

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461331

研究課題名(和文) 賦活脂肪組織によるアルツハイマー型認知症の幹細胞動員修復機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of restoration mechanisms in Alzheimer diseases by mobilized stem cells through activation of adipose tissue

研究代表者

黒田 正幸 (KURODA, Masayuki)

千葉大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：00253005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織におけるA β に対する応答機構の解明を目的とし、A β 1-42に対する脂肪幹細胞(ASC)と前駆脂肪細胞(ccdPA)の応答性を解析した。A β 1-42の低濃度暴露によりASCでは細胞増殖が惹起され、走化性関連遺伝子の発現が上昇した。NEPのノックダウンによりASCでは同定した走化性関連遺伝子の発現が上昇し、過剰発現により発現が低下した。NEPのノックダウンによりASC、ccdPAともに脂肪分化能が抑制された。以上の成績からASCとccdPAはA β 1-42に対して異なる応答性を示し、脂肪組織にはNEPの発現変化と連動してA β に应答する遺伝子制御機構が存在していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate self-defensive mechanisms against amyloid protein (A β) in adipose-tissue, cellular responses of adipose-derived stem cells (ASC) and progenitor cells (ccdPA) to A β were examined. Proliferation of ASC was enhanced and migration-related gene expression in ASC was increased upon low dose A β exposure. The gene expression was increased by NEP gene knock-down in ASC, but not in ccdPA, and decreased by NEP overexpression in ASC. NEP knock-down resulted in reduced lipid-droplet accumulation upon adipogenic stimulation in both cells. These data indicated that ASC and ccdPA respond differently to A β , and suggested that adipose tissue regulates self-defensive mechanisms against A β through NEP-mediated signaling.

研究分野：遺伝子細胞治療

キーワード：脂肪幹細胞 脂肪組織 アルツハイマー認知症 ネプリライシン

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来に伴って、ここ 10 年間で認知症患者は倍増し、65 歳以上の 10 人に 1 人が認知症を患っていると推定されている (厚生労働省推計、平成 24 年 8 月)。最も頻度の高い原因はアルツハイマー型認知症であり、その予防とともに治療法の開発は喫緊の課題である。中年期の高血圧、高脂血症、糖尿病といったメタボリックシンドロームがそのリスクを増大させる。これらの病態の形成には異所性の脂肪 (内臓脂肪) の肥大、炎症性サイトカインの分泌亢進とインスリン抵抗性が関与する。脂肪細胞は、多くのサイトカインを分泌し、全身代謝を司る。申請者らのグループは、脂肪細胞移植研究において、移植部位の違い、サイトカイン分泌能の修飾がインスリン抵抗性などの全身病態をおおきく左右することを証明してきた。これらの研究成果は、脂肪細胞の機能破綻がメタボリックシンドローム関連病態の進展に密接に関わることを示す。

脂肪組織には成熟脂肪細胞のほかに脂肪幹細胞 (ASC) が存在し、再生医療への応用研究が盛んである。申請者らはこれまで 25 例の被験者の脂肪組織を用い、成熟脂肪細胞の比重特性を利用した脂肪細胞と脂肪幹細胞 (ASC) の分離培養技術を標準化した (JDI, 2011)。申請者らが成熟脂肪細胞から獲得した細胞は、ASC よりも脂肪細胞にコミットし (AJP-CP, 2011) 自発的な脂肪細胞への分化成熟能を残存し (ECR, 2012) 分化度に応じてレプチンを初めとする生理活性タンパクを分泌する、in vitro で培養可能な前駆脂肪細胞の標準化細胞である (ceiling culture-derived proliferative adipocyte、ccdPA)。ccdPA はレトロウイルスベクターを用いた分泌タンパク遺伝子の発現・分泌にも優れ (TOGTJ, 2011、EMM, 2011) 分泌タンパクはメタボリックシンドロームの病態改善機能 (Diabetologia, 2005、MGM, 2011) を示す。その特性を難治性疾患の酵素補充療法に応用展開し、遺伝子導入脂肪細胞移植療法 (特許成立済、JP: 4879867、US: 7820438B2、EP: 1541674 B1) の実用化研究を実施してきた。現在、千葉大学医学部附属病院未来開拓センターを拠点

とし、遺伝子治療臨床研究「家族性レシチン: コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) 欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究」を厚生労働省に申請し、臨床導入間近である。このように申請者らは ccdPA と ASC を効率よく機能修飾し、安定的に移植する技術を確立してきた。

