

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461216

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞の免疫抑制作用の解明と高機能化

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms involved in the immunosuppressive effects of adipose derived stem cells and the improvement of their properties

研究代表者

丸山 彰一 (Maruyama, Shoichi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10362253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発した低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞(LASC)と従来の高血清培地で増幅したASC(HASC)の細胞特性の違いを明らかにするために、オートファジー系、代謝経路、解糖系、細胞内代謝産物、分泌サイトカインに関して網羅的に解析した。LASCではHASCと比較してオートファジーの亢進が観察されたが、その作用機序は明確になっていない。ラパマイシン処理ではオートファジーは亢進しなかった。解糖系にも有意な差は見られなかった。サイトカイン分泌については、LASCではMIP-1 alphaの分泌が上昇し、Fractalkine/CX3CL1の分泌が低下していた。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the difference between the cell characteristic of low serum cultured adipose derived stem cells (LASC), which are our original, and those of high serum cultured adipose derived stem cells (HASC), we analyzed the autophagy system, metabolic pathway, glycolytic pathway, the metabolites in the cells, and cytokine secretion. Autophagy was enhanced in LASC as compared to HASC, although mechanisms remain to be clarified. Autophagy was not aggravated by the rapamycin treatment. No significant difference was observed in glycolytic pathway either. Concerning the cytokine secretion, MIP-1 alpha increased and fractalkine/CX3CL1 decreased in LASC.

研究分野：腎臓病学

キーワード：脂肪 間葉系幹細胞 間葉系間質細胞 オートファジー 微小環境因子 M2マクロファージ HGF

1. 研究開始当初の背景

- (1) 申請者らは脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)に着目し血清培養法を開発した。低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞(LASC)は高血清培養ASC(HASC)や骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)と比較して、強い再生促進作用と免疫抑制作用を有している。LASCはvascular endothelial growth factor(VEGF)やkeratinocyte growth factor(KGF)等種々の増殖因子・サイトカインを高濃度に分泌しているが、特に再生促進因子としてhepatocyte growth factor(HGF)を高生産していることが重要であることを見出している。組織再生に関しても各種動物モデル(下肢虚血、急性腎障害、皮膚潰瘍、腹膜線維症、骨粗鬆症、腹圧性尿失禁)で再性能が高いことを確認している。また、LASCは組織再性能に加えて免疫抑制作用を有しており、T-cellを介した免疫抑制作用がHASCやBM-MSCと比較して強力であることをin vivo(異種移植モデル)/vitro(増殖抑制試験)で証明している。さらに申請者らは、LASCは炎症性M1マクロファージを抑制し、免疫調整性M2マクロファージへと形質転換させる作用が強いことも示している。この作用は抗GBM抗体腎炎モデルラットのクレアチニン・尿たんぱくを改善させた。このM2マクロファージ誘導作用は細胞同士の接触作用とLASCから分泌される液性因子の双方が関与していることを示唆する結果も得られている。
- (2) ASCやMSCがもつ組織再生・機能再生能を利用した細胞治療は世界的な広がりを見せている。腎疾患領域においても移植や炎症性疾患に対して臨床応用が進められている。申請者らはLASCが従来のASCやMSCに比べ高い治療効果を持つことを示しており、LASCは有力な治療

法になりえると考えられた。LASCは培養時の血清濃度を下げることで作成できるため、LASCの治療効果が低血清(=飢餓状態)に起因すると考え、飢餓状態で亢進するオートファジー(自食作用)に着目して作用機序の解明を試みた。また、品質的に安定したLASCを作成することが臨床応用においては不可欠であることから、LASCの免疫抑制効果の機能解明から得られた知見を基に、LASCと同等あるいは高機能化した細胞を無血清培養法にて作成することを目指している。

2. 研究の目的

- (1) LASCの免疫抑制作用におけるオートファジーの関与の解明

LASCにおけるオートファジーの関与をmTOR/Akt経路に着目して明らかにする。

- (2) LASCの構造解析による免疫抑制メカニズムの解明

電子顕微鏡や分子標識技術を用いて、LASCの機能を構造から明らかにする。その際、接触因子に着目し、LASCと免疫細胞との間の情報伝達機構を解明する。

- (3) LASCの免疫抑制作用に関与する液性因子の同定

LASC,HASC,BM-MSCが分泌する液性因子の比較を通し、LASCの免疫抑制作用に関与する液性因子を同定する。その効果をin vitro/vivoの系で検定する。

