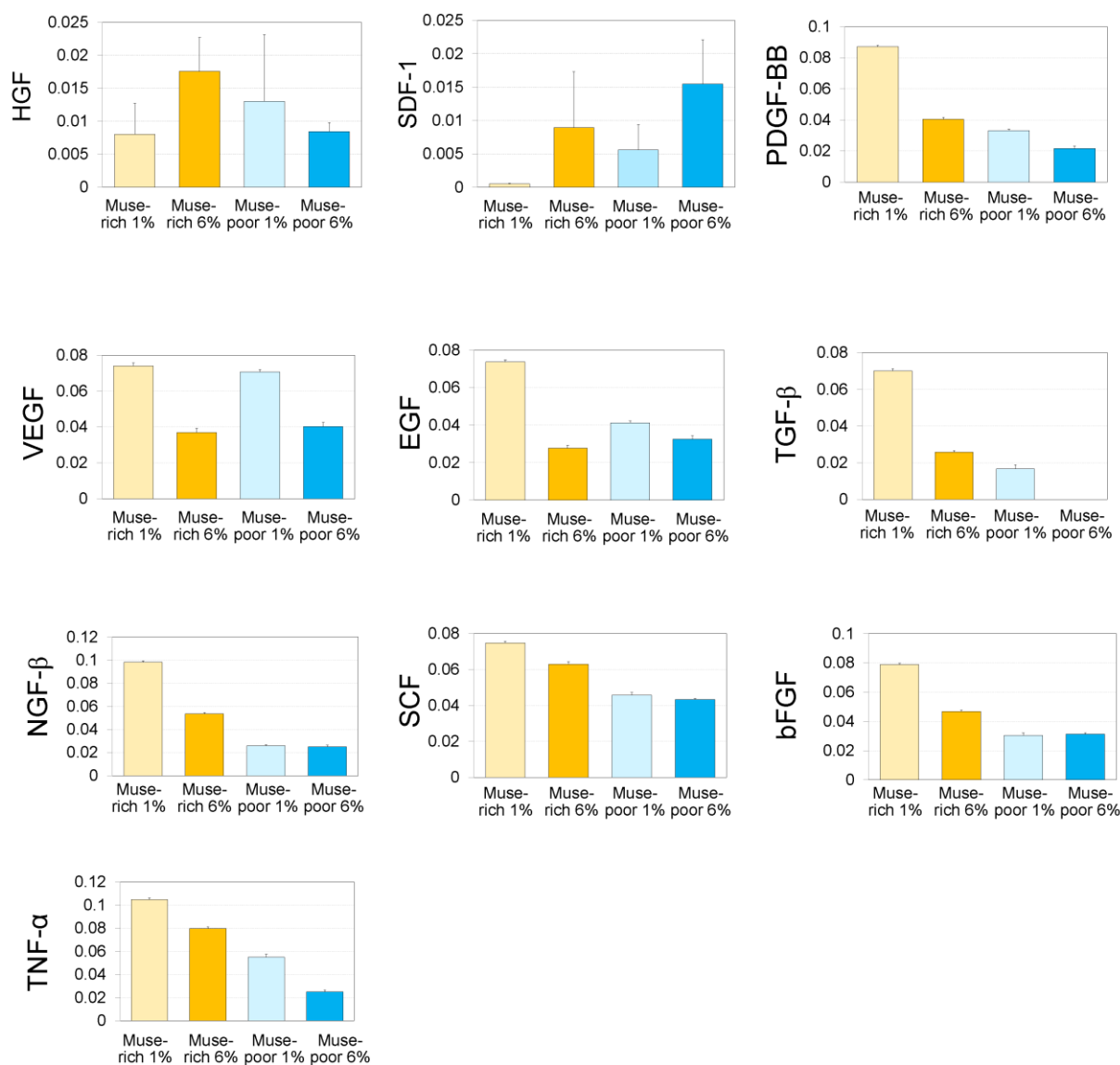


図 3: 低酸素濃度および正常酸素濃度下における Muse-rich 群と Muse-poor 群の増殖因子産生能の ELISA 解析

低酸素濃度(1% O<sub>2</sub>)および正常酸素濃度(6% O<sub>2</sub>)での 48 時間培養条件下における増殖因子産生量の相対値を ELISA 法で測定し、解析した(各群 n=3)。測定項目は HGF、SDF-1、PDGF-BB、VEGF、EGF、TGF-β、NGF-β、SCF、bFGF、TNF-α である。Y 軸は 450 nm 波長の吸光度を示している。各測定項目における酸素濃度と細胞種類の交互作用の検定結果を記す(F 値; HGF: 3.54, SDF-1: 339.74, PDGF-BB: 735.48, VEGF: 8.59, EGF: 552.10, TGF-β: 339.73, NGF-β: 913.60, SCF: 53.62, bFGF: 616.75, TNF-α: 6.26、自由度; 全項目: 1)。PDGF-BB、VEGF、EGF、TGF-β、NGF-β、SCF、bFGF、TNF-α では、Muse-rich 群において低酸素濃度条件下で産生が亢進し、両要因の交互作用が認められた。HGF では交互作用を認めず(p=0.09)、SDF-1 では負の交互作用を認めた。

### (3)遺伝子発現の比較

Muse-rich 群と Muse-poor 群における遺伝子発現の比較をマイクロアレイで行なった。遺伝子オントロジー解析において、両群の違いが示された。例えば、Blood vessel morphogenesis 関連遺伝子は Muse-rich 群で高発現し、mitotic cell cycle 関連遺伝子は Muse-poor 群で高発現していた。また、Muse-rich 群では、NANOG や Sox2 を含む多能性マーカーが高発現し(図 4)、過去の報告と同様であった[7]。さらに、Muse-rich 群では、SDF-1、PDGF-A、EGF、VEGF-A を含むサイトカイン/増殖因子が高発現していた。本研究で得られた全てのマイクロアレイデータは、National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database (Accession No. GSE55526) に収められている。

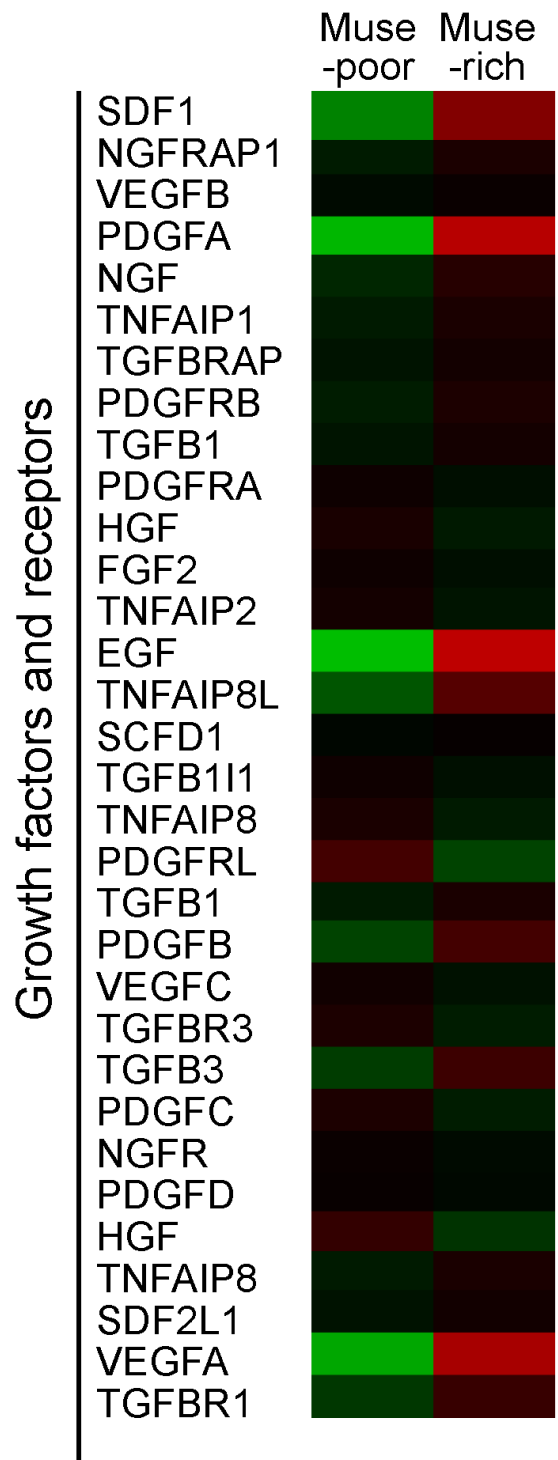
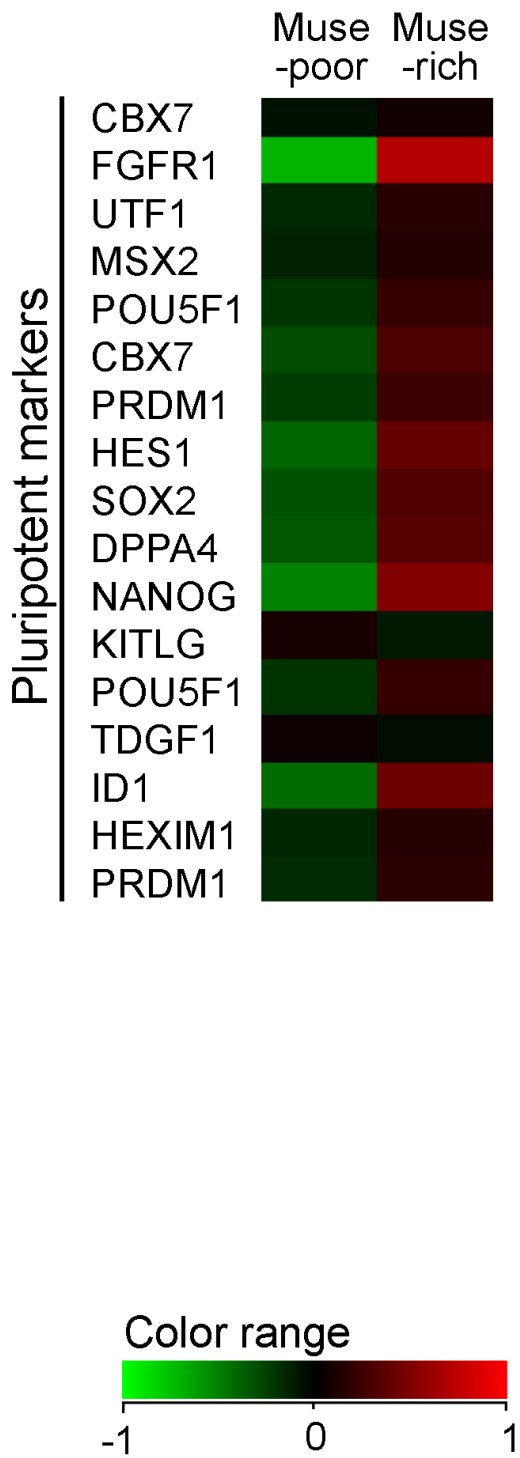


図 4 : Muse-rich 群と Muse-poor 群における遺伝子発現のマイクロアレイ解析  
多能性幹細胞マーカーと増殖因子・受容体におけるヒートマップを示す。NANOG や  
SOX2 を含む多能性幹細胞マーカーは Muse-rich 群で高発現を認めた。Muse-rich 群は  
PDGF-A、EGF、VEGF-A といった増殖因子遺伝子においても高発現を認めた。

#### (4)STZ 投与による DM-SCID マウスの作成

STZ は膵臓  $\beta$  細胞を傷害し、1 型 DM を引き起こすが、STZ の用量や投与方法については過去の報告で統一されていなかった[16][17][18]為、本研究でも検討を行なった。200mg/kg の STZ 投与を行なった所、SCID マウスは著明な体重減少と代謝異常をきたし、1 週以内の死亡が認められた。しかし、投与量を 150mg/kg に減量して 24 時間の絶食下に投与を行うと、高血糖状態(血糖値 300mg/dl 以上)が持続したまま 30 日以上の生存が認められた(図 1B)。DM-SCID マウスは、1 回の STZ 投与で 31%、2 回の STZ 投与で 44.8%が成功した。高血糖状態が 4 週継続した DM-SCID マウスを創傷治癒実験に用いた。

