第24回 日本抗加齢医学会総会　2024年5月31日~6月2日　熊本城ホール

P6-6

ヒト臍帯由来間葉系幹細胞培養上清液の皮膚科学的機能性の検討

Research on functionality for skin science of Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell Cultured Supernatant

○濱田恵介[1]　南一成[1]　鈴木寿紀[1]　大橋秀一[2]　上田向勇[2]　岩野英生[3]

1 Cell Exosome Therapeutics株式会社
2 株式会社エテルナム
3 株式会社テクノーブル　ライフサイエンス総合研究所

目的

ヒト幹細胞から得られる培養上清については、細胞分泌物由来のサイトカインやエクソソーム等を含み、血管新生や組織再生等の効果が期待されていることから、皮膚科学的な機能性についても検討が行われている。我々は特にヒト臍帯由来間葉系幹細胞（UCMSC）の効率的な培養方法、並びに安全性の高い専用培地による上清回収方法を検討した結果、従来の幹細胞培養上清よりも多くのサイトカインやエクソソームを含有する「ヒト臍帯由来間葉系幹細胞培養上清液」を開発した。この培養上清液について、今回皮膚科学的機能について研究を行い、知見が得られたので報告する。

試験方法

●表皮細胞賦活効果
表皮細胞NHEKを96ウェルプレートに播種し、1日培養後、サンプルの添加を行い、さらに2日間培養を行った。培養終了後、それぞれのプレートに対し、D-PBSを用いて1回洗浄し、Hoechst33342によるDNAの蛍光染色を行い、Ex=355nm、Em=460nmで蛍光強度の測定を行い、DNA量とした。さらにMTT試液を添加し、生成したホルマザンをイソプロパノールで溶解した後、ABS570nmを測定し、細胞の呼吸活性とした。

●線維芽細胞賦活効果
線維芽細胞NB1RGBを96ウェルプレートに播種し、1日培養後、サンプルの添加を行い、さらに3日間培養を行った。培養終了後、それぞれのプレートに対し、D-PBSを用いて1回洗浄し、Hoechst33342によるDNAの蛍光染色を行い、Ex=355nm、Em=460nmで蛍光強度の測定を行い、DNA量とした。さらにMTT試液を添加し、生成したホルマザンをイソプロパノールで溶解した後、ABS570nmを測定し、細胞の呼吸活性とした。

●線維芽細胞コラーゲン合成評価
線維芽細胞NB1RGBを96ウェルプレートに播種し、1日培養後、サンプルの添加を行い、さらに5日間培養を行った。培地を除いた後、シリウスレッドによる細胞内コラーゲンの染色を行った。精製水で洗浄後、シリウスレッドの抽出を行い、540nmにおける吸光度の測定を行い、コラーゲン量とした。

●線維芽細胞エラスチン合成評価
線維芽細胞NB1RGBを96ウェルプレートに播種し、1日培養後、サンプルの添加を行い、培地の交換を行いながら、さらに12日間培養を行った。培地を除いた後、洗浄、固定を行い、抗エラスチン抗体を用いた免疫染色を行った。また同時にHoechst33342によるDNA染色を行い、得られた蛍光強度でわることで、DNA当たりのエラスチン合成量とした。

●線維芽細胞ヒアルロン酸合成評価
線維芽細胞NB1RGBを96ウェルプレートに播種し、1日培養後、サンプルの添加を行い、さらに3日間培養を行った。培養終了後、培養上清を回収し、Hyaluronan Quantikine ELISA Kit（R&D Systems）を用いて上清中のヒアルロン酸量を求めた。

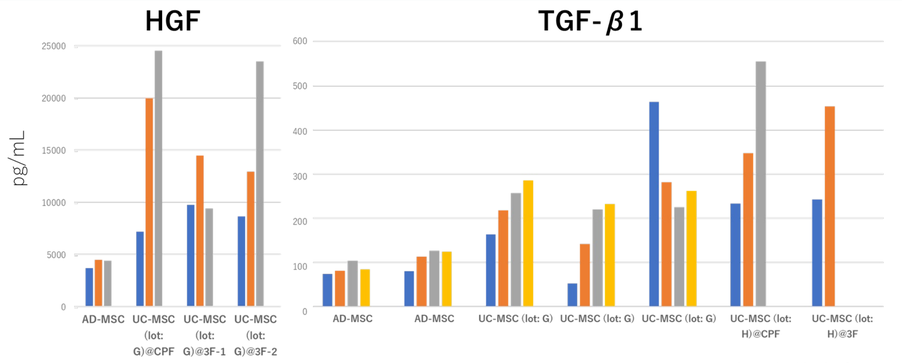
参考文献

1, Keisuke Miyake et al., Regenerative Effect of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells in a Rat Model of Established Limb Ischemia, Circulation Journal, 87: 412 – 420, 2023

2, Rosenbloom J, et al., Structure of the elastin gene, Ciba Found Symp, 192: 59-74, 1995

特徴

ヒトの臍帯を収集し、コラゲナーゼをもちいて分散させ、得られた臍帯由来細胞の培養を行った。培養 UCMSCs は、CD44、CD73、CD90などの MSC の代表的な表面マーカーを発現したが、造血細胞、マクロファージ、および内皮細胞マーカー（CD14、CD19、CD34、CD45、HLA-DR など）については陰性だった。
培養UCMSCsの上清液を回収し分析を行うと、多くのサイトカインを含むことが判明した。特にHGF、TGF-β1については、脂肪由来のものよりもUCMSCs由来の方が含有量が高い事が判明した（右図）。



AD-MSC：脂肪組織由来MSC
UC-MSC：臍帯由来MSC

評価結果

表皮細胞に対し希釈した培養上清液を添加したところ、MTT還元法による濃度依存的な呼吸活性の亢進が確認された（図1）。DNA量を指標にした細胞増殖性については、高濃度側で低下した（図2）が、細胞の形態から、角化を促進したものと考えられた（グラフ上図）。線維芽細胞に対して、MTT還元法による呼吸活性の亢進（図4）と、DNA量を指標にした細胞増殖性の亢進が確認された（図5）。
また線維芽細胞の働きの一つである、真皮コラーゲンの合成促進効果が濃度依存的に確認された（図7）。またその効果はアスコルビン酸誘導体との併用で、さらに効果の向上が認められた（図8、図9）。
さらにECM成分として、エラスチン、（図10）、ヒアルロン酸（図11）の合成促進効果が確認された。

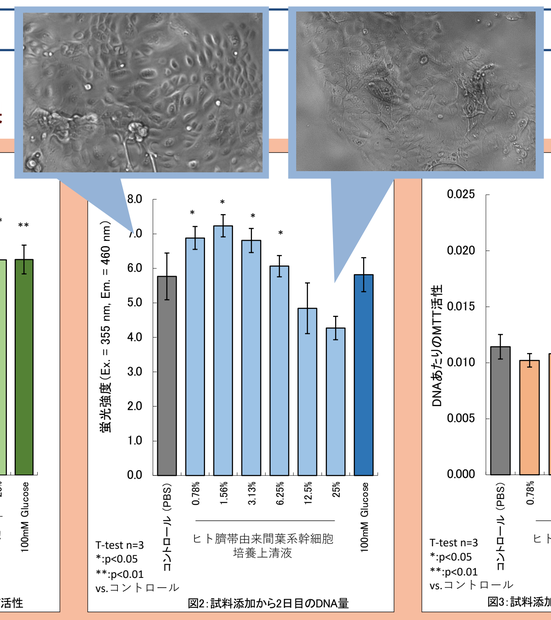


図1：試料添加から2日目のMTT活性
図2：試料添加から2日目のDNA量
図3：試料添加から2日目のDNAあたりのMTT活性

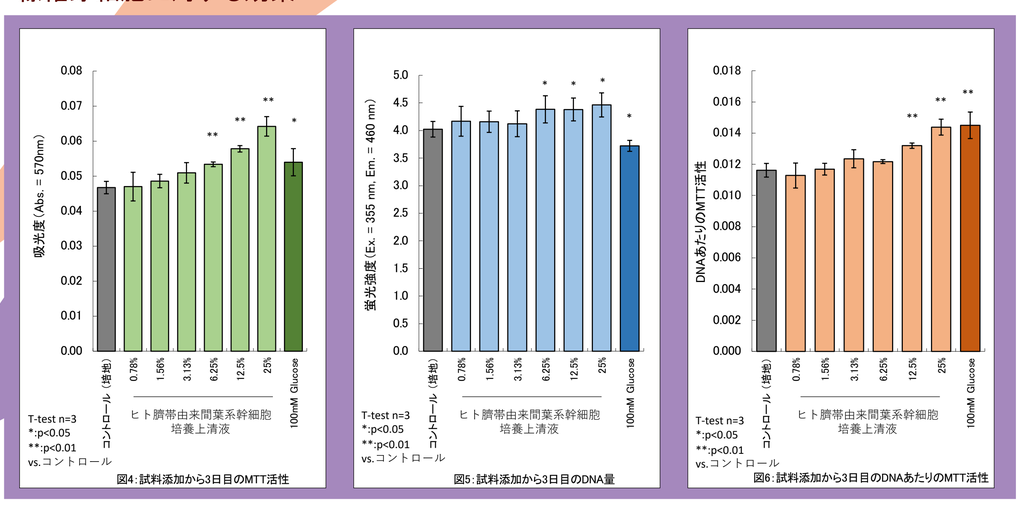


図4：試料添加から3日目のMTT活性
図5：試料添加から3日目のDNA量
図6：試料添加から3日目のDNAあたりのMTT活性

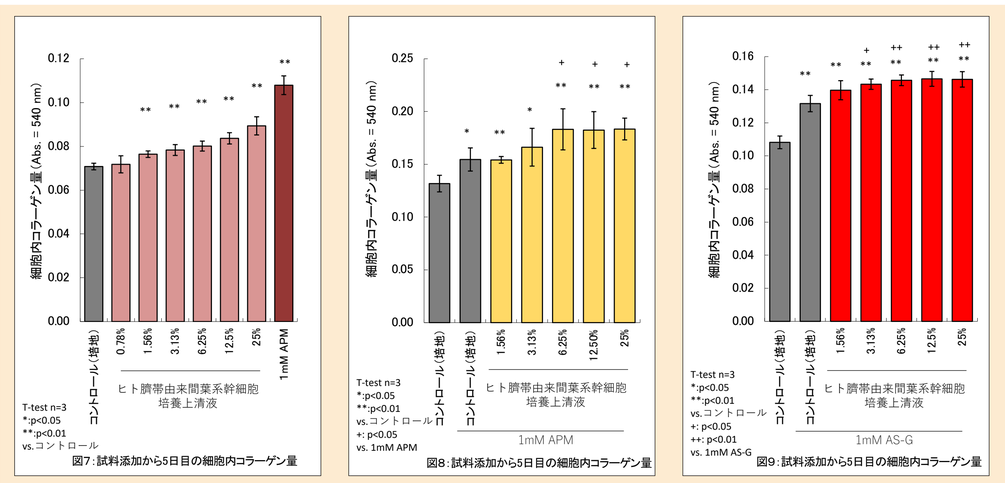


図7：試料添加から5日目の細胞内コラーゲン量
図8：試料添加から5日目の細胞内コラーゲン量
図9：試料添加から5日目の細胞内コラーゲン量

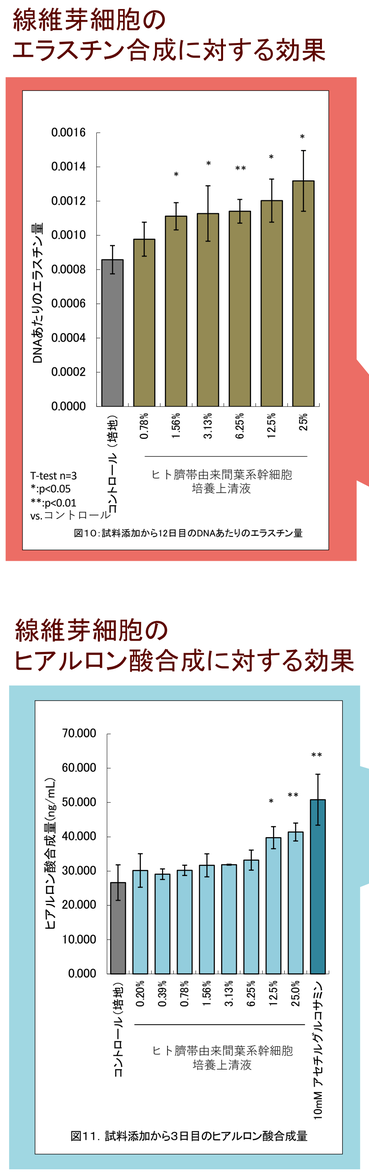


図10：試料添加から12日目のDNAあたりのエラスチン量

図11. 試料添加から3日目のヒアルロン酸合成量



皮膚断面の模式図と
ヒト臍帯由来間葉系幹細胞培養上清液の作用ポイント

APM: アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩
AS-G: アスコルビン酸グルコシド

まとめ

我々は、独自のヒト臍帯由来の間葉系幹細胞からの培養上清液について皮膚科学的な機能性の検討を行った。
その結果、希釈した培養上清液であっても、ヒト正常表皮細胞及び正常線維芽細胞に対し、細胞呼吸活性の亢進効果および細胞増殖促進効果が認められた。また線維芽細胞に対しては、ヒアルロン酸、エラスチン、コラーゲンの合成を促進する効果が濃度依存的に確認された。コラーゲン合成に関しては、アスコルビン酸誘導体と併用すると加算的な効果の向上が確認されたことから、アスコルビン酸とは異なるメカニズムでECM合成を亢進していることが示唆された。
ECM成分の合成には様々なサイトカイン類が影響していることが報告されている[2)]。我々が開発した培養上清液は、他細胞由来のものよりも高濃度のHGF、TGF-β1等が含まれていたことから、これらの成分により、希釈された培養上清においても高いECM合成効果をもたらしている可能性が考えられ、またアスコルビン酸と相乗的に働くことでより高い効果を発揮することが期待される。これらの結果から、香粧品学的効果として、シワ改善などの抗老化効果を期待している。

備考

日本抗加齢医学会
COI開示

発表者名：濱田恵介

私は今回の演題に関連して、
開示すべき利益相反はありません。