3. 研究の方法

- (1) LASCの免疫抑制作用におけるmTOR/Akt経路の関与の解明

オートファゴゾームの可視化により、オートファジーの状況をLASC,HASC,BM-MSCで比較する

低血糖培地あるいはmTOR阻害剤であるラパマイシン刺激により、LASCのオートファジーが亢進するかを検討する

(2) LASC の性質解明

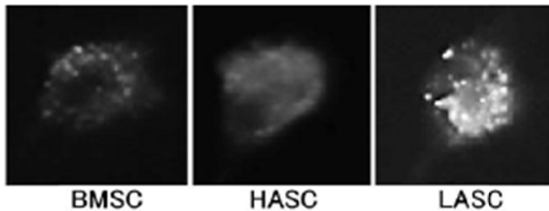
LASC, HASC の代謝産物を網羅的に解析し、細胞の性質・状態を明らかにする
細胞増殖期における代謝/生成物を継時的に測定し、細胞の代謝活性・呼吸経路を明らかにする

(3) 液性因子を介した LASC の免疫抑制メカニズムの解明

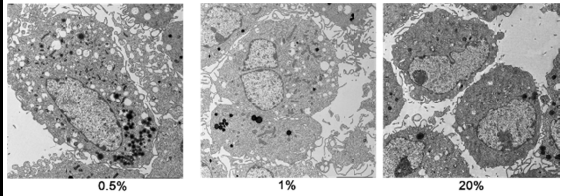
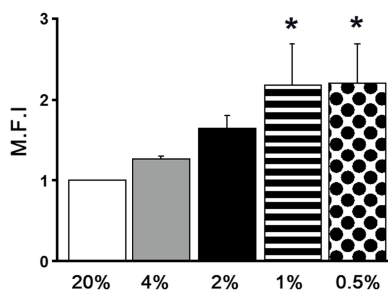
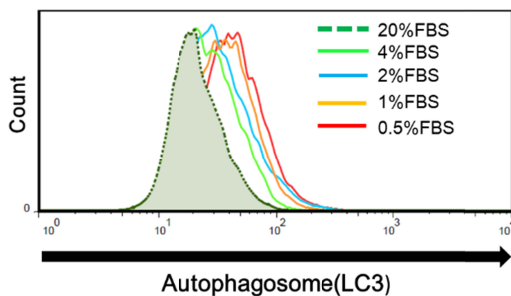
サイトカイン・ケモカインの網羅的解析を行い、免疫抑制作用に関与する因子を明らかにする

4. 研究成果

(1) 細胞内のオートファゴソームを CytoD autophagy detection kit で染色したところ、LASC では HASC, BM-MSC と比較してオートファジーが亢進していることが示された。

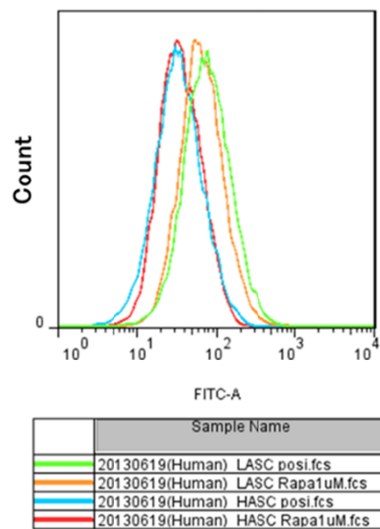
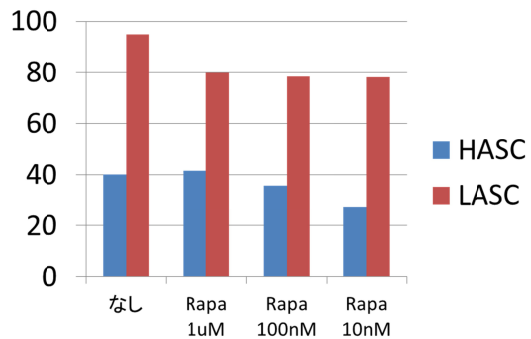


次いで ASC の血清濃度を 0.5% ~ 20% の間でふったところ、血清濃度が低いほど、オートファジーが亢進していることが FACS および電子顕微鏡での検討から明らかとなった。



次に LASC の免疫抑制作用とオートファジーの関連性について、低血糖刺激、あるいは mTOR 阻害剤であるラパマイシン刺激を加えた LASC で検討したところ、両刺激においてオートファジーの亢進は認められず、免疫抑制作用・分泌因子に関しても明らかな差は確認できなかった。

Human ASC では LASC と HASC の Autophagy に差がある Rapamycin 刺激で Autophagy が亢進してこない

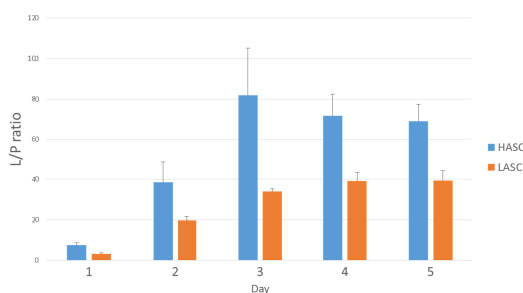


ラパマイシン以外の mTOR 阻害剤でも LASC のオートファジーを亢進させることはできず、オートファジー亢進という側面からの LASC の免疫抑制作用の機序解明は困難であると考えられた。

(2) HASC と LASC の差が血清濃度に依存することは明らかであるため、次に代謝産物

を解析し、LASC の細胞的特徴から機序解明を試みた。多能性幹細胞は幹細胞性を維持するために解糖系、ペントースリン酸系が活性化することが報告されている。そこで LASC の解糖系の活性、ミトコンドリアの活性を代謝産物から解析した。代謝産物の網羅的解析において LASC と HASC では解糖系、TCA cycle に関与する分子に明らかな差が確認された。また、細胞間シグナル伝達経路やアミノ酸代謝にも差がある傾向が示された。

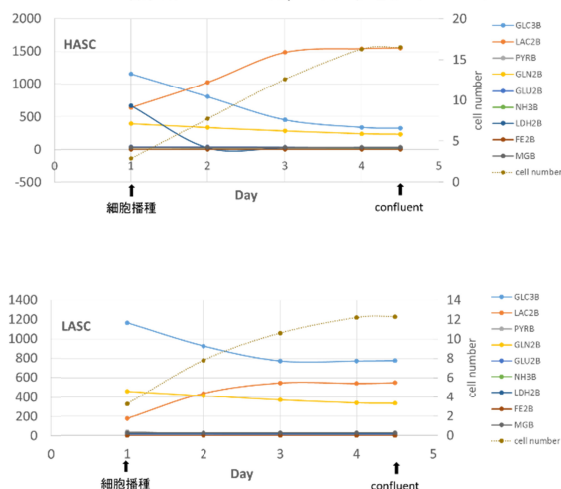
臨床的にはミトコンドリアの機能を評価するために乳酸/ピルビン酸比 (L/P 比) が用いられている。L/P 比が 25.6 を超えると解糖系による ATP 産生が停止していると計算されるため、培養開始時から継続的に代謝産物を測定したところ、HASC と LASC の L/P 比では LASC のほうが低値に抑えられているものの、ATP 産生が停止する (L/P 比が 25.6 を超える) タイミングに差は認められず、培養開始後早期に解糖系による ATP 産生が停止していることが示唆された。



バイオプロセス分析を行い、HASC・LASC の代謝・生成産物を細胞播種後から継続的に confluent に達するまで測定した。代謝経路に差があれば代謝産物の生成過程に差がみられると仮定したが、代謝産物に関しては細胞の数によることから解析方法の検討が必要であると考えられた。

バイオプロセス分析

HASCとLASCの増殖期における代謝/生成産物を継続的に測定



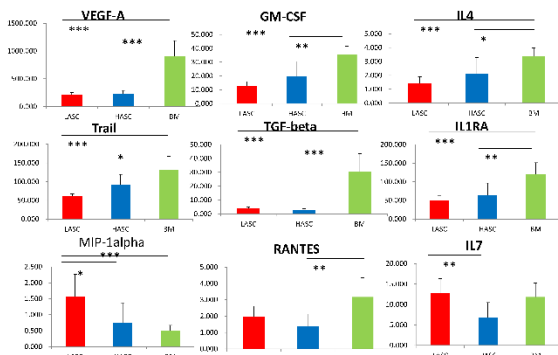
今後はこれらの知見の下、ホスホフルクトキナーゼ阻害による解糖系の抑制、あるいはオリゴマイシン等による電子伝達系 (ミトコンドリア機能) の抑制が、LASC の性質や性能にどのような影響を及ぼすか検討を行っていく。

(3) ラット LASC の免疫抑制作用の一つとして、IL-6 および PGE2 をメインファクターとした M2 誘導作用がある。この作用についてヒト LASC でも同様のことが起こり得るのか検討したところ、定常状態において LASC は IL-6 を産生しているものの、HASC の産生能に比べて低く、PGE2 の産生も低値であり、HASC との差はみられなかった。しかしながらヒト LASC にも免疫抑制作用が保持されているため、LASC の免疫抑制作用は種に応じて異なる可能性が示された。そこでヒト LASC、HASC、BM-MSC のサイトカイン・ケモカインの網羅的測定を行った。

LASC および HASC では、BM-MSC に比べて VEGF-A ($p < 0.001$) や TGF-beta ($p < 0.001$) の分泌低下が認められた。さらに、LASC では MIP-1 alpha の分泌が上昇 ($p < 0.01$) し、Fractalkine/CX3CL1 の分泌が低下 ($p < 0.05$) していた。LASC の免疫抑制作用の機序の一端として MIP-1 alpha や

Fractalkine/CX3CL1 が関与していることが示唆される結果となった。

分泌因子



今後はこれらの液性因子が LASC の作用においてどのような働きを担っているのかを解析し、これら因子の発現量を調整することで強化 LASC の作成、無血清培地による細胞作出を検討する必要があります。

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)

1. K Furuhashi, N Tsuboi, A Shimizu, Y Shi, H Kim, T Katsuno, Y Saka, T Ozaki, W Sato, E Imai, S Matsuo, S Maruyama. Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate rat crescentic glomerulonephritis by promoting immunoregulatory macrophages. J Am Soc Nephrol. 2013 24(4):587-603. 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. Qiuna Du, Naotake Tsuboi, Yutaka Sugiyama, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. Transfused M2 Macrophages Ameliorate Renal Injury in Murine Nephrotoxic Serum Nephritis. 48th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. (San Diego, USA) 2015/11/6
2. Yutaka Kamimura, Naotake Tsuboi, Takayuki Katsuno, Shoichi Maruyama. Microarray Analysis of Gene Expression to Compare Low Serum Cultured Adipose Derived Stromal Cell with High Serum. 48th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. (San Diego, USA) 2015/11/6
3. Yuka Hattori, Hangsoo Kim, Naotake Tsuboi, Akihito Yamamoto, Seiichi

Matsuo, Shoichi Maruyama. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorate Acute Kidney Injury in Mice. 48th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. (San Diego, USA) 2015/11/6

4. Kamimura Y, Akiyama S, Tsuboi N, Kim H, Katsuno T, Horinouchi A, Maruyama S. MICROARRAY ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN LOW SERUM CULTURED ADIPOSE DERIVED STROMAL CELL. The ISSCR 2015. (Stockholm, Sweden) 2015/6/25
5. Kamimura Y, Akiyama S, Tsuboi N, Kim H, Katsuno T, Horinouchi A, Maruyama S. MICROARRAY ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN LOW SERUM CULTURED ADIPOSE DERIVED STROMAL CELL. The ISSCR 2015. (Stockholm, Sweden) 2015/6/24
6. Q Du, N Tsuboi, Y Sugiyama, S Matsuo, S Maruyama. TRANSFUSED M2 MACROPHAGES AMELIORATE RENAL INJURY IN MURINE NEPHROTOXIC SERUM NEPHRITIS. 52ND ERA-EDTA CONGRESS (London,UK) 2015/5/30
7. T Katsuno, N Tsuboi, S Matsuo, S Maruyama. Low Serum Cultured Adipose Tissue-derived Stromal Cells Ameliorate Acute Kidney Injury In Rats. Frontiers in Nephrology Florence. (Florence, Italy) 2013.09.12-09.15
8. T Katsuno, N Tsuboi, S Matsuo, S Maruyama. Low Serum Cultured Adipose Tissue-derived Stromal Cells Ameliorate Acute Kidney Injury In Rats. Frontiers in Nephrology Florence. (Florence, Italy) 2013.09.12-09.15
9. K Furuhashi, N Tsuboi, A Shimizu, Y Shi, H Kim, T Katsuno, Y Saka, T Ozaki, W Sato, E Imai, S Matsuo, S Maruyama. Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate rat crescentic glomerulonephritis by promoting immunoregulatory macrophages. ISSCR 11th Annual Meeting. (Boston, USA) 2013.06.12
10. K Furuhashi, N Tsuboi, A Shimizu, H Kim, T Katsuno, S Matsuo, S Maruyama. The World Congress of Nephrology 2013. (Hong Kong, China) 2013.06.02
11. H Kim, M Mizuno, K Furuhashi, T Katsuno, T Ozaki, K Yasuda, N Tsuboi, Y Ito, S Maruyama, S Matsuo. RAT ADIPOSE TISSUE-DERIVED STROMAL CELLS ATTENUATE PERITONEAL INJURIES IN RAT ZYMOSAN-INDUCED PERITONITIS ACCOMPANIED BY COMPLEMENT ACTIVATION. The World Congress of Nephrology 2013. (Hong Kong, China) 2013.06.02

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：脂肪由来間葉系幹細胞の選別法
発明者：丸山彰一、堀之内明日花、神村豊
権利者：国立大学法人名古屋大学
種類：特許権
番号：特願 2015-021613
出願年月日：平成 27 年 2 月 5 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 彰一 (MARUYAMA, Shoichi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10362253

(2) 研究分担者

秋山 真一 (AKIYAMA, Shin'ichi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号：20500010

坪井 直毅 (TSUBOI, Naotake)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50566958

松尾 清一 (MATSUO, Seiichi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190410
平成 25 年度～平成 26 年度

加藤 規利 (KATO, Noritoshi)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：90716052
平成 27 年度