

氏 名	もり まさ のり 森 正 徳
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 697 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	慢性放射線皮膚障害に対する血管内皮前駆細胞を用いた再生医療
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 小宮根 真 弓 (委 員) 教 授 高 橋 將 文 教 授 山 本 直 人

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

患者の QOL が重視される現代医療において放射線治療を受ける患者数は増加傾向であるが、副作用である放射線障害に悩む患者もまた増加している。慢性放射線障害の実態は、組織の萎縮、線維化、虚血であり、それらに伴う組織予備能の低下である。皮膚では最終的には慢性放射線皮膚潰瘍として顕在化する。

放射線潰瘍に対しては、現在のところ根本的な治療法は存在しておらず、軟膏処置などの保存療法が延々と続けられるか、採取部位の犠牲を伴う皮弁手術などにより切除再建が行われている。こうした中で近年、放射線潰瘍に対する自家脂肪組織移植による良好な臨床結果や、動物実験での脂肪組織由来幹細胞（ASC）移植による良好な結果が報告されてきている。また、ASC と血管内皮細胞（EC）を併用投与することによりさらなる治療効果が得られたとの報告もある。しかしながら、EC はこれまで血管や骨髄からしか採取する方法が確立されておらず、これらの貴重な組織を再生医療の原料として用いることは難しかった。

そこで当研究室では脂肪組織から脂肪組織由来血管内皮前駆細胞（AEPC）を純化培養する方法を確立した。これにより、今後は脂肪組織というひとつのドナーから ASC と AEPC の両方を同時に獲得することが可能となった。

私たちは、AEPC 投与が放射線潰瘍に対して治療効果を示すこと、および AEPC と ASC の併用投与により ASC 単独投与よりも高い治療効果を示すことを仮定した。本研究は、ヌードマウスモデルを用いてこれらの評価を行うことを目的とした。

### 2 研究方法

7 週齢オスのヌードマウスを使用し、コントロール群を含めて 7 つの実験群（非照射群：放射線非照射、細胞投与なし、6 匹／ビークル群：40 Gy 照射、ビークル投与、7 匹／ASC 群：40 Gy 照射、ASC ( $1 \times 10^5$ ) 投与、4 匹／AEPC-1 群：40 Gy 照射、AEPC ( $2 \times 10^5$ ) 投与、4 匹／AEPC-2 群：40 Gy 照射、AEPC ( $5 \times 10^5$ ) 投与、5 匹／AEPC/ASC-1 群：40 Gy 照射、AEPC ( $2 \times 10^5$ ) + ASC ( $1 \times 10^5$ ) 投与、4 匹／AEPC/ASC-2 群：40 Gy 照射、AEPC ( $5 \times 10^5$ ) + ASC ( $1 \times 10^5$ ) 投与、5 匹) に分けて実験を行った。ASC と AEPC は、当科にて脂肪吸引の手術を行った女性から採取された吸引脂肪組織から純化培養したものを使用した。イソフルラン吸入麻酔下背部皮

膚に1回あたり5 Gyを週に2回、合計40 Gyを照射した。非照射群では、放射線照射を行わずに同条件にてイソフルラン吸入麻酔のみを行った。一連の放射線照射が終了して12週間後に、放射線照射部皮膚から6 mm径の生検パンチを用いて皮膚を採取し、径6 mmの皮膚欠損創を作成した。非照射群以外のマウスでは、創縁皮下に4方向に分けて計100  $\mu$ Lの試料（細胞を0.2%ヒアルロン酸含有DMEM:F-12培地に懸濁。ビークル群では培地のみ）を30 G針にて注射した。1週間に2回創部の写真を撮影し、写真の画像解析を行って創傷面積を算出した。創部が上皮化するまでに要した日数も記録した。創傷面積と上皮化日数は、ビークル群・AEPC-1群・AEPC-2群間およびASC群・AEPC/ASC-1群・AEPC/ASC-2群間でそれぞれ比較を行った（Tukey 多重比較検定）。創傷作成後28日目にすべてのマウスを安楽死させ、8 mm径の生検パンチを用いて創部皮膚を採取した。

創傷作成時の皮膚サンプルを用いて、放射線非照射皮膚と放射線照射皮膚の表皮層、真皮層、皮下脂肪層それぞれの厚みの比較を行った（t-test）。創傷作成後28日目の皮膚サンプルに対して、ヒトゴルジと von Willebrand 因子に対するDAB染色を行った。創部組織の血管密度を、ビークル群をコントロールとしてDunnett 多重比較検定を行った。

