

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700988

研究課題名(和文) 脂肪細胞を用いたガン治療の可能性について

研究課題名(英文) A possibility of cancer therapy by using adipocytes

研究代表者

萩倉 一博 (Hagikura, Kazuhiro)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：20613269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：がん組織周囲の成熟脂肪細胞の脱分化と腫瘍血管新生への影響について研究を行った。がん化した乳腺上皮細胞と脂肪細胞を共培養したところ脂肪細胞の脱分化が促進された。次に脱分化脂肪細胞と血管内皮細胞の3次元培養を行ったところ脱分化脂肪細胞は血管に付着し血管壁細胞となった。脱分化脂肪細胞とがん細胞のマウス皮下移植では腫瘍縮小効果は見られなかったが、血管壁細胞へ分化した脱分化脂肪細胞による腫瘍血管の成熟化が見られた。これらより、がん細胞の刺激で脱分化した脂肪細胞は脆弱な腫瘍血管に付着して腫瘍血管の成熟化に関与することが示唆され、本結果から将来、がん微小環境を標的とした細胞移植治療の可能性が期待された。

研究成果の概要(英文)：This project was designed to ascertain the dedifferentiation of adipocytes in cancer tissue and stabilization of tumor angiogenesis by pericytes derived from adipocytes. Mature adipocytes co-cultured with TGF-beta treated NMuMG cells (EMT cells) were enhanced dedifferentiation. Mouse dedifferentiated fat cells (DFAT) were migrated to endothelial tube formations in 3D gel assay, and expressed pericyte markers, NG2 and ASMA. When cancer cells and DFAT were transplanted into mouse subcutaneous tissue, DFAT were observed on the surface of tumor vessels expressing NG2 and reduced vessel density in cancer tissue. These findings suggest that some signals from cancer cells stimulate dedifferentiation of mature adipocytes and these dedifferentiated adipocytes enhanced stabilization of tumor angiogenesis by becoming the source of pericytes.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん微小環境 血管壁細胞 腫瘍血管新生

1. 研究開始当初の背景

これまで脂肪細胞とは、生体内で余剰エネルギーを貯蔵する細胞として理解されてきた。しかし本学では、成熟脂肪細胞が脱分化して多能性幹細胞となることを *in vitro* で証明し、この脱分化成熟脂肪細胞を DFAT (Dedifferentiated Fat Cell) と名付け、これまで多くの論文を発表してきた(Yagi K et al., *Biochem Biophys Res Commun*.2004 など)。また我々は、自己皮下脂肪組織より DFAT を作製し、骨や平滑筋に分化誘導したのち自家移植するというヒトへの治療応用を目的とした研究を行っており、近年 DFAT は、ES 細胞や iPS 細胞と並ぶ、実現可能な再生医療の細胞ソースとして国内外で注目されている。

これまで DFAT は、体外で人工的に培養して作られた人工細胞で、通常生体内では脂肪細胞は脱分化しないであろうと考えられてきた。しかし我々は、脂肪組織より脂肪細胞を単離する際に同じく分離される脂肪由来幹細胞 (ASC: Adipostissue derived stem cell) の分化能やタンパク発現を解析したところ、成熟脂肪細胞から作製した DFAT と酷似していることを確認した(データ未発表)。このことから、生体内でも成熟脂肪細胞は多分化能を持つ ASC と同様の細胞に脱分化し、正常の脂肪組織中で脱分化脂肪細胞として存在していると推測された。更に我々は、培養マウス DFAT でマイクロアレイやプロテインアレイを行ったところ、HGF (hepatocyte growth factor) や PDGF-B (platelet derived growth factor B) など、多くのタンパク発現ががん微小環境で見られるがん関連繊維芽細胞 (CAF: Cancer-associated fibroblast) と類似していることを確認した(データ未発表)。このことより、がん組織においては、がん細胞からの何らかのシグナルによって成熟脂肪細胞は脱分化し、がん組織中の線維芽細胞や血管壁細胞に分化して、がんの浸潤

