

令和5年2月3日

高濃度トレハロースを用いた新規培養技術により
創傷治癒を促す3次元培養“真皮シート”を開発
～難治性皮膚潰瘍に有効な世界初の再生医療製品として期待～

【今回の発見のポイント】

- ・ 深達性の皮膚潰瘍において、真皮側を迅速に再生させる治療法は未だ存在しない。
- ・ 高濃度トレハロースを培地に加えて線維芽細胞を培養すると、線維芽細胞を一時的に“創傷治癒促進作用があるセネッセンス様状態（Senescence-like State; SLS）”に誘導できることを世界で初めて発見した。
- ・ ヒト由来の線維芽細胞及びコラーゲンとこの培養技術を用いて作成した再生医療用製品である“真皮シート”は、動物実験の結果から実臨床でも高い創傷治癒効果が期待される。

【研究概要】

現在、深達性皮膚潰瘍の治癒に重要なステップである欠損した真皮側の迅速な再生を促進できる有効な治療法は存在しません。

愛媛大学大学院医学系研究科皮膚科学講座の武藤潤講師、藤澤康弘教授、佐山浩二名誉教授、愛知学院大学歯学部生化学講座の福田信治講師、および山口大学大学研究推進機構・遺伝子実験施設の水上市洋一教授らは、線維芽細胞を高濃度トレハロースで処理することにより、これまでに報告されたことのない“創傷治癒促進作用を有するセネッセンス様状態（Senescence-like State; SLS）”へ一時的に誘導できることを発見しました。

これまで愛媛大学皮膚科学講座の教室では、患者さん由来の自家細胞を3次元培養した真皮シートによる潰瘍治療を行ってきましたが、今回は線維芽細胞とコラーゲンを用いて作製する“真皮シート”に高濃度トレハロースを含有させる新たな方法で、高い創傷治癒効果が期待できる革新的な再生医療用製品を開発することができました。

本研究では、創傷治癒に有利に作用するSLSという革新的な現象が線維芽細胞で起きることを世界で初めて発見し、これが高濃度トレハロース処理で誘導できることを明らかにした重要な研究成果です。本研究によって、難治性潰瘍治療の発展に貢献することが期待されます。

本研究成果は、2023年1月6日 Communications Biology 誌（電子版）に掲載されました。

【研究内容】

糖尿病や静脈瘤などの末梢血流障害により生じる深達性皮膚潰瘍は非常に難治性で、疼

痛や感染など様々な合併症により世界中で多くの患者さんの生活の質を落とすだけでなく、多大な経済的損失を生じています。深達性の皮膚潰瘍治療において重要なステップである“欠損した真皮の迅速な再生”を有効に促進する治療法は現時点では存在しません。

武藤講師、藤澤教授、佐山名誉教授らは、福田講師、水上教授、愛媛大学プロテオサイエンスセンター細胞増殖・腫瘍制御部門の東山繁樹教授、および愛媛大学大学院医学系研究科分子病態医学講座の川上良介准教授と今村健志教授らとの共同研究により、線維芽細胞を高濃度トレハロースで処理する方法で、これまでに報告されたことのない“創傷治癒促進作用を有するセネッセンス様状態 (Senescence-like State; SLS)”へ一時的に誘導できることを発見しました。

高濃度のトレハロースで処理した真皮シート上で作製した表皮シートは、トレハロースを含有しない通常の表皮シート(対照)や低濃度のトレハロースで処理したシートと比較して有意に表皮の増殖が促進された結果、表皮シートのサイズが増大しました。なお、この皮膚シートには腫瘍性の増殖などの病理組織学的な異常はなく、細胞の遺伝子発現解析でもトレハロース処理群と対照群において有意な変化はみられませんでした。これらのことから、高濃度トレハロースで処理した真皮シートを使うことで安全に、そして迅速に3次元培養皮膚シートを作製することが可能であることが明らかになりました。

次に、高濃度トレハロースが表皮細胞の増殖を促進したメカニズムの解明のために、2次元および3次元で短期間培養した線維芽細胞を用いて、RNAシーケンストリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を施行した結果、線維芽細胞でDPTなど増殖因子群とCDKN1A/p21のmRNAレベルでの有意な増加がみられました。さらに、トレハロース処理した線維芽細胞において、セネッセンスでみられるLMNB1のmRNAと蛋白レベルの低下と β ガラクトシダーゼ陽性細胞の増加があり、セネッセンスと極めてよく類似した状態でした。また、siRNAによりCDKN1Aの発現を抑制すると、表皮細胞増殖促進作用が消失したことから、トレハロースがCDKN1A/p21依存性に創傷治癒を促進する増殖因子を発現亢進していることが分かりました。

以上より、線維芽細胞は高濃度トレハロース処理により一時的なSLSが誘導され、その結果3次元培養で迅速に皮膚シートを拡大させることが明らかとなりました。さらに、ヌードマウスを用いた動物実験において、この高濃度トレハロース含有真皮シートは対照群と比較して有意に高い創傷治癒促進作用を有することを明らかにしました。

【結論】

本研究では、高濃度トレハロースが線維芽細胞をSLSというこれまで報告されたことがない状態に誘導できるという画期的な発見と、その作用を利用した自家細胞由来真皮シートはこれまで治療に難渋していた深達性の潰瘍の治療に非常に有用である可能性を示すことが出来ました。本方法では自家細胞のみで作製可能なため、安全性における懸念も少ないという長所もあります。さらに、マウスを用いた動物実験により新規真皮シートの創傷治癒

促進作用が確認されたことから、この革新的な 3 次元培養“真皮シート”の早期の実用化が期待されます。

【支援】

本研究は、科学研究費助成事業及び学術変革領域研究（先端バイオイメージング支援プラットフォーム：ABiS）、日本医療研究開発機構（AMED）などの支援により施行されました。

【用語解説】

注1.トレハロース：グルコースが α, α -1,1-グルコシド結合してできた非還元性 2 糖で化学的に安定であり、乾燥などの環境ストレスから生物を守っていると考えられている。無脊椎動物や菌類等で多量に存在するが、脊椎動物で合成経路は見つかっていない。

注2.セネッセンス（Senescence; 細胞老化）：DNA 損傷応答などにおいて、安定的に細胞周期が停止した状態。老化細胞は細胞周期を再開できる休止期細胞とは異なる。また、加齢とは違う現象であり、細胞老化は発生や創傷治癒において重要な役割を担っている。細胞の種類によっては、老化は有益な場合があり、注目されている。

注3.真皮：表皮と皮下組織の間にある組織で線維芽細胞などの結合組織から構成される。

注4.CDKN1A/p21：サイクリン依存性キナーゼ阻害因子で細胞周期の調節因子として機能する。

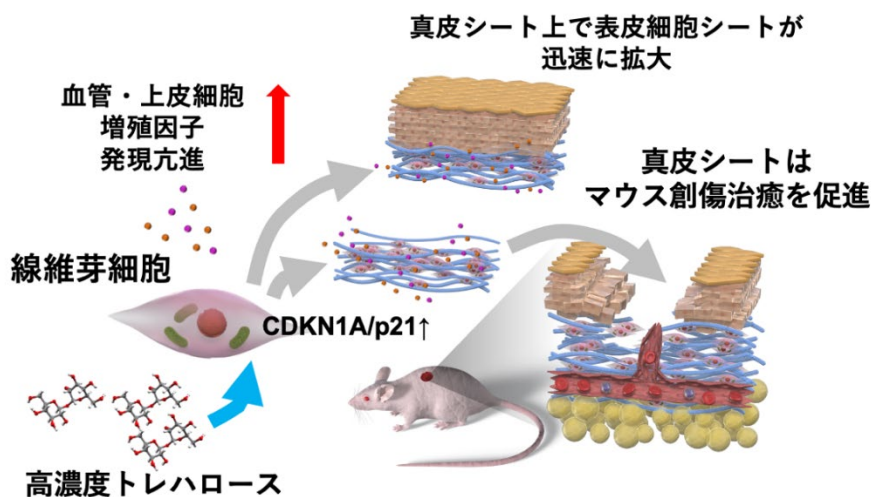


図1 高濃度トレハロースによる線維芽細胞の Senescence-like State 誘導作用を利用した真皮シートはマウスにおいて皮膚潰瘍の創傷治癒を促進する。

【論文情報】

掲 載 誌： Communications Biology

D O I： 10.1038/s42003-022-04408-3

T i t l e： Highly concentrated trehalose induces prohealing senescence-like state in fibroblasts via CDKN1A/p21

Authors： Jun Muto, Shinji Fukuda, Kenji Watanabe, Xiuju Dai, Teruko Tsuda, Takeshi Kiyoi, Kenji Kameda, Ryosuke Kawakami, Hideki Mori, Ken Shiraishi, Masamoto Murakami, Takeshi Imamura, Shigeki Higashiyama, Yasuhiro Fujisawa, Yoichi Mizukami, Koji Sayama

題 名： 高濃度トレハロースは線維芽細胞の創傷治癒促進作用を有する”Senescence-like state”に CDKN1A/p21 を介して誘導する

著 者： 武藤潤（愛媛大学）、福田信治（愛知学院大学）、渡邊健司（山口大学）、代 秀菊（愛媛大学）、津田照子（愛媛大学）、清井武志（金沢医科大学）、亀田健治（愛媛大学）、川上良介（愛媛大学）、森秀樹（愛媛大学）、白石研（愛媛大学）、村上正基（愛媛大学）、今村健志（愛媛大学）、東山繁樹（愛媛大学）、藤澤康弘（愛媛大学）、水上洋一（山口大学）、佐山浩二（愛媛大学）