### 3 研究成果

AEPC-1群（11日目： $6.0 \pm 3.6\%$ 、14日目： $1.5 \pm 3.3\%$ ）とAEPC-2群（11日目： $9.6 \pm 2.2\%$ 、14日目： $0.5 \pm 0.4\%$ ）は、創傷作成後11日目と14日目の時点でビークル群（11日目： $14.8 \pm 1.5\%$ 、14日目： $6.9 \pm 2.4\%$ ）と比較して有意に創傷面積が小さかった（全て  $p < 0.01$ ）。AEPC/ASC-2群は、創傷作成後7日目の時点でASC群と比較して有意に創傷面積が小さかった（ $25.8 \pm 9.8$  vs  $41.2 \pm 6.2\%$ ,  $p = 0.04$ ）。創傷作成後18日目にはビークル群以外の群のマウスはすべて上皮化が完了しており、25日目にビークル群のマウスもすべて上皮化が完了した。AEPC-1群（ $15 \pm 2$  日）とAEPC-2群（ $17 \pm 2$  日）はビークル群（ $23 \pm 3$  日）と比較して上皮化日数が有意に短かった（すべて  $p < 0.01$ ）。また、AEPC/ASC-1群（ $14 \pm 0$  日）とAEPC/ASC-2群（ $14 \pm 0$  日）もASC群（ $17 \pm 2$  日）と比較して有意に短かった（すべて  $p < 0.01$ ）。AEPC-1群とAEPC-2群の間（ $p = 0.34$ ）およびAEPC/ASC-1群とAEPC/ASC-2群の間（ $p = 1$ ）には有意差はみられなかった。

放射線照射皮膚の皮下脂肪層の厚み（ $128 \pm 60 \mu\text{m}$ ）は、放射線非照射皮膚の皮下脂肪層の厚み（ $350 \pm 80 \mu\text{m}$ ）と比較して有意に薄くなっていた（ $p < 0.01$ ）。表皮層の厚み（非照射： $26.7 \pm 7.9 \mu\text{m}$ 、照射： $29.8 \pm 6.4 \mu\text{m}$ ）と真皮層の厚み（非照射： $214 \pm 49 \mu\text{m}$ 、照射： $184 \pm 36 \mu\text{m}$ ）には有意差は見られなかった（表皮層： $p = 0.21$ 、真皮層： $p = 0.17$ ）。ヒトゴルジに対するDAB染色では、いずれのサンプルでも陽性細胞はみられなかった。Von Willebrand 因子に対するDAB染色では、非照射群（ $0.99 \pm 0.18 \times 10^{-5} \mu\text{m}^{-2}$ ）のみがビークル群（ $0.47 \pm 0.09 \times 10^{-5} \mu\text{m}^{-2}$ ）と比較して有意に血管密度が高かった（ $p = 0.02$ ）。

### 4 考察

本実験では、ヌードマウス背部の放射線照射皮膚（合計40 Gy）における直径6 mmの創傷治癒において、AEPC 単独投与（ $2 \times 10^5$  もしくは  $5 \times 10^5$ ）はビークル投与と比較して有意に創傷治癒を早めた。また、AEPC（ $2 \times 10^5$  もしくは  $5 \times 10^5$ ）とASC（ $1 \times 10^5$ ）の併用投与はASC 単独投与（ $1 \times 10^5$ ）と比較して有意に創傷治癒を早めた。いずれも、AEPCの投与量の違い（ $2 \times 10^5$  もし

くは  $5 \times 10^5$ ) による有意差はみられなかった。本モデルにおいて、AEPC の投与量は  $2 \times 10^5$  で十分以上であり、これ以上 AEPC の細胞数を増加させても治療効果は向上しないものと推測する。

本実験にて細胞投与後 28 日目の時点で創部に投与細胞の生着を確認することができなかったことは、本実験が異種移植実験であることが原因のひとつであると考ええる。また、本実験では移植床が放射線照射部であったことも、生着を確認することができなかった理由であると考ええる。

本実験において投与細胞の生着が確認できなかったにもかかわらず創傷治癒促進がみられたのは、投与細胞が分泌した液性因子による効果であると推察した。本実験において創傷組織の血管密度は、ピークル群と比較して非照射群のみが有意に高く、細胞投与群ではいずれも有意差はみられなかった。この結果については、いずれのサンプルも上皮化完了後の組織標本であり、創傷組織の血管密度と創傷治癒における血管新生スピードは必ずしも関連しないと考ええる。細胞投与群では、投与細胞により分泌された液性因子が消費されながら創傷治癒促進がもたらされたものの、投与細胞自体は生着できなかったために創傷組織の質の改善はそれほど得られなかったと推察する。一方、非照射群で創傷組織の血管密度が高かったことは、組織における幹細胞の機能差が創傷組織の質にも影響を与えることを示唆する。

本実験の結果をふまえると、AEPC や ASC の放出する液性因子のみでも創傷治癒促進を期待できることから、細胞投与だけではなく液性因子投与という治療方法も有効であると考ええる。実臨床において、液性因子治療は細胞治療と比較して、規制や製造上の問題やコストの面も含めて数多くの利点を有する。

本研究の次のステップはブタなどのより大きな実験動物を用いた自家移植実験であると考ええる。最終的な目標が臨床応用であることを考慮すると、採取脂肪から AEPC および ASC を純化培養するプロセスに用いるすべての薬品は、動物由来製剤を用いない GMP グレードに準拠したものを使用する必要がある。また、細胞治療と液性因子治療をそれぞれ最適化した上での比較検討も必要であると考ええる。

