

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659834

研究課題名(和文)リンパ浮腫治療法開発のための脂肪由来幹細胞に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic study on adipose-derived stem cells for a therapy of lymphedema

研究代表者

西野 健一(Nishino, Kenichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00138471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来幹細胞分泌因子のリンパ管内皮細胞に対するリンパ管新生の直接作用の有無については不明である。本研究では、リンパ管内皮細胞を脂肪由来幹細胞分泌因子で刺激し、リンパ管内皮細胞の増殖、移動、管腔形成への効果をリコンビナントVEGF-C製剤と比較して評価した。さらに、脂肪由来幹細胞の分泌するリンパ管新生因子の定量を行った。結果、脂肪由来幹細胞分泌因子は、リンパ管内皮細胞の増殖、移動、管腔形成を促進し、リンパ管新生作用を示した。いくつかのリンパ管新生因子が飢餓状態で強く分泌される所見も見られた。脂肪由来幹細胞がリンパ浮腫の新しい治療法となり得るかもしれないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：It remains unclear whether ADSCs have direct effects on lymphatic endothelial cells (LECs). In this study, human LECs were treated with murine ADSC-derived conditioned media. Changes in LEC proliferation, migration, and tube formation were assessed, with recombinant human vascular endothelial growth factor-C used as a positive control. Additionally, the expression of several lymphangiogenic factors in ADSCs was examined. Factors secreted by ADSCs induced LEC proliferation, migration, and tube formation more potently than recombinant human vascular endothelial growth factor-C. Some of the lymphangiogenic factors of ADSCs were dramatically up-regulated under serum-starved conditions. These data indicate that ADSCs could directly contribute to lymphangiogenesis via secretory factors in vitro and may thus provide a therapeutic modality for patients with lymphedema.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、その多分化能および採取の簡便性から、骨髄幹細胞移植などが臨床応用の実用段階に入ってきている。近年、脂肪組織内にも間葉系幹細胞が存在することが明らかになり、骨髄採取に比較し数倍の間葉系細胞をより低侵襲に採取できることから注目が集まっている。この脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: ADSC) は間葉系幹細胞として脂肪、骨、軟骨に分化する能力報告されている。当院では ADSC 分離装置 (オリンパス・サイトリ社製) を 2009 年 3 月に手術部に導入し、臨床応用に向けて既に各科における脂肪由来幹細胞の基礎研究が始まっている。当科でも末梢神経再生への応用に向けての研究に取り組んでおり、その神経保護作用などに関する知見を見出している。

多能性幹細胞のリンパ管再生能力に関しては、これまでに胚性幹細胞や骨髄由来幹細胞に関して報告があるが、ADSC のリンパ管新生においては、その重要性や治療への価値についてはこれまでに報告がなく、解明されていない。胚性幹細胞や骨髄由来幹細胞の研究では、それらのリンパ管内皮細胞への分化誘導が可能であることが報告されている。ADSC からこれらのようなリンパ管再生の可能性が見出されれば、リンパ管に関わる疾患への応用が期待できるようになる。

形成外科が取り扱う疾患であるリンパ浮腫はリンパ管の低形成や閉塞あるいは機能不全によって、末梢組織間隙にリンパ液を貯留する病態であるが、本邦では乳癌や子宮癌などの外科手術によるリンパ節郭清とそれに続く放射線治療によって引き起こされるものが最も多い。現在でも圧迫などの保存的療法が治療の主体であり、リンパ管-細静脈吻合などの外科的治療の進化もあるが劇的な長期成績をあげておらず、未だ治療困難な病態であり、新たな治療の選択肢が切望される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性疾患であるリンパ浮腫に対し、細胞移植療法のひとつとしての ADSC の可能性を示すことにある。このような細胞移植療法のアプローチとは別に、ADSC は様々な増殖因子やサイトカインを分泌することが知られており、この作用を治療に応用するという考え方がある (cell supportive therapy)。Cell supportive therapy のアプローチから ADSC のリンパ管再生作用の可能性を検討する。

ADSC がリンパ管新生の主体であるリンパ管内皮細胞 (lymphatic endothelial cell: LEC) に直接作用するかどうかは今のところ証明されていない。そこで、我々は ADSC の分泌因子が LEC に対してリンパ管新生作用を示すかどうかを検討した。さらに、ADSC を異なる培地で培養した際のリンパ管新生因子

の発現と分泌を計測し、そして ADSC 分泌因子の LEC 特異的遺伝子への影響を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) LEC の培養