#### (5)DM-SCID マウスにおける細胞投与による創傷治癒効果

創傷治癒経過を図 5 に示す。Wild-type(WT)マウス(n=6)や非 DM-SCID マウス(n=6)と比較して、DM-SCID マウス(n=6)は有意に上皮化遅延が認められた。WT マウスと非DM-SCID マウスは、それぞれ day7 で  $56.9 \pm 12.0\%$ 、 $67.5 \pm 6.5\%$ に縮小したが、DM-SCID マウスは  $95.4 \pm 3.1\%$  であった(WT vs. DM-SCID;  $P < 0.0001$ )。Day14 においても、DM-SCID マウスは WT マウスや非 DM-SCID マウスと比較し、有意な上皮化遅延を認め、免疫不全動物の創傷治癒遅延モデルとして妥当であると考えられた。

次に、DM-SCID マウスの皮膚潰瘍に Muse-rich 群もしくは Muse-poor 群を局所投与した。その結果、Muse-rich 群を投与した DM-SCID マウス(n=6)は、Muse-poor 群を投

与した DM-SCID マウス(n=6)と比較して有意な上皮化促進が認められた。Day7 における創縮小は、Muse-rich 投与マウス  $51.05 \pm 7.2\%$ 、Muse-poor 投与マウス  $74.0 \pm 6.6\%$  であった( $P < 0.0001$ )。Muse-poor 群を投与した DM-SCID マウスにおいても、細胞非投与の DM-SCID マウスと比較して有意な上皮化促進効果を認めた。Muse-rich 投与マウスは、WT マウスと比較しても上皮化促進を認めた。ヒアルロン酸のみを投与しているコントロール群と比較し有意な上皮化促進効果が認められ、細胞投与による効果と考えられた。

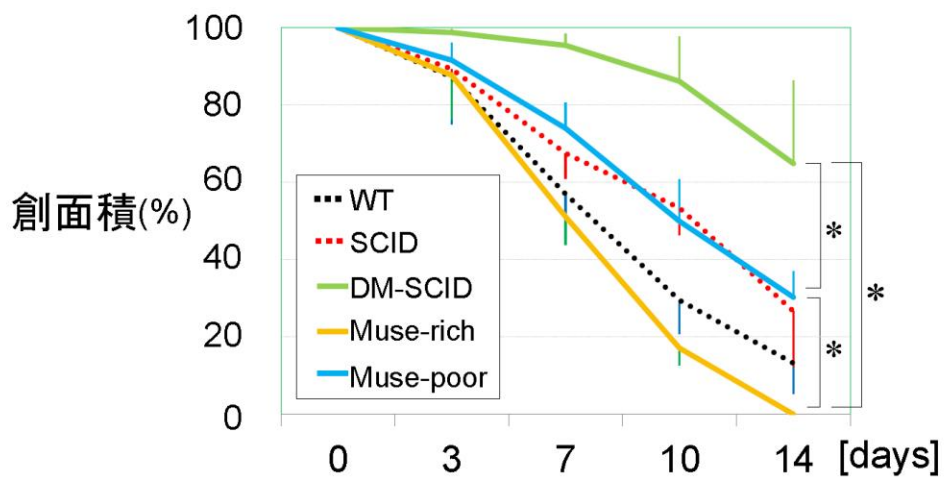
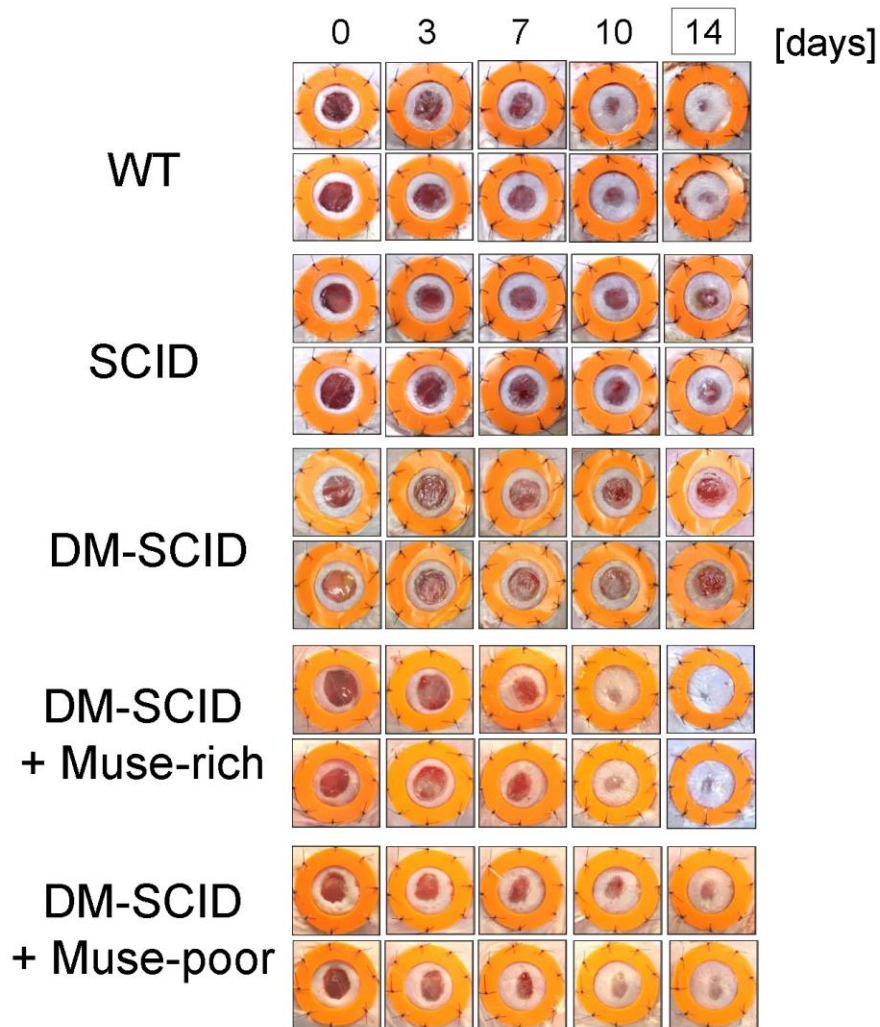




図 5 : 各マウス群における創傷治癒経過写真と総面積の経時的グラフ

直径 6mm 大の皮膚潰瘍の上皮化経過を 14 日間観察評価した。創面積は元の面積を 100%とし、縮小した割合をデジタルイメージソフトで解析し、経時的グラフに示している。DM-SCID マウスは WT マウスや SCID マウスと比較して有意な創傷治癒遅延を認めている。DM-SCID マウスに Muse-rich 群を投与したマウスは有意な上皮化促進を認めた。また、Muse-poor 群を投与した DM-SCID と比較しても有意な上皮化促進効果を認めている((各群 n=6). \*: P<0.05)。

## (6)投与したヒト由来細胞の免疫組織学的追跡

Muse-rich 群投与マウスおよび Muse-poor 群投与マウスの Day14 における皮膚皮下組織検体での免疫組織所見で、ヒトゴルジ体陽性細胞、つまり投与されたヒト由来細胞を創部位に認めた(図 6)。しかしながら、周囲の正常組織には認められなかった。

ヒトゴルジ体陽性細胞は、Muse-rich 群投与マウスの切片において、Muse-poor 群投与マウスの切片と比較して有意に多く認められた(Muse-rich:  $71.4 \pm 4.6$  cells/mm<sup>2</sup>, Muse-poor:  $34.2 \pm 4.6$  cells/mm<sup>2</sup> (P=0.0006))。また、表皮の厚さについても Muse-rich 群の方が有意に厚かった(Muse-rich:  $44.7 \pm 8.9$  μm, Muse-poor:  $33.7 \pm 9.5$  μm (P=0.0053))。真皮浅層ではヒトゴルジ体陽性細胞は PECAM-1 にも陽性であった(図 7)。PECAM-1 陽性細胞数は両群で有意差を認めなかった(Muse-rich:  $186.1 \pm 9.8$  cells/mm<sup>2</sup>, Muse-poor:  $156.7 \pm 13.9$  cells/mm<sup>2</sup> (P=0.144))が、ヒト由来細胞における PECAM-1 陽性細胞の割合は、Muse-rich 群で有意に高かった(Muse-rich:  $22.8 \pm 3.2$  %, Muse-poor:  $12.5 \pm 1.1$  % (P=0.02))。これらの結果から、投与された Muse 細胞は、真皮内に生着し、血管内皮細胞やその他の細胞へ分化していることが示唆された。

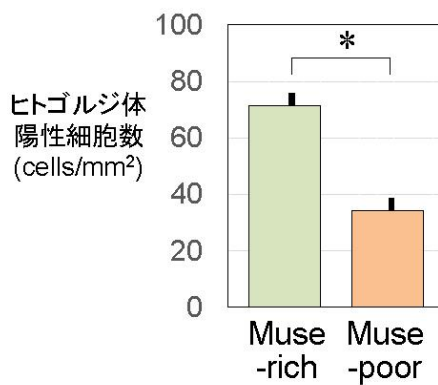
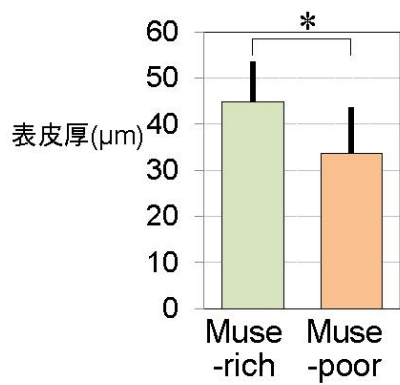
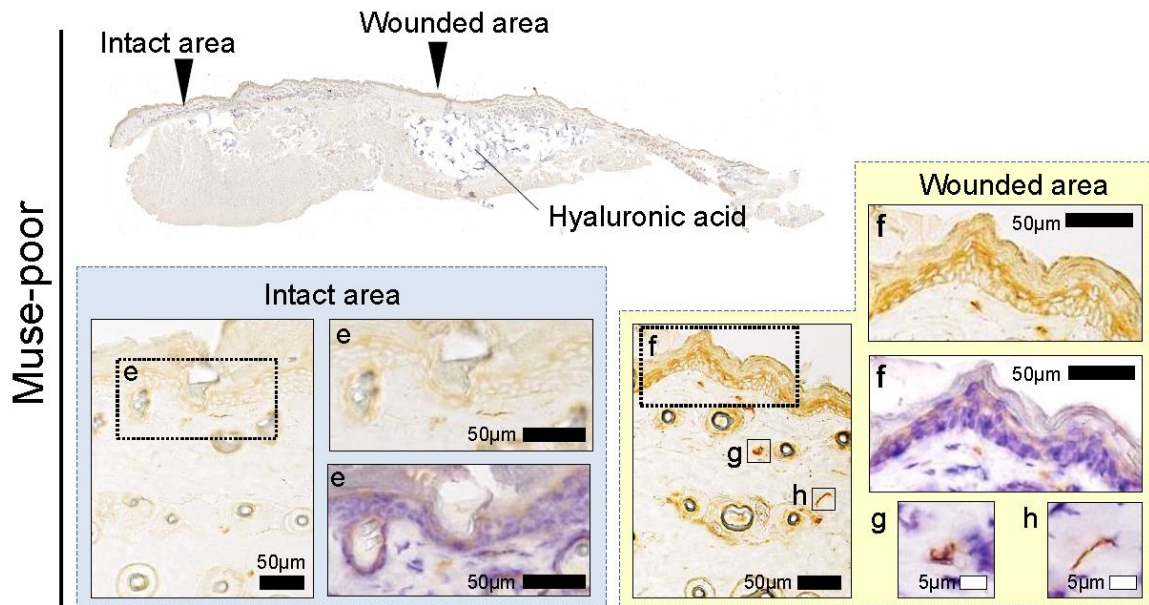
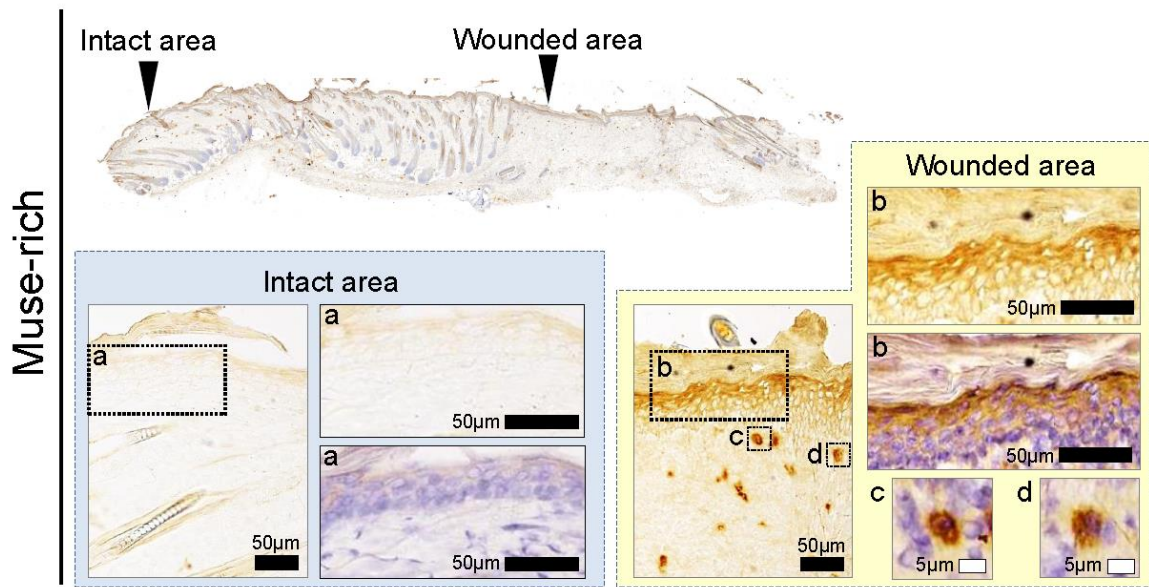


図 6 : Muse-rich 群もしくは Muse-poor 群を投与した DM-SCID マウスのヒトゴルジ体発現の免疫組織学的所見

(a) Muse-rich 群投与後の非創部（正常組織）における強拡大像、(b-d) Muse-rich 群投与後の創部における強拡大像。(e) Muse-poor 群投与後の非創部（正常組織）における強拡大像、(f-h) Muse-poor 群投与後の創部における強拡大像。ヒトゴルジ体陽性細胞は投与したヒト由来細胞と見なすことが出来、Muse-rich 群、Muse-poor 群双方において創周囲に陽性細胞を認めた。しかしながら、両群ともに非創部（正常組織）には認められなかった。投与したヒト由来細胞は、Muse-rich 群において有意に多く認められた(P=0.0006)。表皮厚は Muse-rich 群で有意に厚かった(P=0.0053)。(n=6,\*: p<0.05)

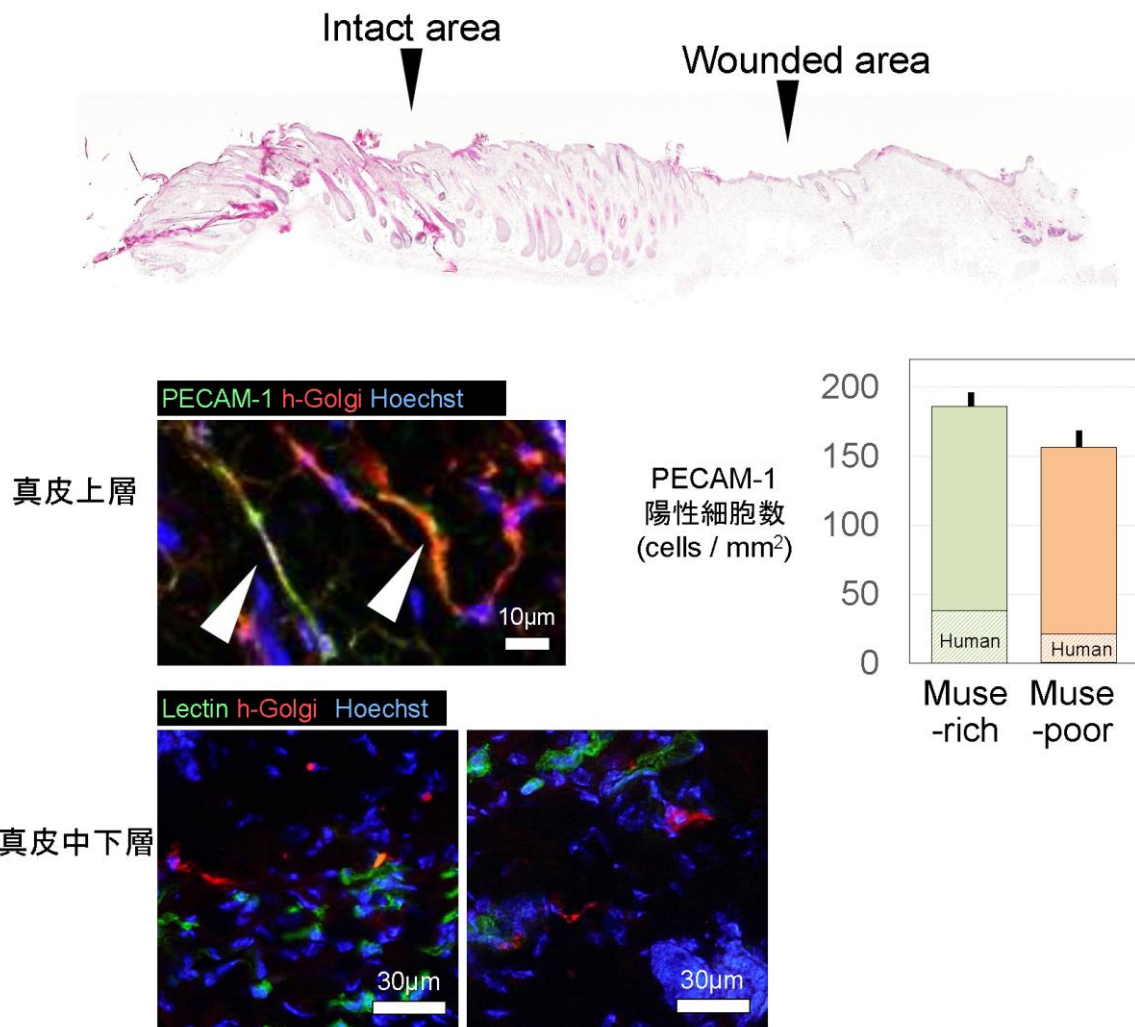


図7： Muse-rich 群を投与した DM-SCID マウスの免疫組織学的所見

ヒト特異的タンパク質(ヒトゴルジ体)と血管内皮細胞マーカー(PECAM-1 もしくは isolectin)による二重免疫組織染色を行なった。ヒトゴルジ体陽性細胞は PECAM-1 もしくは isolectin 陽性の細胞もあり、血管内皮細胞へも分化していることが示唆された。PECAM-1 陽性細胞数は Muse-rich 群および Muse-poor 群において有意差はなかった ( $p=0.144$ )が、ヒト由来細胞は Muse-rich 群において有意に多かった( $p=0.02$ )。

## 考察

本研究において、我々は Muse 細胞の分離および濃縮に多能性幹細胞マーカー SSEA-3 を用いた。過去の報告でも Muse 細胞はヒト脂肪組織から得られており、(adipose Muse[11]や Muse-AT[10]と呼称され、我々は Muse ASC と呼称する。)得られた細胞は CD105 も陽性で、単一細胞から三胚葉系への分化を認めている[11]。加えて、ヒト真皮線維芽細胞からも Muse 細胞は SSEA-3 のみで十分に分離が可能であり、ほぼ全ての真皮線維芽細胞由来の Muse 細胞が CD105 陽性であった[7][13]と報告されていることから、我々の Muse ASC も同様の細胞集団と考えられる。過去の報告では、Muse 細胞の分離に fluorescence-activated cell sorting (FACS) やストレス負荷を用いていた[7][10][13][19][20][21]が、我々は auto MACS を用いて濃縮分離に成功した。前実験として、抗体反応および回収プログラムの最適化を図り、高純度で回収する方法を確立した。回収プログラムは、ゆっくりと磁場を二度通して稀少細胞に適したプログラムを採用した。MACS での Muse 細胞分離は、完全ではない(90%)が、簡便であり、短時間で大量の細胞を処理出来る上、FACS やストレス負荷での方法に劣らない純度を得られる為、最も実用的な方法であると考えられる。Muse 細胞は、最初にストレス耐性細胞として発見された[7]が、ストレス負荷をかけなくても SSEA-3 陽性細胞として分離すれば同様の細胞集団を得られることが報告された[11][13]。しかしながら、十分量の Muse 細胞を培養増幅するのは未だ困難で、本研究においても、数百枚単位のディッシュを用いて hASCs の接着培養を行ない、実験に必要な量の Muse 細胞を確保

した。効率的に培養増幅する方法の開発が実用化に向けて望まれる。

本研究において、Muse-ASC 細胞は、非 Muse-ASC (hASCs とほぼ同等と考えられる。)と比較し、糖尿病マウスの難治性皮膚潰瘍における上皮化促進に有用であった。加えて、Muse-rich 群を投与された皮膚潰瘍の上皮化後の表皮は、Muse-poor 投与群のそれのよりも重層化していた。また WT の非糖尿病マウスと比較しても早期の上皮化を認め、ヒト由来の Muse 細胞の効果を調べる為、我々は免疫不全 SCID マウスを用いた。さらに、難治性潰瘍モデルを得るために、STZ を用いて糖尿病を誘発させた。このマウスモデルは、非 DM-SCID と比較し創傷治癒遅延を認め、難治性潰瘍モデルとして妥当であると考えられた。本研究で確立した DM-SCID 作成プロトコールは、約 75% で高血糖の誘発に成功し、高血糖状態は 1 年以上も持続していたことから、免疫不全マウスの糖尿病モデルとして有用であり、他の実験でも活用が期待される。

Muse 細胞の全身投与(静脈注射)による効果の報告はされている[7][9]が局所投与による報告は我々が初めてであり、不必要な細胞遊走を避け、細胞濃度を保つ為にヒアルロン酸を足場として用いた。投与物は、組織学的にも創部周囲の皮下組織に認められ、留まっていることが確認された。ヒアルロン酸は、細胞投与の際の足場や担体として用いられているが、その形態(架橋もしくは非架橋)および濃度については議論の余地があり、今後のさらなる最適化が望まれる[22][23][24]。

Muse 細胞の創傷治癒促進効果についてはさらなる解明の余地があるが、本研究において、Muse-poor 群の hASCs においても DM-SCID の創傷治癒を促進したが、Muse

細胞はさらに組織修復における効果を示し、SSEA-3 陽性の Muse ASC は、治療の可能性を秘めた選ばれた hASCs であると考えられた。本研究の組織学的所見において、Muse-rich hASCs は、修復された真皮に認められており、血管内皮細胞として同定されるものもあった。Muse 細胞の増殖能は高くないが、腫瘍性増殖をしない多能性幹細胞としての性質は臨床的にも有用であると考えられ[7][10][11][19]、我々の結果もそれを支持するものであった。

hASCs は傷害部位に遊走し、創傷治癒過程の炎症期および増殖期に必要な PDGF、bFGF、TGF- $\beta$ 、VEGF を含む増殖因子を分泌することが知られている[25][26][27][28]。我々が行なったマイクロアレイ結果においても PDGF-A, EGF, SDF-1 が Muse-rich 群で高発現していた。加えて、NANOG を含む多能性幹細胞マーカーが高発現していることは Muse 細胞の多分化能を示唆している。ELISA 法の結果でも Muse 細胞は PDGF-BB、TGF- $\beta$ 、bFGF、TNF- $\alpha$  を含む増殖因子の分泌を、非 Muse 細胞に比して多く認め、特に低酸素濃度条件下(1% O<sub>2</sub>)でさらに多く分泌されていた。PDGF-BB、TGF- $\beta$ 、bFGF は創傷治癒過程における最初の凝固期に含まれ、続く一連の治癒過程を促進する[29]ことが知られている一方で、TNF- $\alpha$  は急性炎症期に放出され、炎症反応カスケードの引き金になる[30][31]。TNF- $\alpha$  欠損マウスは背部皮膚全層欠損創の上皮化遅延が認められ[32]、TNF- $\alpha$  は創傷治癒に欠かせない因子[33][34]であることが分かる。これらの結果を統合すると、Muse 細胞は低酸素などのストレス条件下でさらなる機能を発揮し、増殖因子の分泌を介したり、細胞の一部が傷害部位の細胞へ分化したりすること



で、創傷治癒に寄与すると考えられた。本研究で用いた糖尿病皮膚潰瘍は虚血や慢性炎症状態の難治性潰瘍であり、幹細胞の減少が想定されることから、Muse 細胞がより効果を発揮する対象として有用であると考えられた。

本研究では、hASCs から分離した Muse 細胞が DM に伴う難治性皮膚潰瘍の治療に有用であることが示され、幹細胞が枯渇した組織や虚血状態の組織の治療ツールとして臨床応用の可能性が示唆された。また、脂肪組織は生体内に豊富に存在するうえ、採取に伴う負担が小さいため、皮膚や内臓組織と比較して、成人幹細胞の供給源として実用的であると考えられる。hASCs は高血糖の改善[35]や免疫調整機能[36]といった様々な DM 病態での治療の有用性が報告されている。hASCs は骨髄由来 MSC と共通する生物的特徴や機能が示されており[27][37]、最近の報告によると、hASCs やその他の組織に存在する MSC は骨髄由来の幹細胞/前駆細胞から供給される[38][39]と考えられている。骨髄は幹細胞/前駆細胞の供給元として中心的存在であり、末梢臓器の傷害時にこれらの細胞を傷害部位へ遊走させる。これらの事実を踏まえると、骨髄由来細胞の使用は骨髄に侵襲を加えなければならない為、最小限にした方が良いことが示唆される。一方、hASCs は、骨髄に侵襲を加える必要はなく、脂肪組織に最小限の侵襲を加えるだけで多量の細胞を得ることが出来る為、Muse ASC はその点でも将来的な臨床応用に有用であると考えられた。

## 引用文献

- [1] Y. Kuroda, M. Kitada, S. Wakao, and M. Dezawa, “Bone marrow mesenchymal cells: How do they contribute to tissue repair and are they really stem cells?,” *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 59, pp. 369–378, 2011.
- [2] B. E. Petersen, W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. M. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs, J. S. Greenberger, and J. P. Goff, “Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells,” *Science*, vol. 284, pp. 1168–1170, 1999.
- [3] R. G. Harris, E. L. Herzog, E. M. Bruscia, J. E. Grove, J. S. Van Arnam, and D. S. Krause, “Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia,” *Science*, vol. 305, pp. 90–93, 2004.
- [4] G. Ren, X. Chen, F. Dong, W. Li, X. Ren, Y. Zhang, and Y. Shi, “Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 1, pp. 51–58, 2012.
- [5] Y. Amoh, L. Li, K. Katsuoka, S. Penman, and R. M. Hoffman, “Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, pp. 5530–5534, 2005.
- [6] J. G. Toma, M. Akhavan, K. J. Fernandes, F. Barnabé-Heider, A. Sadikot, D. R. Kaplan, and F. D. Miller, “Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, pp. 778–784, 2001.

- [7] Y. Kuroda, M. Kitada, S. Wakao, K. Nishikawa, Y. Tanimura, H. Makinoshima, M. Goda, H. Akashi, A. Inutsuka, A. Niwa, T. Shigemoto, Y. Nabeshima, T. Nakahata, Y.-I. Nabeshima, Y. Fujiyoshi, and M. Dezawa, “Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, pp. 8639–8643, 2010.
- [8] Z. Yang, J. Liu, H. Liu, M. Qiu, Q. Liu, L. Zheng, M. Pang, F. Quan, and Y. Zhang, “Isolation and characterization of SSEA3(+) stem cells derived from goat skin fibroblasts.,” *Cell. Reprogram.*, vol. 15, pp. 195–205, 2013.
- [9] S. Wakao, M. Kitada, Y. Kuroda, T. Shigemoto, D. Matsuse, H. Akashi, Y. Tanimura, K. Tsuchiyama, T. Kikuchi, M. Goda, T. Nakahata, Y. Fujiyoshi, and M. Dezawa, “Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, pp. 9875–9880, 2011.
- [10] S. Heneidi, A. A. Simerman, E. Keller, P. Singh, X. Li, D. A. Dumesic, and G. Chazenbalk, “Awakened by Cellular Stress: Isolation and Characterization of a Novel Population of Pluripotent Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue,” *PLoS One*, vol. 8, 2013.
- [11] F. Ogura, S. Wakao, Y. Kuroda, K. Tsuchiyama, M. Bagheri, S. Heneidi, G. Chazenbalk, S. Aiba, and M. Dezawa, “Human adipose tissue possesses a unique population

of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine.,” *Stem Cells Dev.*, vol. 23, pp. 717–728, 2014.

[12] K. Yoshimura, T. Shigeura, D. Matsumoto, T. Sato, Y. Takaki, E. Aiba-Kojima, K. Sato, K. Inoue, T. Nagase, I. Koshima, “Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates.,” *J Cell Physiol.*, vol. 208, no. 1, pp. 64–76, 2006.

[13] K. Tsuchiyama, S. Wakao, Y. Kuroda, F. Ogura, M. Nojima, N. Sawaya, K. Yamasaki, S. Aiba, and M. Dezawa, “Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts.,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, pp. 2425–2435, 2013.

[14] R. D. Galiano, J. Michaels V, M. Dobryansky, J. P. Levine, and G. C. Gurtner, “Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing,” *Wound Repair Regen.*, vol. 12, pp. 485–492, 2004.

[15] O. M. Tepper, J. Carr, R. J. Allen, C. C. Chang, C. D. Lin, R. Tanaka, S. M. Gupta, J. P. Levine, P. B. Saadeh, and S. M. Warren, “Decreased circulating progenitor cell number and failed mechanisms of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  mediated bone marrow mobilization impair diabetic tissue repair,” *Diabetes*, vol. 59, pp. 1974–1983, 2010.

[16] R. E. Schmidt, D. A. Dorsey, L. N. Beaudet, K. E. Frederick, C. A. Parvin, S. B. Plurad, and M. G. Levisetti, “Non-obese diabetic mice rapidly develop dramatic sympathetic

neuritic dystrophy: a new experimental model of diabetic autonomic neuropathy.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 163, pp. 2077–2091, 2003.

[17] R. H. Lee, M. J. Seo, R. L. Reger, J. L. Spees, A. A. Pulin, S. D. Olson, and D. J. Prockop, “Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, pp. 17438–17443, 2006.

[18] R. E. Schmidt, K. G. Green, D. Feng, D. A. Dorsey, C. A. Parvin, J. M. Lee, Q. Xiao, and M. Brines, “Erythropoietin and its carbamylated derivative prevent the development of experimental diabetic autonomic neuropathy in STZ-induced diabetic NOD-SCID mice,” *Exp. Neurol.*, vol. 209, pp. 161–170, 2008.

[19] S. Wakao, H. Akashi, Y. Kushida, and M. Dezawa, “Muse cells, newly found non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues,” *Pathology International*, vol. 64, pp. 1–9, 2014.

[20] Y. Kuroda, S. Wakao, M. Kitada, T. Murakami, M. Nojima, and M. Dezawa, “Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells.,” *Nat. Protoc.*, vol. 8, pp. 1391–1415, 2013.

[21] T. Yamauchi, Y. Kuroda, T. Morita, H. Shichinohe, K. Houkin, M. Dezawa, and S. Kuroda, “Therapeutic Effects of Human Multilineage-Differentiating Stress Enduring (MUSE) Cell Transplantation into Infarct Brain of Mice,” *PLoS One*, vol. 10, p. e0116009,

2015.

[22] J. Kablik, G. D. Monheit, L. Yu, G. Chang, and J. Gershkovich, “Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers,” *Dermatologic Surg.*, vol. 35, pp. 302–312, 2009.

[23] Y. Itoi, M. Takatori, H. Hyakusoku, and H. Mizuno, “Comparison of readily available scaffolds for adipose tissue engineering using adipose-derived stem cells,” *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, vol. 63, pp. 858–864, 2010.

[24] Y. Açil, X. Zhang, T. Nitsche, B. Möller, V. Gassling, J. Wiltfang, and M. Gierloff, “Effects of different scaffolds on rat adipose tissue derived stroma cells,” *J. Cranio-Maxillofacial Surg.*, vol. 42, pp. 825–834, 2014.

[25] S. Maxson, E. A. Lopez, D. Yoo, A. Danilkovitch-Miagkova, and M. A. LeRoux, “Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair,” *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 1, pp. 142–149, 2012.

[26] D. G. Phinney and D. J. Prockop, “Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views,” *Stem Cells*, vol. 25, pp. 2896–2902, 2007.

[27] H. Mizuno, M. Tobita, and A. C. Uysal, “Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine,” *Stem Cells*, vol. 30, pp. 804–810, 2012.

[28] M. B. Murphy, K. Moncivais, and A. I. Caplan, “Mesenchymal stem cells:

environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 45, p. e54, 2013.

[29] H. Eto, H. Suga, K. Inoue, N. Aoi, H. Kato, J. Araki, K. Doi, T. Higashino, and K. Yoshimura, “Adipose injury-associated factors mitigate hypoxia in ischemic tissues through activation of adipose-derived stem/progenitor/stromal cells and induction of angiogenesis,” *Am. J. Pathol.*, vol. 178, pp. 2322–2332, 2011.

[30] D. P. Mooney, M. O’Reilly, and R. L. Gamelli, “Tumor necrosis factor and wound healing,” *Ann. Surg.*, vol. 211, pp. 124–129, 1990.

[31] N. J. Salomon GD, Kasid A, Cromack DT, Director E, Talbot TL, Sank A, “The local effects of cachectin/tumor necrosis factor on wound healing,” *Ann Surg.*, vol. 214, no. 2, pp. 175–180, 1991.

[32] M. Shinozaki, Y. Okada, A. Kitano, K. Ikeda, S. Saika, and M. Shinozaki, “Impaired cutaneous wound healing with excess granulation tissue formation in TNFalpha-null mice,” *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 301, pp. 531–537, 2009.

[33] S. C. Heo, E. S. Jeon, I. H. Lee, H. S. Kim, M. B. Kim, and J. H. Kim, “Tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing through paracrine mechanisms,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 131, pp. 1559–1567, 2011.

[34] Y. W. Kwon, S. C. Heo, G. O. Jeong, J. W. Yoon, W. M. Mo, M. J. Lee, I.-H. Jang, S.

M. Kwon, J. S. Lee, and J. H. Kim, "Tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1832, pp. 2136–2144, 2013.

[35] T. M. Kono, E. K. Sims, D. R. Moss, W. Yamamoto, G. Ahn, J. Diamond, X. Tong, K. H. Day, P. R. Territo, H. Hanenberg, D. O. Traktuev, K. L. March, and C. Evans-Molina, "Human adipose-derived stromal/stem cells protect against STZ-induced hyperglycemia: Analysis of hASC-derived paracrine effectors," *Stem Cells*, vol. 32, pp. 1831–1842, 2014.

[36] Ê. J. Bassi, P. M. M. Moraes-Vieira, C. S. R. Moreira-Sá, D. C. Almeida, L. M. Vieira, C. S. Cunha, M. I. Hiyane, A. S. Basso, A. Pacheco-Silva, and N. O. S. Câmara, "Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes," *Diabetes*, vol. 61, pp. 2534–2545, 2012.

[37] P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz, and M. H. Hedrick, "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.," *Tissue Eng.*, vol. 7, pp. 211–228, 2001.

[38] G. J. Hausman and D. B. Hausman, "Search for the preadipocyte progenitor cell," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, pp. 3103–3106, 2006.

[39] H. Eto, H. Ishimine, K. Kinoshita, K. Watanabe-Susaki, H. Kato, K. Doi, S. Kuno, A. Kurisaki, and K. Yoshimura, "Characterization of human adipose tissue-resident hematopoietic cell populations reveals a novel macrophage subpopulation with CD34



expression and mesenchymal multipotency.” *Stem Cells Dev.*, vol. 22, pp. 985–997, 2013.

## 謝辞

本研究において、東京大学医学部形成外科の吉村浩太郎先生には具体的な研究の立案から論文執筆に至るまでのご指導、ご鞭撻を頂きましたことに深く感謝の意を表します。光嶋勲先生には、指導教官として研究にご理解、ご支援をいただきました。産業技術総合研究所の栗崎晃先生、石嶺久子先生には研究内容につきまして貴重なご助言を頂きました。

研究室で共に仕事をしてまいりました東京大学医学部形成外科の青井則之先生、加藤晴之輔先生、土居健太郎先生、荒木淳先生、久野慎一郎先生、峯田一秀先生、金山幸司先生、増子貴宣先生には、様々な実験のご指導・ご協力を頂きました。更に、実験助手の佐藤綾子氏、西出朱美氏には実験において多大なるご協力を頂きました。非常に多くの方々に支えられ、この研究を行なうことが出来ましたことを有難く感じています。この場をお借りして改めて皆様に心より感謝の意を表したいと思います。