

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11559

研究課題名(和文)新規ヒト脂肪組織間葉系幹細胞を用いた糖代謝制御機構の解明と高品質な脂肪細胞の創製

研究課題名(英文)Elucidation of glucose metabolic regulation on a novel mesenchymal adipose stromal/stem cells (hASCs), and Establishment of a high quality hASCs-subpopulation for clinical use.

研究代表者

森山 博由 (Hiroyuki, Moriyama)

近畿大学・薬学総合研究所・准教授

研究者番号：90581124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来幹細胞の低酸素応答に関わる責任遺伝子群(マスターレギュレータ)を選別し、この特性をもつ細胞亜群が発現する表面マーカーを同定し、間葉系に属する各種の終末細胞への分化特性に傾向があることを見出した。さらに、マスターレギュレータを指標とした脂肪細胞分化に長けたHx-hASCの亜集団の分画は、ある一定の終末細胞に高い分化特性をもつことを見出した。また、人工皮膚3次元モデルの基礎的な検討において、ケラチノサイトなどの上皮構成細胞の維持に対する線維芽細胞との相乗効果、ならびに線維芽細胞とこの脂肪由来間葉系幹細胞亜群との質的量的なバランスが、真皮層のターンオーバーに影響を及ぼすとする知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪由来間葉系幹細胞は培養を施されることによる選択的なバイアスがかかることが大きな障壁であった。ゆえに、生体内の生存環境のなかでも低酸素領域を好む脂肪由来間葉系幹細胞について、その幹細胞性の維持機構の解明は、極めて重要な知見となる。本研究では、脂肪由来幹細胞におけるNotch-低酸素応答シグナルが制御する解糖系亢進メカニズムに関わる責任遺伝子群の選別に成功し、間葉系に属する各種の終末細胞への分化特性に傾向があることを見出した。面白い事に、この亜集団はヒト表皮組織が豊潤に分化成熟することもわかった。以上の結果や知見は、真の脂肪由来幹細胞の同定と生体内での機能の理解への一助を照らすものと思われる。

研究成果の概要(英文)：We identified a group of key genes responsible (a master regulators) for the hypoxia response in adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells, and were selected characteristic marker expressing on cell surface. By further segregation of these cell subgroups, we found that they tend to differentiate into various terminal differentiated cells especially belonging to the mesenchymal lineage. This led to the isolation of a subpopulation of Hx-hASCs that are proficient in adipocyte differentiation using the master regulator as an indicator, and the narrowing down to a sharpening of the subpopulation for the unique hASCs. In addition, we found that the synergistic effect of fibroblasts on the maintenance of epithelial cells, such as keratinocytes, and the qualitative and quantitative balance between fibroblasts and the adipose-derived mesenchymal stem cell subgroups affect the turnover of the dermal layer, albeit at a preliminary level in the basic study of the artificial skin 3D model.

研究分野：幹細胞生物学/皮膚科学

キーワード：脂肪由来間葉系間質幹細胞 解糖系代謝 シグナル伝達 再生医療 3次元皮膚構築

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、ヒト脂肪組織から低侵襲にて採取できる再生医療用の幹細胞資材の創出を進めている。これまでヒト脂肪組織由来幹細胞の接着性を応用した技術により、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (hAMSC : human Adipose tissue derived Mesenchymal Stem Cell) の作製に成功している。この hAMSC は、従前の手法で採取した脂肪由来幹細胞 (ASC) と比べ、脂肪、骨、軟骨等の間葉系細胞、心筋細胞、肝細胞(Ohkura H, Moriyama H, et. al. Tissue Eng Part C Methods. 2010)、神経細胞 (Moriyama H, et. al. Plos One. 2013) など幅広い分化能に長けている。また、BMP2, FGF2 をはじめとする各種の成長因子を分泌している (Moriyama H, et. al. BMC Cell Biol. 2012)。さらに、倫理的な問題やがん化のリスクが極めて低いこと、疾患モデル動物移植において、損傷部位や疾患部位への遊走性、生着性にもすぐれている特性を有することも確かめている。これらの特性から、細胞治療用の幹細胞資材として最も実用性・有用性が高いものの一つと捉えられている。実際、家族性高コレステロール血症等の希少疾患等を対象とした前臨床試験にも用いられ、有用性の一端が実証されている。