LEC はヒト細胞株 (HMVEC-dLy Ad: Lonza 社, スイス) を購入した。専用培地である endothelial growth medium-2-MV (EGM-2-MV) で培養した。これは、基本培地である endothelial basal medium-2 (EBM-2) に血清とサイトカインなどを添加したものである。

### (2) ADSC の分離・培養

ADSC は 8 週齢、雄の C57Bl/6 マウスの鼠径部皮下脂肪から酵素処理、遠心分離により分離し、血清入り Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) で培養した。以降の全ての実験には 3 継代したものを使用した。

### (3) ADSC コンディショニングメディア (ADSC-CM) の調整

10 cm 培養ディッシュでコンフルエントな ADSC を LEC の基本培地である EBM-2 10 ml で 48 時間培養したものを ADSC-CM として回収した。

### (4) 増殖アッセイ、移動アッセイ、管腔形成アッセイ

LEC を ADSC-CM で処理した際のリンパ管新生のステップである LEC の増殖、移動、管腔形成への影響を、それぞれ WST-8 アッセイ、modified Boyden チャンバーアッセイ、Matrigel ベースチューブフォーメーションアッセイにより評価した。増殖のアッセイは、96 ウェルプレートに  $1.5 \times 10^4$  個の LEC を蒔き、一晚増殖メディア EGM-2-MV で培養してプレートに LEC が接着した時点でメディアを ADSC-CM に入れ替え、48 時間作用後に WST-8 アッセイで評価した。移動のアッセイは、 $8 \mu\text{m}$  ポア、6.5 mm 直径のトランスウェルチャンバーのアップパーチャンバーに  $1 \times 10^5$  個の LEC を入れ、ローワーチャンバーに ADSC-CM を入れ、16 時間作用後にトランスウェルチャンバーの下面に移動した細胞を固定・染色し、移動した細胞数を顕微鏡 100 倍視野下で計測した。管腔形成のアッセイは、24 ウェルプレートを  $100 \mu\text{l}$  の Growth-Factor Reduced Matrigel でコーティングした上に  $5 \times 10^4$  個の LEC を蒔き、ADSC-CM を加え 8 時間作用後に顕微鏡 40 倍視野下に撮影し、形成されたチューブの長さを、画像解析ソフト (NIH Image J) を用いて測定した。リコンビナント VEGF-C (rVEGF-C) を EBM-2 に種々の濃度 (0, 1, 10, 100 ng/ml) で加えた物をコントロールとして比較した。

### (5) 定量 PCR (polymerase chain reaction) 法による ADSC におけるリンパ管新生因子の遺伝子発現と ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法による ADSC-CM におけるリンパ管新生因子のタンパク分泌の解析

今回、ADSC-CM の採取には EBM-2 を用いた

が、これは LEC が DMEM 中ではほとんど生存できないためである。そこで、メジウムの違いと血清の有無がリンパ管新生因子の発現に及ぼすかどうかを検討するために、1 × 10<sup>4</sup> 個の ADSC を 6 cm ディッシュに蒔き、(a):血清入り DMEM で 72 時間培養したもの、(b):EGM-2-MV で 72 時間培養したもの、(c):条件(a)で培養した後、血清なしの DMEM で 48 時間培養したもの、(d):条件(a)で培養した後、EBM-2 で 48 時間培養したものの 4 つの条件から RNA と培養上清を回収し、ADSC のリンパ管新生因子の測定を定量 PCR と ELISA で行った。500 ng 分のトータル RNA を逆転写し、トータル RNA 換算で 1.25 ng 分の cDNA をサイバグリーン試薬を用いて定量 PCR 解析を行った。リンパ管新生作用を示す成長因子の内 ADSC でその mRNA 発現が過去に報告されている 7 つの因子 (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, fibroblast growth factor-2: FGF-2, hepatocyte growth factor: HGF, angiopoietin-1: Ang-1, insulin-like growth factor-1: IGF-1) の発現を定量 PCR で比較した。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を内部コントロールとした。培養上清中の VEGF-A, VEGF-C, IGF-1 のタンパク濃度を ELISA キットで測定した。(6)定量 PCR 法による ADSC-CM の LEC 特異的遺伝子への影響の解析 (申請者が担当)

ADSC-CM を LEC に作用させた際の LEC 特異的遺伝子発現の経時的 (8 時間, 16 時間, 48 時間) 変化を、EBM-2 あるいは VEGF-C 100 ng/ml を作用させた場合と比較して、定量 PCR で比較した。定量する LEC 特異的遺伝子として、転写因子である prospero homeobox 1 (Prox1)、VEGF-C の receptor である VEGFR-3、LEC 特異的膜タンパクである podoplanin の 3 つを選択した。