や遠隔転移に大きな役割を担っているのではと考えられた。

2. 研究の目的

我々はこれまで、成熟脂肪細胞が多分化能をもつ細胞に脱分化することを *in vitro* で証明してきた。そこで今回は、

(1) 生体内、特にがん微小環境における成熟脂肪細胞の脱分化現象を確認すると同時に、その制御機構を解明すること

(2) DFAT はがん微小環境中で血管壁細胞や繊維芽細胞に分化して腫瘍血管新生に関与するかどうかを明らかにすること

を目的とした。そして最終的には、生体内における脂肪細胞の分化を人工的に制御し、がん組織における血管新生を抑制してがんの浸潤、転移を抑え、脂肪細胞を用いたがん治療を確立することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス DFAT の作製法の確立

マウス脂肪細胞の脱分化効率の検討(酸素濃度、グルコース濃度、FBS 濃度、増殖因子添加、コーティングなど)

(2) がん細胞からの因子によるマウス脂肪細胞の脱分化促進作用についての検討(マウス肺がん細胞: LLC, またはマウス乳がん細胞: NMuMG、EMT6 と脂肪細胞の共培養など)

(3) マウス DFAT の血管壁細胞への分化の検討(DFAT と血管内皮細胞の共培養または 3 次元培養の後、免疫染色、qPCR を施行)

(4) がん細胞皮下移植マウスにおける GFP 発現 DFAT 共移植実験

(5) AP2-Cre マウス(脂肪細胞特異的 Cre 発現マウス)と Rosa26-YFP マウスの交配から脂肪細胞特異的 GFP 発現マウスを作製し、がん細胞を皮下移植した後、がん組織中の脂肪細胞由来繊維芽細胞の存在を確認する

4. 研究成果

本研究の目的である脂肪細胞の脱分化制御機構の解明とがん周囲の微小環境との関連性について、最初に *in vitro* の実験を中心に行った。

(1)がん細胞からの刺激により成熟脂肪細胞の脱分化は促進された

まずマウス DFAT の作製方法、至適培養条件の検討を行ったところ、最も重要な因子は FBS 濃度と系代の時期であることがわかった(詳細は省略)。次に、がん細胞と脂肪細胞の共培養で脂肪細胞の脱分化が促進されるかを確認する目的で、マウス乳腺上皮細胞である NMuMG 細胞を用いてマウス DFAT との共培養を行った。まず NMuMG 細胞を TGF で前処理して、がん組織で多く見られるような上皮間葉移行 (EMT; Epithelial mesenchymal transition) を起こさせた細胞とマウス脂肪細胞を共培養したところ、正常 NMuMG 細胞に比べて脂肪細胞の脱分化が促進するという結果が得られた。このことより、正常乳腺細胞またはマウス乳がん細胞が EMT を起こすと、その EMT 細胞から出る何らかの液性因子によって周囲の成熟脂肪細胞の脱分化が促進されることが予想され、それらの脱分化細胞ががん微小環境の形成に関与している可能性が示唆された。

(2)脱分化脂肪細胞は血管壁細胞へ分化した

次に、脱分化脂肪細胞と血管内皮細胞の 3 次元培養を行ったところ、管腔形成を起こした血管内皮細胞の周囲に裏打ち構造を作るように脱分化脂肪細胞が付着した。また、脱分化脂肪細胞の血管内皮細胞への遊走能を評価したところ、血管内皮細胞の分泌する液性因子により脱分化脂肪細胞の遊走は有意に促進した。さらに、脱分化脂肪細胞と血管内皮細胞を共培養したところ、脱分化脂肪細胞は血管壁細胞マーカーである NG2 と ASMA を強く発現することを、免疫染色と qPCR で