申請者らはこの hAMSC にさまざまな生体環境ストレスを与え、未分化性・増殖性の向上につながる種々の条件を精査した。その結果、細胞を取り巻く酸素環境の変動が、hAMSC の増殖能・分化能を著しく改善することを見出した(図1)。加えて、この低酸素条件を規定しうる分子(分子ゲージ)を用いた低酸素培養法を開発し、特許の取得が間近な状況にある(出願番号:特願 2012-155584)。この方法で得られたヒト脂肪組織由来新規間葉系幹細胞 (Hx-hASC : Hypoxia eXposed-human Adipose tissue derived mesenchymal Stem Cell) には、hAMSC に比べ、更に Notch シグナル伝達系の亢進と解糖系の亢進が認められ、非常に優位に間葉系細胞(脂肪細胞を含む)への分化能に長ける集団を形成することを見出した(図1)。

一方、ES・iPS 細胞など未分化性・分化能の高い幹細胞においては、解糖系の亢進機構が働くとされている。しかし、解糖系が分化制御に関わるメカニズムは未開であり、精査・探索が望まれる科学領域として残されている。加えて、ヒト生体内の脂肪組織領域でも変動が観察される酸素濃度環境が、脂肪

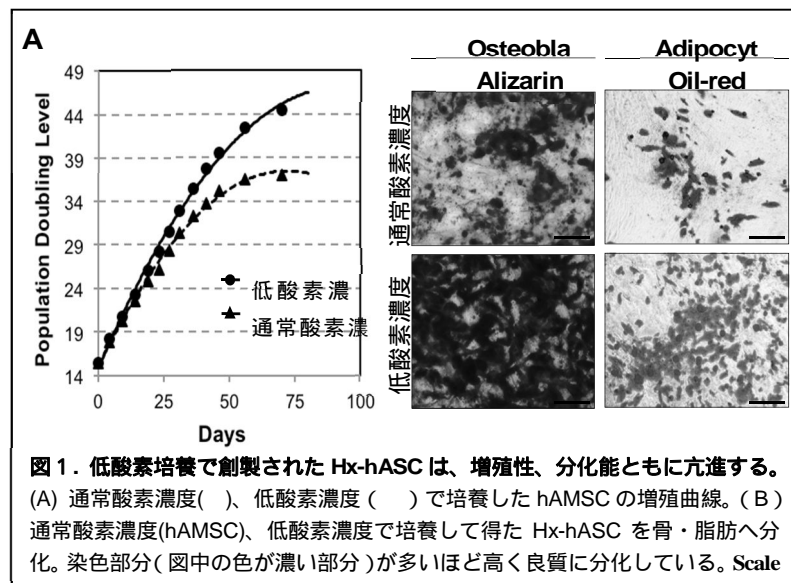


図1. 低酸素培養で創製された Hx-hASC は、増殖性、分化能ともに亢進する。(A) 通常酸素濃度(○)、低酸素濃度(●)で培養した hAMSC の増殖曲線。(B) 通常酸素濃度(hAMSC)、低酸素濃度で培養して得た Hx-hASC を骨・脂肪へ分化。染色部分(図中の色が濃い部分)が多いほど高く良質に分化している。Scale

脂肪組織の形成や維持・代謝に積極的に貢献する可能性は大きいと想定される(図1)。

2. 研究の目的

本研究では、「Notch シグナル経路と低酸素応答シグナル制御機構の関連性」を詳らかにすることで、「② 分子シグナルを指標とした、ヒト生体内環境に順応する脂肪組織構築のための細胞再生医療用幹細胞の選別と評価」を目指す。これにより、「脂肪組織再建術のための橋渡し・基盤技術の開発」その方策を提示する。また、この研究成果からは、

未だその生物学的性状が不明瞭な生体内近似の酸素環境下における間葉系幹細胞の“代謝制御カスケードメカニズム”の全容の提示と中心的なシグナル制御の解明が予想される。それらから総じて、真に細胞・組織再生医療に実用的である高品質かつ安全な究極の“臨床用途に適した高品質な新規ヒト脂肪由来間葉系幹細胞（オーダーメイド再生医療用幹細胞）の樹立”が期待できると考えている。

3. 研究の方法

(1) Notch シグナル-低酸素応答シグナルと解糖系制御系間との関連性評価と分子制御機構の同定

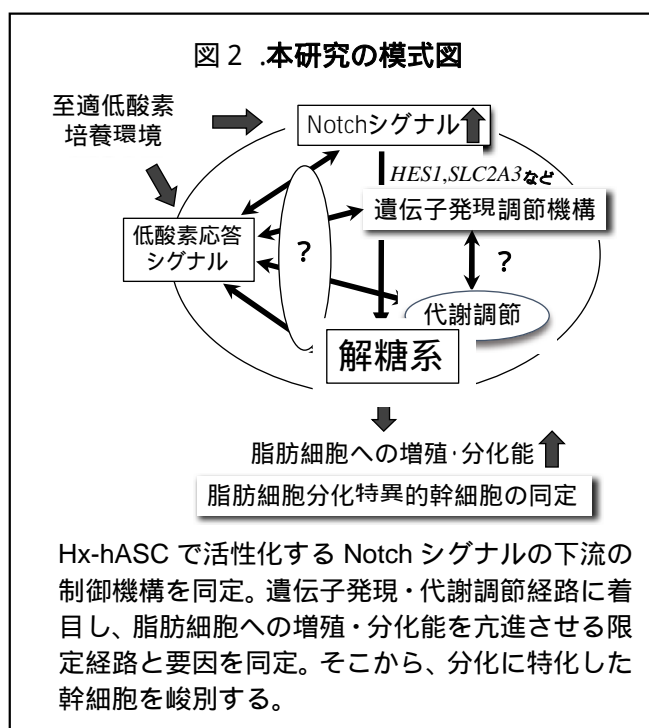
これまでに Hx-hASC において Notch シグナルの活性化が解糖系の制御に関わり、幹細胞の増殖能や間葉系系譜の終末細胞（脂肪細胞、骨・軟骨細胞など）への分化能の亢進につながることを示した。そこで、低酸素-Notch シグナル依存的に発現制御される遺伝子の網羅的探索と機能解析を行うことで、これらの遺伝子の関係づけと責任遺伝子を同定する（図2）。

① マイクロアレイより得られた網羅的遺伝子発現解析確認

ヒト由来の一般的脂肪幹細胞 (hASC), hAMSC, Hx-hASC より mRNA を抽出し、マイクロアレイを用いた多検体網羅的遺伝子発現解析を行った。上記の3項間アレイにおける低酸素培養下での発現変動、Notch シグナル阻害による発現変動（Notch オーム解析）における責任遺伝子選定を行った。

② 遺伝子レベル、タンパク質レベルでの候補遺伝子の検証

上記で得られた候補遺伝子を、定量的リアルタイム PCR 法を用いてバリデーションを行った。転写因子、膜表面タンパク質（表面マーカーになり得るもの、細胞外基質を中心に）、代謝関連因子をコードする遺伝子を優先して検証した。転写レベルで変動が確認出来た遺伝子に関しては、フローサイトメトリーやウェスタンブロットティング法等を用いて解析した。これにより確証を得られた遺伝子について、ノックダウン法や TALEN/CRISPR 法によるゲノムエディティングに必要な制御遺伝子を作製した。



(2) Notch 下流シグナル-解糖系を制御する遺伝子群から脂肪細胞分化に関わる分子の選別と同定

代謝制御と幹細胞らしさ(Stemness)との関連性示す報告が蓄積していること、Notch シグナルの下流シグナル系による代謝制御が規定されることが想定される。以上から Hx-hASC におけるエネルギー代謝経路とその代謝産物に着目し、脂肪細胞分化に関わる分子の選別

と解析を行う。

① 質量分析装置を用いた代謝物質解析（メタボローム解析）と関連遺伝子の比較

通常酸素下培養、低酸素下培養した hASC、Hx-hASC より抽出した代謝産物を、質量分析装置にて分析した。解析方法はこれまでの予備的検討と知見から、アミノ酸、有機酸、糖類などの代謝産物に注目し、項目 1.- の遺伝子のカテゴリライズと関連性を精査した。

変動遺伝子による増殖能・分化能亢進への関与とその機序を解明

項目 2.- より得られた候補遺伝子を過剰発現、もしくはノックダウンすることにより、Hx-hASC の増殖能・分化能亢進に与える影響を確かめた。

遺伝子解析結果とあわせた Hx-hASC での代謝経路を同定

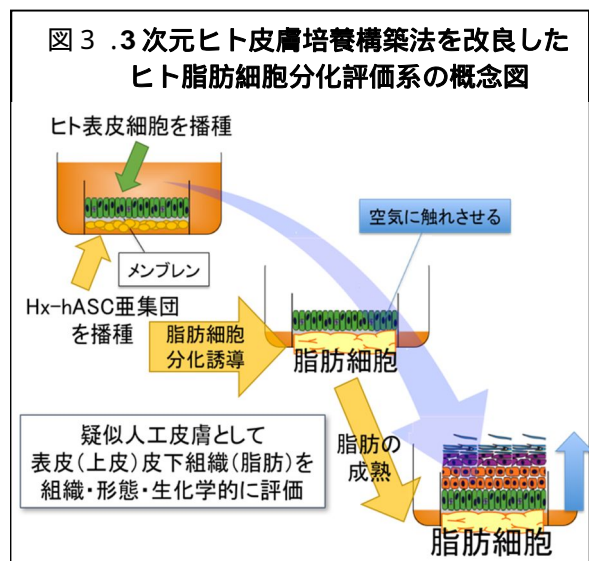
項目 2.- , より得られた変動遺伝子のうち、解糖系や TCA サイクルなどのエネルギー代謝に関わる遺伝子を選定し、Hx-hASC において亢進もしくは抑制されるエネルギー代謝経路を同定した。

(3) 上記探索によって得られた Notch-解糖系シグナル関連因子を指標にした Hx-hASC の亜集団峻別を行い、生体になじむ高品質な脂肪由来間葉系幹細胞集団の単離と評価

上記探索によって得られた遺伝子と代謝経路に関して、実際にそれらが脂肪細胞分化能の亢進に関与しているのか in vitro で検証しフィードバックし。実証できた分子を指標に Hx-hASC の亜集団を分別し、3次元ヒト皮膚培養系を改編した方法(図)等を用いて機能的な脂肪細胞に分化できるか評価した。

Hx-hASC より増殖能および脂肪分化能の高いヒト脂肪由来新規幹細胞亜集団の分離と創製

項目 1 および 2 で得られた責任分子や表面マーカーにより細胞を分別し、得られた細胞を、改編 3次元ヒト皮膚培養評価系(図 3)に供し、表皮分化試験や脂肪分化評価・安全性試験を行った。



4 . 研究成果

脂肪由来幹細胞の低酸素応答にも関わる責任遺伝子群(マスターレギュレータ)を選別し、この特性をもつ細胞亜群が発現する表面マーカーを同定した。そこから、それらの細胞亜群をさらに分別することで、間葉系に属する各種の終末細胞への分化特性に傾向があることを見出した。これにより、マスターレギュレータを指標とした脂肪細胞分化に長けた Hx-hASC の亜集団の分離、および、ある一定の終末細胞に高い分化特性をもつ、脂肪由来幹細胞のより詳細な亜集団への絞り込み(亜集団の峻別化)に至った。さらに、人工皮膚 3次元モデルの基礎的な検討において、その予備的な検討レベルではあるが、ケラチノサイトなどの上皮構成細胞の維持に対する線維芽細胞との相乗効果、ならびに線維芽細胞とこの脂肪由来間葉系幹細胞亜群との質的量的なバランスが、真皮層のターンオーバーに影響を及ぼ

すとする知見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ozawa Toshiyuki, Tsuruta Daisuke, Iguchi Taro, Tamada Satoshi, Nakatani Tatsuya, Nakagawa Koichi, Hayakawa Takao	4. 巻 27
2. 論文標題 Notch Signaling Enhances Stemness by Regulating Metabolic Pathways Through Modifying p53, NF-B, and HIF-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 935 ~ 947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2017.0260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Moriyama H, Moriyama M, Ozawa T, Tsuruta D, Iguchi T, Tamada S, Nakatani T, Nakagawa K, Hayakawa T.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Notch signaling enhances stemness by regulating metabolic pathways through modifying p53, NF-B, and HIF-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells Dev	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2017.0260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Kubo H, Nakajima Y, Goto A, Morita T, Hayakawa T	4. 巻 8
2. 論文標題 BNIP3 upregulation via stimulation of ERK and JNK activity is required for the protection of keratinocytes from UVB-induced apoptosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Death Dis	6. 最初と最後の頁 e2576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/cddis.2017.4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 H. Moriyama, M. Moriyama, T. Hayakawa, M
2. 発表標題 THE POTENTIAL OF A HUMAN ADIPOSE-DERIVED STROMAL/STEM CELL PROPERTIES TO DIFFERENTIATION OF DOPAMINERGIC NEURAL CELLS.
3. 学会等名 16th International Society for Stem Cell Research 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Moriyama.
2. 発表標題 The application of dermatological science for cosmetics product development.
3. 学会等名 1st International Seminar on Advanced Anti-Aging in Taiwan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森山博由
2. 発表標題 脂肪由来間葉系間質幹細胞の探究 -代謝メカニズムの視点より-
3. 学会等名 再生医療・幹細胞研究フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 KAKERU INOUE, MARIKO MORIYAMA, TAKUMI WATADA, TOSHIYUKI OZAWA, TAKAO HAYAKAWA, HIROYUKI MORIYAMA
2. 発表標題 HYPOXIA ACTIVATES NOTCH SIGNALING TO MAINTAIN STEMNESS IN ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS.
3. 学会等名 15th International Society for Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和多田巧, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由
2. 発表標題 低酸素条件下でのヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞におけるNotchシグナルの役割
3. 学会等名 幹細胞・細胞分化リトリート
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井上翔, 森山麻里子, 和多田巧, 木村徳仁, 藤村朱美香, 小澤俊幸, 早川堯夫, 森山博由
2. 発表標題 低酸素状態下でのヒト脂肪由来間葉系幹細胞におけるNotchシグナルの役割
3. 学会等名 第67回日本薬学会近畿支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森山博由
2. 発表標題 脂肪幹細胞の特性解析から紡ぐ創薬・臨床研究への橋渡し基礎研究
3. 学会等名 第26回日本形成外科学会基礎学術集会 総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kakeru Inoue, Mariko Moriyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama
2. 発表標題 HYPOXIA ACTIVATES NOTCH SIGNALING TO MAINTAIN STEMNESS IN ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS
3. 学会等名 The 40th Annual meeting of the Molecular biology society of Japan
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫
2. 発表標題 低酸素状態に維持されたヒト脂肪由来幹細胞における新たな解糖系制御機構
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 早川堯夫, 森山博由	4. 発行年 2018年
2. 出版社 エル・アイ・シー	5. 総ページ数 504
3. 書名 品質・安全性確保.バイオロジクスの開発と品質・安全性確保 上巻	

1. 著者名 早川堯夫, 森山博由	4. 発行年 2018年
2. 出版社 エル・アイ・シー	5. 総ページ数 504
3. 書名 品質・安全性確保.バイオロジクスの開発と品質・安全性確保 下巻	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 脂肪組織由来体性幹細胞の製造方法	発明者 森山博由, 森山麻里子, 松山晃文, 早川堯夫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6209377	取得年 2017年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

近畿大学 薬学総合研究所 先端バイオ医薬研究室 https://www.phar.kindai.ac.jp/biomedical/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----