

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08721

研究課題名（和文）脂肪組織由来間葉系幹細胞-造血幹細胞における代謝経路解析：抗加齢作用に注目して

研究課題名（英文）Analysis of metabolic pathways in adipose tissue-derived mesenchymal stem cells-hematopoietic stem cells: focus on anti-aging effects

研究代表者

中山 享之（Nakayama, Takayuki）

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：00456659

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）：我々の観察では、BMSCは、脂肪細胞と骨芽細胞に分化したが、ADSCにおいては骨芽細胞にほとんど分化しなかった。ADSCは、骨芽細胞への分化を防ぐ転写因子Ebf3を豊富に発現していた。そこでEbf3をノックダウンして機能の解析を試みたが、うまく機能しなかった。ADSCは、BMSCよりも強い血液凝固作用（組織修復を促進する）を有していたため方針転換を行いその作用について解析を行なっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の観察では、BMSCは、脂肪細胞と骨芽細胞に分化したが、ADSCにおいては脂肪細胞によく分化したが骨芽細胞にほとんど分化しなかった。そのためADSCにおいては、Ebf3が強力に骨芽細胞分化を抑制することにより造血支持機能を残存していると予想した。そこでEbf3をノックダウンして機能の解析を試みたが、うまく機能しなかった。ADSCは、BMSCよりも強い血液凝固作用（組織修復を促進する）を有していたため方針転換を行いADSCのその作用について解析を行なっている。骨髄における造血と血液凝固の相関は、ほとんど報告されておらず、新たな研究テーマとなりうる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We found that ADSCs have better hematopoietic support than BMSCs, but the mechanism is unknown; it has been reported that the transcription factor Ebf3 is abundantly expressed in BMSCs and maintains hematopoietic support by preventing differentiation into osteoblasts. We observed that BMSCs differentiated into adipocytes and osteoblasts, while ADSCs hardly differentiated into osteoblasts, and ADSCs abundantly expressed Ebf3. Since ADSCs have stronger blood coagulation activity than BMSCs (which promotes tissue repair), we have changed the course of our research and are now analyzing ADSCs for their effects on blood coagulation.

研究分野：血液内科学

キーワード：血液凝固 脂肪組織由来間葉系幹細胞 造血支持能力

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) が骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) よりも造血支持において優れた細胞ソースであることを見出した[Am J Pathol. 2010]。その特性を臨床に応用すべく、臍帯血移植時に ADSC を併用し生着不全予防と造血回復促進を行うことを目的とした臨床試験を遂行中である (2018 年 9 月に厚労省再生医療等部会の承認取得。承認番号: PA8180001)。ADSC は、BMSC と比較して増殖能が高く、分泌されるサイトカイン等も多いことより細胞活性が高いと報告されている。しかしながら造血に直接作用する、SCF や G-CSF 等のサイトカインや VCAM-1 といった接着因子の発現量は、ADSC と BMSC において差異がなく[Cell Physiol Biochem.2004, Exp Hematol. 2005]、ADSC が有する高い造血支持能力の理由は、未解明となっている。骨髄単核球と ADSC を併用移植したマウス、骨髄単核球と BMSC を併用移植したマウス、骨髄単核球のみを移植したマウス、それぞれの骨髄から単核球を生着後に取り出し、他のマウスへ 2 次移植を行ったところ造血回復が最も速やかであったのは、骨髄単核球と ADSC を併用移植したマウスから取り出した単核球を投与したマウス群であった[Am J Pathol. 2010]。このことより骨髄単核球と ADSC を併用移植したマウスにおける骨髄には、造血幹細胞が他の群よりも豊富に含まれていたと推定される。また促進老化を特徴とする SAMP マウスへ定期的に ADSC (106 個/回/週) を投与したところ、非投与群と比較して脱毛の進行が緩やかであった (未発表データ。骨髄を含む他の臓器は解析中)。脱毛は、毛母細胞の老化によるものと考えられるため ADSC には抗老化作用がある可能性が存在する。マウスでは、若い個体の細胞活性が高い血液は、経年個体の筋肉や肝臓の細胞を若返らせる[Nature.2005]。ADSC は、BMSC と比較して細胞活性が高いと報告されており、その活性の高さにて造血幹細胞に対しても抗老化作用を有するのではないかと想定した。HSC の加齢に伴い、その絶対数が減少することは、既に報告されているので[Blood.2017]、ADSC は、HSC の抗老化作用を併せ持つためより造血支持作用が強いのではないかと考えた。次に ADSC が、どのように HSC の抗加齢作用を有しているか検討するにあたり代謝経路に着目した。その理由として、1) 間葉系幹細胞 (MSC) のマイクロアレイ解析を行ったところアミノ酸代謝などのメタボローム関連遺伝子と MSC の造血支持能力に関連が認められたこと[Sci Rep. 2016]。2) 代謝と幹細胞の加齢は、エピジェネティクス等を介して密接に関連していると報告されていること[Cell metabolism. 2017] があげられる。