確認した(図 1)。

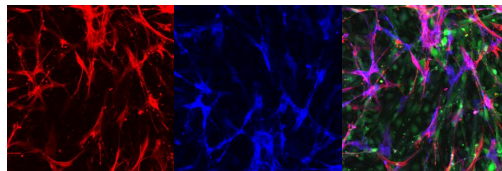


図 1 血管内皮細胞との共培養で DFAT は血管壁細胞マーカーを発現した

(右 red:ASMA, 中央 blue:NG2, 左 margin, green:GFP 発現血管内皮細胞)

これらの結果から、脱分化脂肪細胞は血管内皮細胞の管腔構造へ遊走し、管腔表面で血管壁細胞に分化することが示唆された。

(3)脱分化脂肪細胞はがん微小環境で繊維芽細胞や血管壁細胞に分化した

次に SCID マウスの皮下にマウス肺がん細胞(LLC)単独またはがん細胞と共に GFP 発現 DFAT を移植し、がん微小環境での DFAT の分化を免疫組織染色で調べた。すると、Control に比較して DFAT 共移植では、局所がん浸潤への影響や腫瘍容積に影響は認めなかったが、GFP 発現 DFAT はがん微小環境における繊維芽脂肪や腫瘍新生血管の表面に付着して血管壁細胞や血管平滑筋細胞に分化している事が確認された。しかしがん細胞の肺への遠隔転移については、肉眼的評価だけを行ったが Control に比較して違いは認めなかった。そこで現在、AP2-Cre マウスと Rosa26-YFP マウスの交配から、脂肪細胞由来の細胞に特異的に YFP を発現するマウスを作製し、そのマウスの皮下にがん細胞を直接移植してがん周囲の YFP 陽性の脂肪細胞由来繊維芽細胞を確認する実験が進行中である。

(4)考察

これまでがん組織周囲の繊維芽細胞(CAF; Cancer-associated fibroblast)のほとんどは EMT を起こしたがん細胞が起源であると考

えられていたが、成熟脂肪細胞も CAF の由来と成りうるという結果を得たのは今後がん組織の微小環境の制御を考える上で意義があったと言える。また本研究で、脱分化脂肪細胞はがん組織周囲の腫瘍血管新生において脆弱な腫瘍血管の血管壁に付着し、血管壁細胞として腫瘍血管の成熟化、正常化に関与している可能性が示唆され、この腫瘍新生血管の成熟化は抗がん剤の組織移行を改善させる可能性があるなど、がん微小環境に標的とした細胞治療の戦略を考える上で意義があったと思われる。また本研究は、再生医療の細胞技術をがん治療に応用するという意味でも、インパクトがあったと考える。尚、この研究成果は、第 20 回、21 回日本血管生物医学会学術集会及び第 18 回国際血管生物学会で報告し、多くの各国の研究者と情報交換することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

萩倉一博，山元智衣，松本太郎，Mature adipocyte derived multipotent cells differentiate into mural cells, 第 20 回日本血管生物医学会学術集会，2012 年 12 月 5 日，徳島あわぎんホール

渡邊拓史，萩倉一博，松本太郎，脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT) の血管壁細胞への分化，第 12 回日本再生医療学会総会，2013 年 3 月 21 日，パシフィコ横浜

萩倉一博，脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT) の血管壁細胞への分化，第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会，2013 年 7 月 18 日，京王プラザホテル

萩倉一博，成熟脂肪細胞の脱分化と血管周皮細胞への分化について，第 21 回日本血管生物医学会学術集会，2013 年 9 月 26 日，千里阪急ホテル

萩倉一博，成熟脂肪細胞の脱分化と血管周皮細胞への分化について，第 8 回日本大学先端バイオフィォーラム，2013 年 11 月 27 日，日本大学会館 2 階大講堂

萩倉一博，Mature adipocyte derived multipotent cells differentiate into mural cells, The 18th international vascular biology meeting, 2014 年 4 月 14 日，京都市観業館みやこめッセ

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩倉一博 (HAGIKURA, Kazuhiro)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：20613269

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし