

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09237

研究課題名(和文) 動脈周囲脂肪組織由来間葉系幹細胞の機能評価と臨床応用に関する研究

研究課題名(英文) Research on functional evaluation and clinical application of mesenchymal stem cells derived from peri-arterial adipose tissue

研究代表者

大坂 基男 (Osaka, Motoo)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：60816544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化症の患者において、病変部に局在しているPVAT-MSCsを解析したところ、増殖能は低いもののSDF-1/CXCR7の発現が高く、より高いEPCを遊走能力有していた。以上の結果より、PVAT-MSCsは病気の進行に関与している可能性が示唆された。この細胞機能をin vivoで解析するためにマウス創傷治癒モデルにてPVAT-MSCsを解析したところ、治癒能力の促進が見られた。創傷の治癒は組織修復だけでなくさまざまな機能により修復されることから、炎症性サイトカイン等の発現解析、炎症性細胞の遊走などのin vitroの解析を行い一定の成果を上げることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人口構成の高齢化とともに動脈硬化性疾患もこれと平行して増加している。下肢アテローム硬化性閉塞性動脈疾患は、背景にある生活習慣病の治療による進行予防と、病変部位に対する血行再建(人工血管置換によるバイパス手術や血管拡張術)が行われている。いずれも対症療法であり、30-50%の患者に血行再建後の再閉塞を認め、下肢切断に至る例も少なくない。本研究課題の遂行により新規間葉系幹細胞を用いて効果的で安全な新しい治療法の開発に大きく貢献でき、QOLの改善など社会的意義も大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：In analysis of PVAT-MSCs in lesion site with arteriosclerosis, although the proliferation activity is low, the expression level of SDF-1/CXCR7 is high. These results suggested that PVAT-MSCs may be affect to disease progression. In order to analyze the cell function in vivo, PVAT-MSCs were analyzed using a mouse wound healing model, and it was found that the wound healing activity was increased. Since wound is repaired not only by direct tissue repair but also by various functions, we performed some in vivo assay such as expression analysis of inflammatory cytokines and migration assay of inflammatory cells and be able to find some results.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：間葉系幹細胞 SDF-1 CXCR7 創傷治癒 炎症反応

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪組織由来間葉系幹細胞 (AT-MSCs) は採取の容易さから、心筋、血管、骨軟骨、脂肪組織の再生医療に用いられている。一方 AT-MSCs の機能についてはまだ十分解明されていない。患者がもつ老化や疾患 (糖尿病、腎不全) の影響、虚血組織自体がもたらす炎症や酸化ストレスなどの細胞組織環境の悪条件や、自己幹細胞の機能障害が原因として想定されている。これまでの自己組織由来の幹細胞移植による血管再生治療の臨床試験が報告されているが、その治療効果は患者により差があり、十分なものとは言えない。

### 2. 研究の目的

間葉系幹細胞は間葉系細胞 (骨、脂肪、筋、軟骨) への分化能をもつとされ、骨、血管、心筋への再生医療への応用が期待されている。従来、骨髄や臍帯血由来のものが利用されていた。脂肪組織は皮下、筋層内、血管周囲、腹部内臓周囲、心臓・腎臓周囲など身体内のあらゆる部位に存在する。AT-MSCs はこの脂肪組織から由来する幹細胞である。多分化能を有し、身体内に広く分布する組織で、皮下からは容易かつ多量に採取しやすく、これは後に臨床応用していく上で大きな利点といえる。また間葉系幹細胞 (体性幹細胞) は ES 細胞や iPS 細胞と比較して、必ずしも分化多能性に優れるわけではないが、臨床応用に際して倫理的問題が少なく、癌化リスクが少なく、作成費用が少ないなどの利点も有する。一方、現在までに AT-MSCs の機能についてはまだ十分に解明されていない。本研究課題では AT-MSC の中でも動脈硬化が脂肪組織に与える影響に着目して、動脈周囲脂肪組織由来間葉系幹細胞 (PVAT-MSCs) の検討を行う。

現時点で PVAT-MSCs の動脈硬化による影響は明らかではない。また AT-MSCs の研究は皮下脂肪由来のものが多く使用されているが、PVAT-MSCs に焦点をあてた報告も数少ないのだが、動脈周囲脂肪組織由来 PVAT-MSCs の機能が解明されれば、動脈壁と周囲脂肪組織との相互作用を解明し、動脈硬化の病態解明に寄与するのみならず、四肢動脈硬化性閉塞性疾患に対する幹細胞移植療法での側副血行路作成の可能性や、重症心筋虚血に対する心筋内冠血行再生への応用へも道を開く可能性がある本研究課題では動脈周囲脂肪組織由来間葉系幹細胞 (PVAT-MSCs) を用いて増殖能 (proliferation)、分化能 (differentiation) の遊走能 (migration)、血管形成能 (angiogenic ability) の評価を行う。以上の評価を通じて PVAT-MSCs の動脈硬化による機能変化を解明する。これにより将来、動脈硬化性疾患患者への幹細胞自家移植に際して、至適移植条件を決定する際の基礎研究としたい。またこれらの結果を踏まえて、前臨床試験として免疫不全マウス下肢虚血モデルを用いて、ヒト AT-MSCs を虚血筋肉内移植して、その治療効果と安全性を評価したい。

### 3. 研究の方法

本研究課題に用いる検体は倫理委員会の承認のもと患者のインフォームドコンセントを得た上で、腹部大動脈瘤ステントグラフト内挿術または下肢血行再建術において手術の際に切開する大腿動脈周囲脂肪組織と皮下脂肪組織を採取した。また正常対照検体として、心臓手術患者の皮下脂肪組織を採取した。全身の動脈硬化の重症度に関する臨床的評価は、頸動脈エコー検査、ABI (ankle-brachial pressure index) 検査で評価した。除外基準: 疾患による影響を避けるため、血清クレアチニン値 2.0 mg/dl 以上の慢性腎不全患者、糖尿病患者は除外した。

(1) 皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞 (PVAT-MSCs) および動脈周囲由来間葉系幹細胞 (PVAT-MSCs) の樹立。

細断した脂肪組織を PBS 中で、コラゲナーゼで分解して遠心分離で細胞を採取して細胞培地に再懸濁する。細胞培地は IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) に加熱不活化処理した 10% FBS (ウシ胎児血清)、2 mg/ml の L-glutamine、100 units/ml のペニシリン、5 ng/ml bFGF (線維外細胞増殖因子) にて培養。研究には 3 から 8 継体培養したものを使用した。

(2) *In vitro* 解析。

1. 培養した SAT-MSCs と PVAT-MSCs の平均細胞数の比較、TIMP-1 (Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1)、EGF (Epidermal Growth Factor)、FGF (Fibroblast Growth Factor) の mRNA の発現解析により増殖能を評価した。
2. 分化培地で 30 日培養後に骨、脂肪、軟骨形成への分化能を比較評価した。
3. SDF-1、CXCR7、VEGF、TIMP-2、CCL2、IL6、IL8、MMP2 遺伝子の mRNA 発現を解析した。
4. Transwell migration assay で MSCs の遊走能の評価を行った。
5. Endothelial progenitor cells (EPCs) または Endothelial cells (ECs) との共培養での Transwell migration assay で MSCs の遊走能を評価した。

6. EPCs (endothelial progenitor cells) または ECs (endothelial cells) との共培養での Survival assay を行った。EPCs (endothelial progenitor cells) または ECs (endothelial cells) との共培養での管腔形成能の評価と VEGF の誘導を評価した。

### (3) 前臨床試験

免疫不全マウス下肢虚血モデル(総大腿動脈と分枝を結紮切離)とコントロールマウス(虚血モデルと同部位の切開操作のみ)を用いて、ヒト MSCs を虚血筋肉内移植した後、血流回復度評価としてレーザードップラーによる組織血流量測定と alkaline phosphatase 染色による血管密度測定、虚血肢内転筋採取による VEGF、bFGF 発現量等を測定評価した。

## 4. 研究成果

これまでの preliminary なデータでは、血管周囲脂肪組織由来の PVAT-MSCs は皮下脂肪組織由来の AT-MSCs に比較して、増殖能は減弱しているが、分化能に差はなかった。また、HIF-1 $\alpha$  の mRNA レベルでの発現が増加して、SDF-1、CXCR7、VEGF の発現が増加していることがわかっていった。動脈硬化では低酸素による HIF-1 活性化に伴う発現制御を通じて血管形成に関わるタンパク質の遺伝子が発現していることが分かった。PVAT-MSCs は虚血環境による低酸素の刺激で、増殖能は抑制されるものの、血管形成能が高い状態になっていることが示唆された。

脂肪由来間葉系幹細胞(AT-MSCs)は採取・培養が容易であり再生医療のソースとして着目されている。一方、その治癒効果にはバラツキがあり、ドナーの年齢や基礎疾患の影響、レシピエントの虚血組織自体がもたらす炎症や酸化ストレスなどの微小環境が大きく影響する。本課題では新しい細胞ソースとして血管周囲脂肪組織由来間葉系幹細胞(PVAT-MSCs)に着目し、動脈硬化病変部周辺で脂肪組織に起きている現象を、皮下組織由来の AT-MSCs と比較検討した。その結果、動脈硬化症患者由来の皮下脂肪由来 AT-MSCs は増殖能が低下していることが明らかとなった。またこの細胞においては CXCR7 ケモカインの活性が増大しており動脈硬化がケモカイン活性に影響を与えていることが分かった。さらに動脈硬化症の患者において、より血管病変部に近いところに局在している PVAT-MSCs を採取し解析したところ、増殖能は低いものの SDF-1 とそのレセプターである CXCR7 の発現が高く、より高い EPC を遊走させる能力を有していた。このように健常者由来の AT-MSC とは異なる性質を有しており、このことが PVAT-MSCs は病気の進行に関与している可能性が示唆された。この細胞機能を創傷治癒能力で評価するために *in vivo* モデルを用いて解析した。マウス背部皮膚に難治性形状の創傷を作成し PVAT-MSCs を患部に移植し解析を行ったところ、治癒能力の促進が見られた。創傷の治癒には単なる組織修復ではなく炎症や血流の改善などさまざまな機能により修復されることから、炎症性サイトカイン等の発現解析、炎症性細胞の遊走の違いなどの原因を探るために *in vitro* の解析を行った。さらにそれらの結果を踏まえ *in vivo* 解析としてそれぞれの解析に適した創傷の治癒モデルを作成し、MSCs を虚血部位に移植し移植細胞の再生能力を再評価する必要がある。本研究において MSC だけでなく近年着目されている MSC 由来の EV(細胞外小胞)が炎症反応に関与していることが明らかとなり、創傷治癒に重要な炎症においても作用する事を強く示唆する結果が得られ、一定の成果を上げることが出来た。

ここまでの解析により動脈硬化症の患者由来の脂肪由来間葉系幹細胞でも、皮下脂肪組織由来(AT-MSCs)と動脈周囲の脂肪組織由来の物(PVAT-MSCs)では性質が異なっていたことが明らかになった。PVAT-MSCs では増殖率が低いが SDF-1/CXCR7 の発現が高く、EPC 遊走を介して血管新生を誘発している可能性が *in vitro* において示された、実際に生体内では周囲の環境など複雑な要因が関係してくるために、どのような働きをするのかは異なる *in vivo* の実験系でさらに詳細に検証する必要がある。今後は前臨床試験として免疫不全マウスを用いて下肢虚血モデルを作成し、解析対象となる MSCs を虚血部位に移植し下肢血流量や血管密度を計測、虚血組織内の VEGF や bFGF 等の関連因子の発現を解析し、その機能的な特徴を明確にしていく。

### <引用文献>

- ① Khanh VC, Zulkifli AF, Tokunaga C, Yamashita T, Hiramatsu Y, Ohneda O. Aging impairs beige adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells via the reduced expression of Sirtuin 1. *Biochem Biophys Res Commun* (2018) 5003:682-690.

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 Khanh Vuong Cat, Fukushige Mizuho, Chang Yun Hsuan, Hoang Ngo Nhat, Yamashita Toshiharu, Obata-Yasuoka Mana, Hamada Hiromi, Osaka Motoo, Hiramatsu Yuji, Ohneda Osamu	4. 巻 30
2. 論文標題 Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Reduce SARS-CoV2-Induced Inflammatory Cytokines Under High Glucose and Uremic Toxin Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 758 ~ 772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/scd.2021.0065	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 Khanh Vuong Cat, Yamashita Toshiharu, Ohneda Kinuko, Tokunaga Chiho, Kato Hideyuki, Osaka Motoo, Hiramatsu Yuji, Ohneda Osamu	4. 巻 10
2. 論文標題 Rejuvenation of mesenchymal stem cells by extracellular vesicles inhibits the elevation of reactive oxygen species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74444-8	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 Khanh Vuong Cat, Fukushige Mizuho, Moriguchi Kana, Yamashita Toshiharu, Osaka Motoo, Hiramatsu Yuji, Ohneda Osamu	4. 巻 29
2. 論文標題 Type 2 Diabetes Mellitus Induced Paracrine Effects on Breast Cancer Metastasis Through Extracellular Vesicles Derived from Human Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 1382 ~ 1394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/scd.2020.0126	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0件

〔図書〕 計0件

〔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	大根田 修  (Ohneda Osamu)  (30311872)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------