

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04359

研究課題名(和文) 外因性増殖因子の刺激により最適化を図った“機能的幹細胞補充療法”の開発

研究課題名(英文) Development of the optimized and functional stem cell therapy by stimulating with the exogenous growth factors

研究代表者

水野 博司 (Mizuno, Hiroshi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80343606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト由来脂肪組織幹細胞(ASCs)を用いた再生医療を効果的なものにするため、外因性増殖因子であらかじめ刺激することでASCsから放出される内因性増殖因子を最大限発揮させることで組織再生のための最適な機能的幹細胞補充療法を確立するための研究を行った。その結果、塩基性細胞増殖因子(bFGF)刺激下により、IL-8、CXCL1を代表とする遺伝子およびタンパク発現が増強し、それらは効果的な血管新生作用を補填することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞を用いた再生医療は、従来幹細胞自身が有する成熟細胞への分化能の他に、幹細胞自身が放出する各種の増殖因子等が相同的に作用して再生効果を高めると考えられてきたが、近年では後者が有力であるのではと示唆されてきた。今回の研究ではbFGF刺激によってASCsから強く発現するタンパク質や遺伝子の網羅的解析を通じて仮説をある程度証明することができた。今後は幹細胞の持つ再生効果を最適化できるような外因性増殖因子やその量について検証していきたい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this experiment was to establish the effective therapeutic approach using adipose-derived stem cell for tissue repair and regeneration by accelerating the release of the endogenous growth factors which can be positive for the regeneration by the pre-stimulation with the exogenous growth factors. The results showed that several numbers of positive gene expression and the increase of the protein level including IL-8 and CXCL1 by the stimulation with basic fibroblast growth factor were confirmed due to angiogenesis.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医学 脂肪組織幹細胞 増殖因子 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は2001年にヒトの皮下脂肪組織中に多分化能を有する幹細胞が存在することを世界で初めて証明し¹⁾、以来この脂肪組織幹細胞(Adipose-derived Stem Cells、以下ASCs)を用いた軟部組織再生、硬組織再生、神経再生、血管再生などの再生医療研究に関しこれまで世界をリードしてきた²⁾。また近年ではiPS細胞の樹立、細胞シート工学など我が国発の新しい革新的技術開発により、現在多くの組織臓器再生や疾病治療に対する再生医療への期待が高まっている上、国家の成長戦略の柱の一つに再生医療を据え、新たな法整備も進んでいるなど、再生医療はこれまでにない国民の期待と関心が寄せられているところである。

再生医療における幹細胞の役割としてはこれまで、幹細胞自身の有する多分化能により細胞自身が目的とする再生組織に分化する効果と、幹細胞自身が分泌する種々の液性因子が周辺の細胞に働きかけ、細胞の増殖、遊走、分化を介した再生誘導を促すといった、いわゆるパラクライン効果によるものの2つが存在すると言われてきた。しかしながら実際には幹細胞の分化よりも、むしろ後者のパラクライン効果のほうが組織再生により寄与しているのではないかといった研究成果が多く散見され、我々の脂肪組織幹細胞研究においても、組織再生は実際起こるものの投与した幹細胞のごく一部が分化を示すに過ぎないばかりか、分化せずに局所の間質内に停滞している細胞すら極めて少ないのが現状である³⁾。そのような背景から最近では培養上清中の幹細胞由来成長因子のみを投与しても幹細胞投与と遜色のない再生効果が獲得できるといった報告も出てきた⁴⁾。

その一方、我々はこれまでの先行研究の中で、投与する幹細胞をあらかじめ別の増殖因子で外因性に刺激することによって増殖因子の放出力を高め、より強力なパラクライン効果を引き出すことにより、単に幹細胞のみを投与した時と比較して極めて効果的な頭蓋骨組織再生現象および末梢血管再生現象が起こることを偶然にも発見した^{5,6)}。

すなわち、たとえ幹細胞の持つパラクライン効果を期待した再生治療を実施するにせよ、現状のような単に幹細胞を投与するのではなく、あらかじめ外因性増殖因子で刺激を加えてパラクライン効果を最大限発揮させることのできるよう、最適化した状態の幹細胞を投与することで、多くの組織再生あるいは疾患治療がより一層効果的に達成可能となるのではないかという着想に至った。このコンセプトに基づいた幹細胞による再生医療の効率化をメカニズムまで含めて詳細に調査した研究報告は申請者らが渉猟しえた限り全くなかった。従って本研究はこれまで我々が実施してきた一連の研究の延長線上にあり、再生医療における幹細胞の作用機序の解明とより効果の高い治療方法の開発につながる、世界を確実にリードする可能性のある非常に有意義な研究と位置づけることが出来ると考えた。

2. 研究の目的

本研究においては、外因性増殖因子によって幹細胞を移植投与時に刺激し、幹細胞自身の有する内因性増殖因子を効率的に細胞外へ放出させることによって、これまでにない効果的な組織再生誘導および組織修復を実現させられるかについて検証することを目的とする。その手段として、脂肪組織幹細胞と種々の増殖因子との混合物を、多種多様な急性・慢性創傷疾患モデル動物に局所投与し、組織の修復・再生の肉眼的促進効果はもとより上皮形成や血管新生、再生組織の質的評価について形態学的、組織学的、免疫組織学的、分子生物学的に検証する。こうして得られる知見を礎として、“幹細胞補充療法”の効果発現における真のメカニズムを明らかにしつつ、最終的には幹細胞のもつパラクライン効果を最大限に引き出すことで組織再生のための最適で有効な“機能的幹細胞補充療法”を確立することにある。

3. 研究の方法

本研究の最終目標は種々の外因性増殖因子でASCsを刺激し、内因性増殖因子の放出を高めてパラクライン効果を最大限発揮させることによる“機能的幹細胞補充療法”の確立である。研究初年度はASCsを主要な増殖因子で外因的に刺激した際に放出される内因性増殖因子の同定と定量をin vitroにおいて実施し、刺激前のASCs由来増殖因子との比較を行う。その後各種の急性・慢性疾患動物モデルを用いて実際にpreconditioningされたASCsを移植してその治療効果について肉眼的、組織学的、免疫組織学的に評価し、最後に1つないし複数の主要な内因性増殖因子をノックダウンしたASCsを移植材料に用いて再生効果の質的量的変化について調査することで、組織再生におけるパラクライン効果の占める重要度評価を逆説的に補完する予定であった。

しかし動物実験の取り扱いが可能な研究施設の大規模な改築移転が研究開始当初より開始となり、2019年末に1期工事が終了(2020年7月竣工予定)したことから、動物由来の試料を用いた研究および実験動物を用いたin vivo研究がほぼ遂行できない状況であった。そのため結果的に当初の研究計画を大幅に修正し、以下に示す要領で実施した。

(1) 外因性増殖因子により刺激された脂肪組織幹細胞(ASCs)から放出される内因性増殖因子の同定(研究初年度)

LONZA社製ヒト由来ASCs(Tissue Number: 29836)を基礎培地(D12132: Mesenchymal stem

cell growth medium) で培養継代し、第2継代ASCsを準備した。この培養ASCsに対し、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)添加群(10ngおよび50ng)、非添加群を準備した。培養開始後1日目、2日目、6日目に培養上清を回収し、ELISAを用いてタンパクレベルでの各種の増殖因子(HGF、IL-6等)を測定して実験群間で相違が認められるかどうか検証した。

(2) 外因性増殖因子により刺激された脂肪組織幹細胞(ASCs)から放出される内因性増殖因子の網羅的遺伝子解析(研究初年度および2年度)

ELISAによるタンパク発現実験と同様、LONZA社製ヒト由来ASCsを基礎培地(D12132: Mesenchymal stem cell growth medium)で培養後、bFGFで刺激を加えた後に継時的に培養上清を回収し、Thermo Fisher Scientific社製TaqMan Array FAST 96-well Plateを用い、合計3種類のTaqMan Array(Angiogenesis, Cytokine Network, Growth Factor)を用いて、ASCsから発現が誘導されてくるサイトカインの遺伝子発現を網羅的に探索した。

(3) 脂肪組織幹細胞(ASCs)から放出される内因性増殖因子の血管新生効果の検証(研究最終年度)

上記(1)および(2)における検証実験の再現性を検証するため、人種や性別の異なるヒト由来ASCs(すべてLONZA社製)を用い、培養環境下において塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を添加することでASCsに刺激を加え、継時的に回収した細胞および培養上清を用いて、リアルタイムPCRによるmRNAレベルおよびELISAによるタンパク質レベルの発現解析を行った。その後得られた結果を参考に、ヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)を用い、in vitroにおいて発現の高かったタンパクを添加して血管新生レベルを確認した。

4. 研究成果

(1) まずHGFの発現レベルに関しては培養開始後1日目においてはbFGF添加群、非添加群に関わらず検出量は微量であったが、2日目、6日目においては時系列的に発現の程度が上昇した。しかしながらbFGF添加群、非添加群の間に有意差はなく、添加したbFGF(10ngおよび50ng)の量の違いにおいても同様に有意差を認めることはできなかった。一方、IL-6の発現レベルに関しては、培養後1日目の上清においてすべての群間に有意な差は認めなかったが、培養後2日目の上清において、bFGF10ng添加群においてbFGF50ng添加群および非添加群に比べて優位にIL-6の発現が上昇することが明らかとなった(図1)。しかし培養後6日目においては再びすべての群間に有意な差は認めなかった。

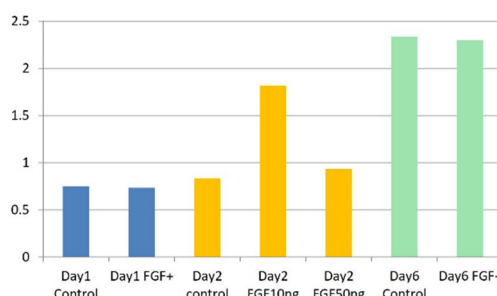


図1 外因性bFGF刺激の有無におけるヒトASCs由来内因性IL-6の経時的発現の変化

(2) 最初に血管新生関連遺伝子の網羅的解析(TaqMan Array Angiogenesis)を実施したところ、IL-8が安定的に高い発現を示した。次いでCSF3、ANGPTL4の発現が高値を呈した(図2)。次いで種々のサイトカインネットワークに対する網羅的遺伝子解析(TaqMan Array Cytokine Network)を実施したところ、やはりIL-8の発現が高値を示し、次いでIL-6、TNF、IFNA2、IL-12などが安定的に高発現を示した。最後に成長因子関連の網羅的遺伝子解析(TaqMan Array Growth Factor)を行ったところ、HBEGF、IL-1Bの発現が常時安定的に高値を示した。

これまでの研究段階において興味深いことに、これまでのマウスを用いた先行研究とは異なるサイトカインの遺伝子発現がヒト細胞を用いた研究で明らかになりつつあり、ヒトではマウスとは異なるサイトカインがASCによる組織再生や血管再生に関与している可能性も念頭において研究する必要が考えられた。

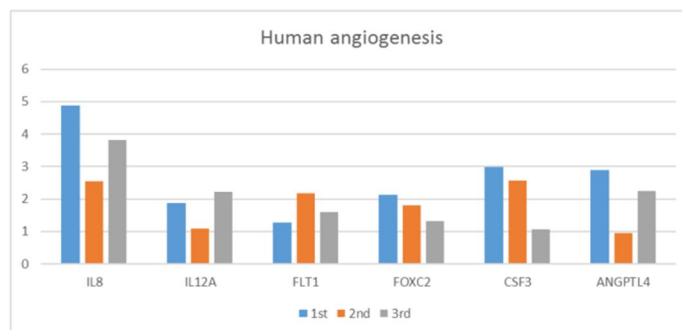


図2 外因性bFGF刺激におけるヒトASCs由来内因性血管新生関連遺伝子の発現

(3) bFGF刺激により発現量が増強することが確認されていたIL-8、CXCL1のmRNAにおいては、ASCsの由来(人種差、男女差)に関係なく同様に再現性をもって発現量が増加し、普遍的であることが確認された。またELISAにおいてもIL-8やCXCL1の分泌量が、bFGF刺激によりタンパク質レベルにおいても増加していることが明らかになった。これらの現象を踏まえ、in vitroにおいてHUVECにIL-8およびCXCL1を添加して血管新生レベルを確認したところ、添加後5時間程度

で両者ともにコントロール群と比較して血管のネットワーク構築が確認され、これにより比較的早期の段階から有意に血管新生が誘導されることがわかり、bFGFという外因的増殖因子刺激を受けたASCsの生体内移植により、ASCs単体での移植と比べてより一層血管新生効果が高まること示唆された。

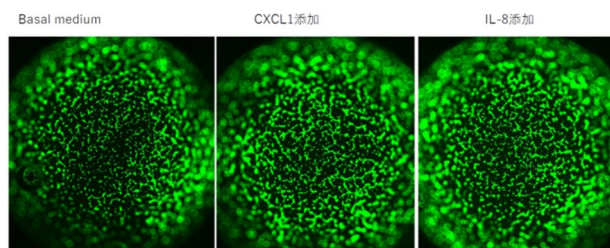


図3 CXCL1およびIL-8刺激下での血管新生が亢進されたHUVECの形態的变化

(4) 今後の展望など

動物実験実施の制約上、動物由来の細胞や動物由来の外因性増殖因子（PRP等）の使用が困難であり、また動物疾患モデルを用いたin vivo研究の実施が困難であったが、これまでの研究結果より、今後は創傷治癒モデルなどを用いた研究を通じて得られた研究結果の妥当性を裏付けていく必要がある。また同時にIL-8などの中和抗体を用いた抑制試験も実施する。

一方で期せずしてヒト由来ASCsを用いることになったことで動物由来ASCsとは異なる遺伝子ないしはタンパク発現プロファイルが得られたことから、今後の臨床応用を見据えた場合には積極的にヒト由来細胞、更には糖尿病などの疾患を有するヒト由来の細胞を使用した研究を推進することは大きな意義があると考えた。

<引用文献>

- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228 2001
- Mizuno H, Tobita M and Uysal AC Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 30: 804-810, 2012
- Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, et al. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng* 14: 945-953, 2008
- Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, et al. Conditioned Media From Mesenchymal Stem Cells Enhanced Bone Regeneration in Rat Calvarial Bone Defects. *Tissue Eng Part A*. 18: 1479-1489, 2012
- Tajima S, Tobita M, Orbay H, et al. Direct and indirect effects on bone regeneration of a combination of adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma. *Tissue Eng Part A* 21: 895-905, 2015
- Horikoshi-Ishihara H, Tobita M, Tajima S, et al. Co-administration of adipose-derived stem cells and control-released basic fibroblast growth factor facilitates angiogenesis in a murine ischemic hind limb model. *J Vasc Surg* 64: 1825-1834, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tajima S, Tobita M and Mizuno H	4. 巻 33
2. 論文標題 Current status of bone regeneration using adipose-derived stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histol Histopathol	6. 最初と最後の頁 619-627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-11-942	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Orgun D and Mizuno H	4. 巻 4
2. 論文標題 Multipotency and secretome: the mechanisms behind the regenerative potential of adipose-derived stem cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plast Aesthet Res	6. 最初と最後の頁 32-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20517/2347-9264.2016.109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Mizuno H
2. 発表標題 Recent trends of adipose derived stem cells for skin restoration, repair and regeneration
3. 学会等名 10th Juntendo University in collaboration with 17th Mae Fah Luang International Conference in Dermatology Aesthetic Dermatology and Anti Aging Medicine (Bangkok, Thailand, 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuno H
2. 発表標題 Mechanism of adipose-derived stem cells in regenerative medicine
3. 学会等名 1st Annual Scientific Meeting of REJASELINDO (Surakarta, Indonesia, 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuno H
2. 発表標題 Fat grafting in plastic and regenerative surgery
3. 学会等名 1st Annual Scientific Meeting of REJASELINDO (Surakarta, Indonesia, 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuno H
2. 発表標題 “Plastic and Regenerative Surgery”: historical review and state-of-the-art clinical science
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress 2018 (Kyoto, Japan 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuno H and Karibe A
2. 発表標題 Multipotency and the secretome: the mechanisms behind the regenerative potential of ASCs
3. 学会等名 PRS KOREA 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tajima S, Tobita M and Mizuno H	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer, New York, NY	5. 総ページ数 284
3. 書名 Adipose Derived Stem Cells: Methods and Protocols, Second Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
研究分担者	林 礼人 (Hayashi Ayato) (10365645)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	飛田 護邦 (Tobita Morikuni) (10599038)	順天堂大学・革新的医療技術開発研究センター・准教授 (32620)	
研究分担者	田中 里佳 (Tanaka Rica) (70509827)	順天堂大学・医学部・先任准教授 (32620)	
研究協力者	小出 寛 (Koide Hiroshi)		