以上より我々の仮説をまとめると以下のようなになる。

ADSC の高い細胞活性 代謝を通じた HSC への刺激 エピジェネティクス等を介した遺伝子発現変化 HSC の抗老化作用ならびにその分化能や自己複製能の向上 造血能力増強

### 2. 研究の目的

造血機構の解明は、学術的なトピックスとなっており研究が鋭意に進められている。本研究では、ADSC と BMSC を比較することにより、重要なメカニズムを比較的容易に同定することが可能と考えられる。また造血微小環境と HSC の相互作用も CXCL12 などを筆頭に解明されてきている[Genes & Dev. 2018]。しかし幹細胞の fate は、代謝による制御を受けていることが、報告されている[Cell metabolism. 2017]にもかかわらず、HSC が造血微小環境からどのような代謝制御を受けているかの報告は、皆無である。よって本研究は非常に独自性が高いものと考えられる。間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織、歯髄、臍帯など多様な組織から樹立出来るが、興味深いことに樹立部位によって特性や増殖能が異なるとされる。だが、それがどのように生ずるかを解析した研究は少ない。その点でも本研究は、非常にユニークと考えられる。上述のように我々は、ADSC がもつ造血支持能力を利用し臍帯血移植における生着不全及び遅延を予防する臨床研究を推進している。先行治療は存在せず造血組織を速やかに再生させる初めての治療となる可能性を秘めている。2017 年に特許出願を終えており将来的に細胞療法剤として上市することも視野にいれている。以上より本研究は、学術的な課題を基礎的に解明するばかりか、その成果を社会に還元出来る可能性を有するものと考察される。

### 3. 研究の方法

**ADSC によって引き起こされる造血幹細胞におけるメタボローム、トランスクリプトームおよびエピジェネティクスの変化**

・ 6-well plate に ADSC 及び BMSC の cell layer を作成し、その上にヒト CD34+HSC を添加する。48~72 時間後に血球成分だけを回収する。マススペクトロメトリー、マイクロアレイ法などによりメタボローム変化や RNA 発現の変化の差異を 2 群間で解析する。FACS による TUNEL 法により DNA ダメージの変化も検出する。すでに HSC の老化に関する先行研究は存在するので、その結果を参照する。転写因子結合サイトデータベースである TRANSFAC などを利用し注目すべき遺伝子群を選択する。メタボローム変化とそれらの遺伝子群がどのように関連するかを検証

するためにクロマチン免疫沈降を施行し、タンパク-DNA 作用を解析する。対象遺伝子群が、多岐にわたると予想される場合には、ChIP-on-chip 法を利用する。コントロールは、BMSC 群とする。以上の技術は、キット製品も市販化されており外部委託も可能なため遂行可能な計画と考えられる。

・ in vitro でのデータが解析できたら、次は in vivo での解析を行う。月齢 20 ヶ月の加齢マウスもしくは老化促進マウスの脛骨に ADSC もしくは BMSC (106 個/個体) を骨髄内投与する (1 回/2 週間)。マウス脛骨への骨髄内投与法は、すでに習得している。2 ヶ月間の投与後に屠殺後に骨髄を取り出し病理学的検索 (細胞密度、線維化の有無等) FACS による血球分画の評価 (M/E 比、リンパ球数、好中球数、幹細胞数等の評価) を行う。骨髄より幹細胞 (LSK) 分画をソートし、マススペクトロメトリー、マイクロアレイ法などによりメタボローム変化や RNA 発現の変化を解析し in vitro の実験結果と整合性があるか検証する。