#### (7)統計学的解析

多群間比較は、一元配置分散分析法で行った後、Tukey 法による多重比較を行った。解析には GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, アメリカ)を用いた。P < 0.05 を統計学的有意とした。

## 4. 研究成果

### (1)ADSC-CM の LEC 増殖・移動・管腔形成作用

ADSC の分泌因子は VEGF-C よりも強力に LEC の増殖、移動、管腔形成を促進した (P < 0.001)。VEGF-C (濃度: 0, 1, 10, 100 ng/ml) は、用量依存性の作用を示したが、移動と管腔形成のアッセイにおいて、濃度 100 ng/ml で作用が頭打ちとなった。

### (2)ADSC におけるリンパ管新生因子の発現と分泌

VEGF-A と FGF-2 の発現は、無血清培地下でゆるやかに減少する傾向が見られた。対照的に、VEGF-D、HGF、Ang-1、IGF-1 の発現は、無血清培地下で数倍上昇した。VEGF-C の発現は EGM-2-MV 培養下で最大値を示した。ADSC は EGM-2 という血管内皮用の培地で培養する

と内皮細胞に分化するという報告があるので、EGM-2-MV 培養下での VEGF-C の高発現は内皮細胞方向への分化を反映しているのかもしれない。ELISA の結果では、VEGF-A と IGF-1 は定量 PCR と同様な傾向を示した。VEGF-C は、定量 PCR と異なる傾向を示し、IGF-1 と同様に無血清培地下で最大の分泌を示した。

(3)ADSC-CM の LEC 特異的遺伝子発現への影響 podoplanin の発現は EBM-2、VEGF-C、ADSC-CM の 3 群間で発現に有意差を認めなかった。Prox1 と VEGF-R の発現は、8 時間処置では 3 群間に発現の有意差を認めず、16 時間処置 ADSC-CM 群で他の 2 群と比べて低下を示したが、48 時間時点で他の 2 群とほぼ同レベルまで回復した。

ADSC-CM は LEC の増殖・移動・管腔形成を強力に促進することが確認された。これは、ADSC の分泌因子が LEC に直接作用してリンパ管新生を起こすことを示唆している。rVEGF-C の作用は 100 ng/ml でプラトーに達したが、ADSC-CM は VEGF-C よりも強力な作用を示した。ADSC は複数のリンパ管新生因子を分泌して相乗的に作用していることが示唆された。

定量 PCR と ELISA において、いくつかの因子が無血清下で劇的に発現が上昇する現象が見られた。無血清のような細胞にとって生存に不利な環境で ADSC が複数の因子の発現を上昇させる現象は、リンパ浮腫という ADSC の生育にとって良いとは言えない環境で、リンパ管新生を促進するのに有利に働くと考えられた。

ADSC-CM は LEC に対してリンパ管新生作用を示しながらも、Prox1 の発現を一時的に低下させるという興味深い現象を示した。このような現象を示す因子として interleukin-8 (IL-8)が報告されている。IL-8 は、セルサイクルインヒビターの一つである p57Kip2 の発現を、そのポジティブレギュレーターである Prox1 をダウンレギュレートすることで抑制し LEC を増殖させるとされている。ADSC-CM の LEC への作用は今後も検討が必要であると考えられた。

結果として、ADSC-CM は LEC に直接作用してリンパ管新生を促進し、その作用は rVEGF-C 単独よりも強力であった。ADSC が複数のリンパ管新生因子を分泌することと、それらを介してリンパ管新生を誘導することを確認した。ADSC はリンパ浮腫の新しい治療法として期待されるものであると考えられた。

## 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)

Kohsuke Takeda, Yoshihiro Sowa, Kenichi Nishino, Kyoko Itoh, Shinji Fushiki. Adipose-derived stem cells promote proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells in vitro by secreting lymphangiogenic factors, 査読あり, Epub ahead of print  
〔学会発表〕(計 2件)

武田孝輔、素輪善弘、西野健一、伏木信次 . 脂肪由来幹細胞分泌因子のリンパ管内皮細胞に対する直接作用の検討 . 第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会、2013 年 11 月 7 日 ~ 8 日、新潟

武田孝輔、素輪善弘、西野健一、伏木信次 . 脂肪由来幹細胞分泌因子はリンパ管内皮細胞の増殖、移動、管腔形成を促進する : リンパ浮腫治療への期待 . 第 43 回日本創傷治療学会、2013 年 11 月 14 日 ~ 16 日、大分

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西野 健一 (NISHINO, Kenichi)  
京都府立医科大学大学院医学研究科形成外科学・准教授  
研究者番号 : 00138471

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :