

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21251

研究課題名(和文) 脂肪組織中の慢性炎症制圧を目指した新たな脂肪幹細胞治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of novel strategy for suppressing chronic inflammation in adipose tissues utilizing adipose-derived stem cells.

研究代表者

石田 昌義 (ISHIDA, Masayoshi)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：50643251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス皮下脂肪組織をコラゲナーゼ処理し遠心分離により脂肪由来幹細胞の分離方法をまず確立した。続いて脂肪由来幹細胞の持つ抗炎症性作用により脂肪組織における慢性炎症を抑制させることができるかどうかについて、試験管内で検討を行った。脂肪細胞に脂肪由来幹細胞の培養上清を添加して培養を行うと、悪玉アディポカインの発現量は有意に減少させたが、善玉アディポカインの発現量は減少させなかった。次に、2型糖尿病モデルマウスを作製し、これらを2群に分け、偽手術群と脂肪由来幹細胞シートの皮下移植群を行い、10日目にインスリン負荷試験を行って糖代謝能の検討を行った。細胞シート移植群でインスリン抵抗性改善を認めた。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived stem cells (ADSCs) were obtained from mouse subcutaneous adipose tissues digested by collagenase and centrifugation. Next, anti-inflammatory effects of ADSCs on the adipose tissues were examined in vitro culture system. In brief, the adipocytes were cultured in the addition of ADSC culture supernatant and the cells were analyzed the expressions of good and bad adipokines. We found out bad adipokines were decreased, on the other hand, good adipokines were not changed by the addition of ADSC supernatant. Further we examined the beneficial effect of ADSCs on the Type 2 diabetic mice. The mice were divided to two groups to be subjected to ADSC sheet transplantation and sham operation groups, respectively. After the operation, on Day 10, we performed the insulin tolerance test and found out the insulin resistance were recovered by ADSC transplantation compared with the sham operation.

研究分野：再生医学

キーワード：間葉系幹細胞 慢性炎症 2型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

研究を始める動機

アディポネクチンは肥満と関連し脂肪細胞から産生分泌され、肥満が進行するとその産生量も減少することから、脂質の取り込みや合成に関わる重要なサイトカインであり、下述の通り血管リモデリング抑制作用ももつと考えられている。研究代表者は肥満が進行すると miR-378 の発現量が増加し、アディポネクチン発現量は減少することを見出した(PlosOne 2014)。それは、脂肪組織における miR-378 が善玉サイトカインであるアディポネクチンの産生量を試験管内や生体内においても負に抑制していることを明らかにした。以上の研究より、肥満患者が発症しうる心筋梗塞やアテローム性動脈硬化症などの制圧には肥満をいかに抑えるかが重要であることを感じ、本研究課題の着想のきっかけの一つとなった。

脂肪組織による心血管病の病態形成と脂肪由来幹細胞

血管周囲を覆う血管周囲脂肪組織は、近年、その特異な役割について注目されつつある。ヒトの心臓周囲脂肪組織は近接した冠動脈壁にさまざまなサイトカインを放出していることが知られ、それらが何らかの循環器疾患の発症に関与していることが考えられている。また、冠動脈バイパス手術を受ける患者の心臓周囲脂肪組織は皮下脂肪組織よりも過剰の IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 などの炎症性サイトカイン発現が上昇し、抗炎症性サイトカインであるアディポネクチンの発現量が低下している(ATVB, 2013)。一方、肥満時において血管周囲脂肪は、炎症を惹起し血管リモデリングを促進するが、健常時はアディポネクチンを介して血管リモデリングを抑制することが報告されている(Circ Res. 2009)。肥満患者の脂肪組織では炎症性サイトカインの産生や酸化ストレスの増加が引き起こされ、インスリン抵抗性上昇・慢性的な炎症反応が進行し、心筋梗塞や動脈硬化などの病態が引き起こされていると考えられている。

また、興味深いことに脂肪組織中には多分化能をもつ脂肪幹細胞と呼ばれる幹細胞が含まれていることが知られ、自己免疫疾患や組織修復などに新たな再生医療・細胞治療への応用が注目されている。一方、肥満患者の脂肪組織中に存在する脂肪幹細胞がどのような役割を担っているのかは、よく分かっていない。

このような背景から、研究代表者は脂肪幹細胞が脂肪組織での慢性炎症に対する抑制作用を有することを明らかにし、脂肪組織中に含まれる脂肪幹細胞を用いて、肥満患者における脂肪組織中の慢性炎症の治療方法の開発を目指すことにした。

2. 研究の目的

本研究課題では、以下の2点に焦点を当てて研究に取り組んだ。

慢性炎症反応の場で脂肪幹細胞が脂肪組織中での慢性炎症反応を抑制するような効果をもつことを明らかにする。

脂肪幹細胞を2型糖尿病・肥満モデル動物へ投与すれば、脂肪組織での慢性炎症が抑制され、メタボリックシンドロームが改善することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 試験管内で慢性炎症を再現し、脂肪幹細胞の効果を確かめる。

脂肪細胞からは善玉の液性因子であるアディポネクチンと悪玉の液性因子である TNF α や MCP-1 などが産生されている。しかし、炎症が起こるとそのアディポネクチン産生レベルは低下することが知られている。そこで、図1のように試験管内で慢性炎症を模倣した。

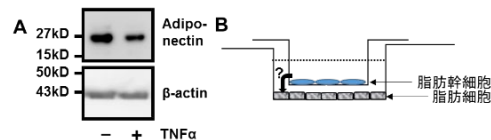


図1 試験管内で慢性炎症模倣モデル: TNF α を含む地で炎症状態をmimicすると脂肪細胞由来アディポネクチン発現量が減少する(A)。このとき脂肪幹細胞を共培養すると脂肪幹細胞由来液性因子を介してアディポネクチン産生量が回復するかどうかを確認する(B)。

脂肪細胞として 3T3-L1 細胞株由来脂肪細胞を用いる。そこに、液性分子のみが通過できるようなトランスウェルを乗せ、トランスウェル上に脂肪由来幹細胞の培養を行う(図1)。

2-3日培養後に下層の脂肪細胞から RNA と細胞可溶化物を調整し、それらに上述のような善玉と悪玉の因子の発現量を定量 RT-PCR 法により確認を行った。

(2) 肥満・2型糖尿病モデルマウスを作出し、脂肪由来幹細胞の投与により代謝機能が改善するか?

野生型マウスに高脂肪・高ショ糖含有餌を約6か月与え、肥満・2型糖尿病モデルマウスを作出した。これに、脂肪由来幹細胞を投与するが、投与方法としては、市販の温度感受性培養皿上で培養したものを室温放置でシート状に乖離させたものをマウスの皮下部へ移植する方法をとった。

具体的には直径10cmの温度感受性培養皿に脂肪由来幹細胞を播き、細胞がコンフルエントに達したとき室温に放置し、細胞をシート状に乖離させ1匹のマウスに培養皿1枚分をマウスの皮下へ移植を行ったのち、10

日目にインスリン負荷試験 (ITT) を行って糖代謝能の改善を評価検討した。実験終了時にはマウスを安楽死させ、各臓器・血液を採取し炎症性サイトカインなどのマーカーの定量などにより、細胞シート移植による治療効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 脂肪由来幹細胞が抗炎症性作用をもつか否かの検討について

脂肪細胞はマウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞をインスリン・デキサメタゾン・IBMX を含む培地で脂肪分化を行ったものを使用した。この細胞を 2 の方法でも述べたようにトランスウェルで仕切りを作り、脂肪幹細胞と脂肪細胞が混ざらないが物質のやり取りはできるようにして培養を行った。

培養 2 4 時間後に脂肪細胞から RNA を抽出し、悪玉液性因子の発現量を確認したところ、悪玉液性因子の発現は有意に下げる傾向が確認できた。

このことより、脂肪由来幹細胞より何らかの因子が分泌されて脂肪細胞の悪玉因子発現量を低下させた可能性が示唆された。この現象は、脂肪由来幹細胞の培養液を 30% 程度含む培地で培養しても同等の効果が得られることが分かった (図 2)。

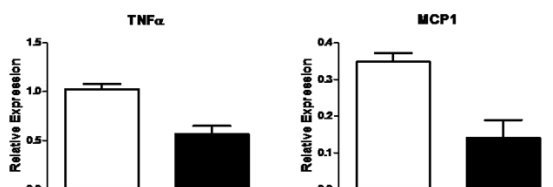


図2 脂肪由来幹細胞(ADSC)と脂肪細胞の共培養後の悪玉因子の発現量。悪玉アディポカインとして知られるTNFα、MCP-1の発現量は、ADSCと共培養により減少した(いずれも p<0.005)。また、ADSCの培養上清を脂肪細胞へ添加しても同様の結果が得られた。ADSC由来液性因子により、悪玉因子の発現量は抑制されていることが示唆された。(□:ADSCなし ■:ADSCあり)

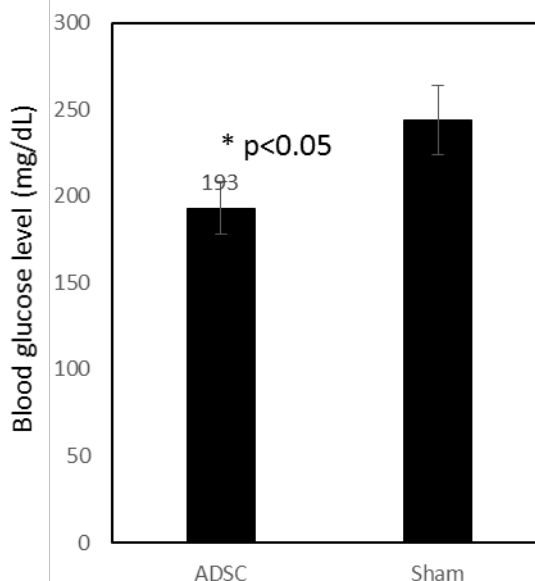
また、興味深いことに、未分化な 3T3-L1 細胞の培養上清では悪玉液性因子発現を抑えることができないことから、この因子の産生は脂肪由来幹細胞のみから産生された因子であることが考えられた。

(2) 2型糖尿病マウスにおける脂肪由来幹細胞移植による治療効果の検討について

脂肪由来幹細胞から分泌される何らかの液性因子が炎症性サイトカインでもある悪玉液性因子 (TNF など) の産生の発現を抑える可能性が示唆されたため、続いて、2型糖尿病・肥満マウスにおける脂肪組織中の慢性炎症反応や糖尿病という病態を抑制させる効果を持つのではないかと考えた。そこで、C57BL6 マウスに高シヨ糖・高脂肪食を約 6 か月にわたって与え、2型糖尿病・肥満マウスを作製した。脂肪由来幹細胞をどのように投与するかについて、議論した結果、市販の温度感受性培養皿にて作成した細胞シートを皮下移植

することにした。マウス皮下にシート移植群と偽手術群の 2 群に分け移植後、10 日目にインスリン負荷試験を行ってマウスのインスリン抵抗性を確認したところ、まず、空腹時血糖値は細胞シート移植群において、血糖値の改善が見られ (図 3、p<0.05)、さらに投与後 30 分でも偽手術群に対して細胞シート移植群よりもインスリン抵抗性は改善傾向 (有意差なし) が確認できた。また、細胞シート移植 21 日目には、空腹時血糖値やインスリン抵抗性も両群では有意差は確認できなかった。このことは、移植後、14 日目ごろまでは脂肪由来幹細胞からの液性因子による作用が持続していたが、21 日目には効果が激減したものと考えている。今後は、移植スケジュール、移植回数などの条件検討を行っていく予定である。

図3. 空腹時血糖値



(3) 得られた成果の国内外における位置づけ

本研究は、脂肪由来幹細胞が分泌する液性因子が脂肪細胞から分泌する炎症性サイトカイン (悪玉アディポカイン) 産生を抑制する作用をもつことを示唆することを明らかにした。また、脂肪由来幹細胞を 2 型糖尿病マウスに移植すると、移植後 10 日目には空腹時血糖値を有意に下げる作用をもつことを明らかにした。これらの成果は、いまだ、報告されておらず、脂肪由来幹細胞が代謝異常の改善作用をもつことを示唆しており、メタボリックシンドローム治療への応用などの可能性もあり極めて新しい知見であると考えている。

(4) 今後の展望

今回の報告では、予備実験の段階であるので、結論を出すのは困難であったが、本研究成果より、糖代謝改善には脂肪由来幹細胞が分泌する何らかの液性因子が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後は、グルコース負荷試験などの基礎データを集積しつつ脂肪由来幹細胞による血糖値抑制機序の解明について研究を継続させたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Kina-Tanada M, Sakanashi M, Tanimoto A, Kaname T, Matsuzaki T, Noguchi K, Uchida T, Nakasone J, Kozuka C, Ishida M, Kubota H, Taira Y, Totsuka Y, Kina SI, Sunakawa H, Omura J, Satoh K, Shimokawa H, Yanagihara N, Maeda S, Ohya Y, Matsushita M, Masuzaki H, Arasaki A, Tsutsui M. Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice. Diabetologia (2017) 60: 1138-1152. 査読あり (DOI: 10.1007/s00125-017-4259-6)

[学会発表](計1件)

1. 石田昌義, 塚原成俊, 村上明一, 角南寛, 岸本英博, 筒井正人.
「脂肪由来幹細胞(ADSC)の増殖と分化における一酸化窒素合成酵素(NOS)系の役割」
第15回日本再生医療学会総会(2016年3月16日) 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 昌義 (ISHIDA, Masayoshi)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号: 50643251

(2)研究協力者

辰巳 公平 (TATSUMI, Kohei)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号: 70555432

梶 博史 (KAJI, Hiroshi)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号: 90346255