#### 造血幹細胞における、ADSC 刺激から抗老化作用に至るシグナル伝達経路の同定

・ 以上で得られた結果とこれまでに行った間葉系幹細胞のマイクロアレイ結果を参照して、途中のシグナル伝達経路を想定する。具体的には、抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティング (WB) 法により確認を行う。個別のタンパク質を対象とした WB 法でうまく伝達経路を特定できない場合には、シグナル伝達分子の網羅的解析を市販化されているキット製品を用いて実施する。転写因子結合サイトデータベースである TRANSFAC を使いシグナル伝達経路を順に上流へ辿っていく手法も選択肢の 1 つである。

・ 以上の実験によりシグナル伝達経路が同定されたら、それが低分子化合物等により再現もしくは阻害されるか coculture assay や加齢マウスを使って検討する。候補物質の選定には、米国 NCI が提供している DTP Open Chemical Repository 等を利用する。

#### 4. 研究成果

我々の観察では、BMSC は、脂肪細胞と骨芽細胞に分化したが、ADSC においては脂肪細胞によく分化したが骨芽細胞にほとんど分化しなかった。そのため ADSC においては、Ebf3 が強力に骨芽細胞分化を抑制することにより造血支持機能を残存していると予想した。そこで Ebf3 をノックダウンして機能の解析を試みたが、うまく機能しなかった。ADSC は、BMSC よりも強い血液凝固作用 (組織修復を促進する) を有していたため方針転換を行い ADSC のその作用について解析を行っている。骨髄における造血と血液凝固の相関は、ほとんど報告されておらず、新たな研究テーマとなりうる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kamiya Hideki, Shibata Yuka, Himeno Tatsuhiro, Tani Hiroya, Nakayama Takayuki, Murotani Kenta, Hirai Nobuhiro, Kawai Miyuka, Asada Yamada Yuri, Asano Hayami Emi, Nakai Shimoda Hiromi, Yamada Yuichiro, Ishikawa Takahiro, Morishita Yoshiaki, Kondo Masaki, Tsunekawa Shin, Kato Yoshiro, Baba Masayuki, Nakamura Jiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Point of care nerve conduction device predicts the severity of diabetic polyneuropathy: A quantitative, but easy to use, prediction model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 583 ~ 591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13386	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 Takami Akiyoshi, Mizuno Shohei, Nakamura Ayano, Kanasugi Jo, Yamamoto Hidesuke, Vu?Quang Lam, Nakagami Yuya, Nakano Yuta, Yamada Saki, Matsumura Saori, Takasugi Souichi, Uchino Kaori, Horio Tomohiro, Murakami Satsuki, Oohigashi Yuka, Nakayama Takayuki, Tani Hiroya, Enomoto Megumi, Hanamura Ichiro	4. 巻 144
2. 論文標題 Pretreatment Immature Platelet Fraction as a Surrogate of Reticulated Platelets Predicts the Response to Corticosteroids in Adults with Immune Thrombocytopenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Haematologica	6. 最初と最後の頁 345 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000510460	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 Yamada Y., Himeno T., Tsuboi K., Shibata Y., Kawai M., Asada Yamada Y., Hayashi Y., Asano Hayami E., Hayami T., Ishida Y., Ejima Y., Motegi M., Asano S., Kato M., Nagao E., Nakai Shimoda H., Ishikawa T., Morishita Y.i, Kondo M., Tsunekawa S., Kato Y., Nakayama T., Kamei M., Nakamura J., Kamiya H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Alterations of retinal thickness measured by optical coherence tomography correlate with neurophysiological measures in diabetic polyneuropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1430 ~ 1441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13476	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 Ishiyama K, Ogawa M, Kato H, Takeshita, Ueda R, Nakayama T	4. 巻 14
2. 論文標題 Serum produced from expired fresh frozen plasma and cryosupernatant supports the proliferation of human cells: cost-effective alternatives to fetal bovine serum.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Blood Disord Transfus	6. 最初と最後の頁 1000562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 間葉系幹細胞を含有する局所止血剤	発明者 中山享之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-203497	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	都築 忍 (Tsuzuki Shinobu)  (00342965)	愛知医科大学・医学部・教授  (33920)	

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
---------	---------