## 5 結論

本研究の結果から、放射線潰瘍に対して AEPC 投与、特に ASC との併用投与により創傷治癒が促進されることが分かった。本実験における創傷治癒促進は、投与細胞の生着によってではなく投与細胞が分泌する液性因子によってもたらされたものであることが示唆され、液性因子投与によっても同様の治療効果が得られる可能性もあると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本学位論文は、脂肪組織由来幹細胞 (ASC) 単独にくらべて脂肪組織由来血管内皮前駆細胞 (AEPC) を脂肪幹細胞に加えた群が、より放射線皮膚障害による創傷治癒を促進させることを明らかにした研究である。ASC と血管内皮前駆細胞 (EPC) の併用により治療効果が高まることはすでに報告されていた。また ASC と AEPC の基礎的な研究については先行する研究があった。本研究においては先行研究をベースに、血液や骨髄から採取した EPC でなく、脂肪組織から培養された AEPC を用いた点に独自性があり、ASC と併用することで放射線皮膚障害の治療に ASC 単独よりもより有効性が高いことを示した点に新規性がある。

血管内皮前駆細胞を ASC 併用とすることで治療効果が高まることは複数の論文で報告されていたが、脂肪細胞由来幹細胞から分化誘導した AEPC を ASC と併用することで、放射線皮膚障害の治療効果が高まることを示した点に独自性・新規性があり、学問的意義がある。脂肪組織由来の血管内皮前駆細胞は、採取・誘導が血液や骨髄から採取した細胞に比べて格段に容易であり、多量の細胞を得ることができるため、臨床的にも重要な意義がある。

皮膚障害に対する治療効果向上のメカニズムとして、本学位論文ではメカニズムの検討まではされていないが、EPC と ASC のこれまでの報告の内容から、VEGF 産生が亢進している可能性が推測されている。

改訂内容としては、本研究のバックグラウンドを詳しく記載すること、ASC と AEPC の相違、先行研究の内容、AEPC のみの群がないこと、AEPC の定義、標準偏差か標準誤差かの表記、グラフ、テーブルのデータの順番、グラフ内での有意差の表記、臨床で用いられている他の治療法との比較・関連付け、統計手法の記載等について修正が求められ、適切に修正された論文が提出された。

上記より、本学位論文を合格と判断した。

参考論文として、申請者が第一著者のもので、Sodium Alginate をフィラーとしたラットを用いた *in vivo* の研究論文が提出された。Sodium Alginate がフィラーとして適当であること、Sodium Alginate をフィラーとして用いる際の基礎的な条件設定についての研究論文であり、参考論文として適切と考える。

## 最終試験の結果の要旨

本学位論文は、脂肪組織由来幹細胞（ASC）単独にくらべて脂肪組織由来血管内皮前駆細胞（AEPC）を脂肪幹細胞に加えた群が、より放射線皮膚障害による創傷治癒を促進させることを明らかにした研究である。ASC と血管内皮前駆細胞（EPC）の併用により治療効果が高まることはすでに報告されていた。また ASC と AEPC の基礎的な研究については先行する研究があった。本研究においては先行研究をベースに、血液や骨髄から採取した EPC でなく、脂肪組織から培養された AEPC を用いた点に独自性があり、ASC と併用することで放射線皮膚障害の治療に ASC 単独よりもより有効性が高いことを示した点に新規性がある。

血管内皮前駆細胞を ASC と併用することで治療効果が高まることは複数の論文で報告されていたが、脂肪細胞由来幹細胞から分化誘導した AEPC を ASC と併用することで、放射線皮膚障害の治療効果が高まることを示した点に独自性・新規性があり、学問的意義がある。脂肪組織由来の血管内皮前駆細胞は、採取・誘導が血液や骨髄から採取した細胞に比べて格段に容易であり、多量の細胞を得ることができるため、臨床的な意義も重要である。

皮膚障害に対する治療効果向上のメカニズムとして、本学位論文ではメカニズムの検討まではされていないが、EPC と ASC のこれまでの報告の内容から、VEGF 産生が亢進している可能性が推測されている。

改訂内容としては、本研究のバックグラウンドを詳しく記載すること、ASC と AEPC の相違、先行研究の内容、AEPC のみの群がないこと、AEPC の定義、標準偏差か標準誤差かの表記、グラフ、テーブルのデータの順番、グラフ内での有意差の表記、臨床で用いられている他の治療法

との比較・関連付け、統計手法の記載等について修正が求められ、適切に修正された論文が提出された。

上記より、本学位論文を合格と判断した。

プレゼンテーションはわかりやすく、適切な言葉で、論理的に行われた。質疑応答もしっかりしており、研究内容について十分に適切な理解が示された。

上記学位論文の内容とプレゼンテーションの内容を総合して、最終試験に合格と判断した。