脂肪細胞が分泌するレプチンは、脳内へ移行し、in vitro ではアルツハイマー型認知症で認められるタウタンパクの重合を阻害する。アミロイド β ($A\beta$) 分解酵素ネプリライシン (NEP) は ASC、ccdPA でも発現される膜貫通型タンパクである (TOGTJ, 2011)。 $A\beta$ 、アンジオテンシンを含む多様な生理活性タンパクを基質とし、そのタンパク分解活性は周囲の細胞環境の制御、膜貫通ドメインを介して細胞内の遺伝子発現に関与する。このように脂肪組織の機能は本来、アルツハイマー型認知症の抑制に寄与しており、その不可逆的な機能破綻がアルツハイマー型認知症をさらに増悪させることを示唆する。最近、マウスに静注された培養 ASC が脳内に到達し、アルツハイマー型認知症の病態を改善するという研究成果が報告された。ASC は骨髄由来幹細胞 (BM-MSC) より神経細胞への分化能に優れる。

2. 研究の目的

近年、生活環境による外的刺激 (Environmental activation) が、視床下部 BDNF の発現を惹起し、それが脂肪細胞のレプチンの分泌能やフェノタイプ変換、すなわち機能へと伝達されることが報告された。また、脂肪幹細胞が存在する幹細胞ニッチでは、脂肪幹細胞の組織内への動員に周辺の脂肪細胞、内皮細胞が細胞間相互作用を介して関与することが示唆されている。これらの基礎・臨床成績は、脳機能の質的变化が脂肪細胞・組織の機能を制御し、さらに脂肪幹細胞のニッチにおける活性化と細胞動員によるフィードバック機構の存在を示唆する。これらの背景から、本研究ではアルツハイマー型認知症の病態における脂肪組織の活性化と脳へのフィードバックメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

具体的には、認知症で血中濃度変化をきたす液性因子による脂肪組織活性化機構の検討、 $A\beta$ 分解酵素群の ASC、ccdPA における機能解析、血液脳関門 (BBB) の ASC 通過に関する検討、病的状態に応答した脂肪細胞が分泌するサイトカインの神経細胞に与える影響、脂肪組織からの ASC の動員機構、を課題として脳からの危機管理シグナルに応答した脂肪組織賦活によるサイトカイン分泌、ASC 活性化・動員に基づく2つの病態改善メカニズムの解明をこれまで確立してきた脂肪細胞培養・改変技術を用いて進めることとした。

4. 研究成果

(1) 認知症で血中濃度変化をきたす液性因子による脂肪組織の賦活機構

認知症の病態では血中 BDNF の低下、 $A\beta$ の上昇が認められる (Diniz, 2011、Reitz, 2011)、 $A\beta$ はインスリンのシグナルと競合する (Xie, 2002)、BDNF は血小板に蓄積されており、それが血中濃度を反映している (Karege, 2005、Tamura, 2011)。以上の背景から BDNF と $A\beta$ の濃度変化による脂肪幹細胞 (ASC) と ccdPA の機能変化を解析することとした。

既報では BDNF は血小板に存在するとされているため、健常人の血小板について BDNF が検出されるかどうかを検討した。予想通り、BDNF が検出された。BDNF は翻訳後修飾を受け、proBDNF が成熟型に変換される。今回検出できた BDNF のシグナルは proBDNF と同じサイズに検出された。従って、BDNF が本研究で解明を目指す感知機構に関与するのであれば、proBDNF から BDNF への変換が血小板から放出される際に起きる可能性があると考えられた。BDNF の受容体は2種類あるとされており、それら (TrkB と p75NTR) について ASC と ccdPA における発現を検討した。両者とも ASC、ccdPA では検出されなかった。既報から $A\beta$ による細胞傷害に BDNF が抑制的に機能することが知られている。両細胞において $A\beta$ による細胞傷害が認められる条件で BDNF を添加しても、細胞傷害の抑制は観察されなかった。また神経芽細胞腫細

胞などではレチノイン酸で刺激することで TrkB は誘導されるため、ASC、ccdPA においてレチノイン酸刺激を行ったが、TrkB 誘導は確認されなかった。従って、両細胞は、少なくとも検討した培養条件において BDNF の濃度変化に対する脂肪前駆細胞の応答機構の存在は否定的であると考えられた。

一方、 $A\beta$ の濃度感知機構についてその主な分解酵素であるネプリライシン (NEP) による細胞応答を中心とした解析を行った。 $A\beta$ 1-40 と $A\beta$ 1-42 の存在下で、ASC、ccdPA ともに濃度依存的な増殖阻害が認められた。ASC、ccdPA に強い細胞傷害性を示すことが確認された $A\beta$ 1-42 について、ASC に比較的低濃度の暴露を行い、アルツハイマー病態に関連する遺伝子の発現変化を網羅的に検討した。ASC は既報から神経細胞への分化誘導が可能であるとされているが、それに関連するように各種神経伝達物質の受容体遺伝子の発現上昇が観察された。さらに幹細胞の走化性を亢進させる遺伝子の発現上昇も認められた。

$A\beta$ 1-42 への暴露による細胞増殖と遺伝子発現の変化を引き続き検討した。 $A\beta$ 1-42 の低濃度暴露により、ASC は細胞増殖が惹起され、ccdPA ではその効果はほとんど認められなかった (図1)。高濃度 ($5\mu\text{M}$ 以上) ではないずれの細胞も細胞傷害性が認められた。

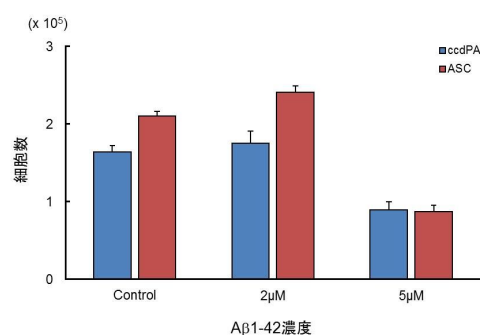


図1. ASC と ccdPA の増殖に対する $A\beta$ 1-42 の影響

さらにこの成績を検証するため、NEP の基質として知られている、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) また阻害剤の存在下で $A\beta$ 1-42 の細胞増殖に対する影響を検討した。ANP の有無による影響は認められなかった。

NEP の阻害剤により、低濃度 A β 1-42 による細胞傷害性に変化が認められ、ccdPA に比較して、ASC の方が、低濃度 A β 1-42 による細胞傷害性に耐性であることがわかった (図 2)。この成績は、NEP による基質の分解シグナルが、細胞内の遺伝子発現を制御していることを示唆する。また低濃度 A β 1-42 による細胞増殖の亢進と並行して、同定していた幹細胞走化性関連遺伝子の発現が上昇した (図 3)。

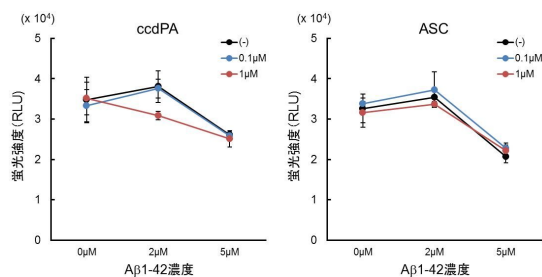


図 2. NEP 阻害剤存在下における ASC と ccdPA の増殖に対する A β 1-42 の影響

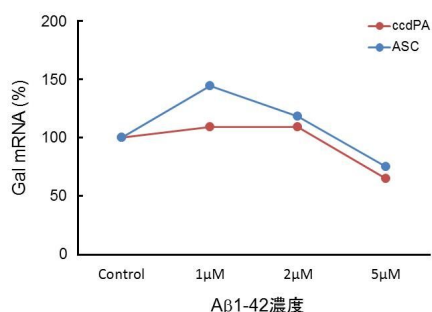


図 3. ASC における低濃度 A β 1-42 暴露に应答した幹細胞走化性関連遺伝子の発現変化

(2) A β 分解酵素群の ASC、ccdPA における機能解析

A β 分解酵素群の中で、アルツハイマー型認知症の病態に最も重要な影響を与えると考えられる NEP の ASC、ccdPA における機能解析を行うため、レンチウイルスベクターによる shRNA 導入系を確立することとした。6 つのデザインされた shRNA 配列と puromycin 耐性遺伝子を搭載するレンチウイルスベクターを作製し、ASC、ccdPA に遺伝子導入した。その後、それぞれの細胞におけるネプリリysin mRNA を定量 PCR により

測定した。同時に、NEP の産生量をフローサイトメトリー、細胞抽出液を用いたウェスタンブロットにより評価した。5 種類の shRNA 配列のうち、1 種類の shRNA が効率良く NEP の発現を抑制することが分かった (図 4)。

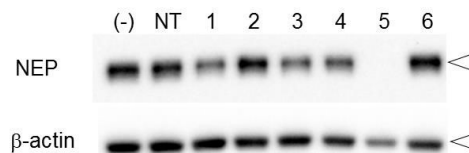


図 4. shRNA による NEP ノックダウン系の確立

(-): Control (非導入細胞), NT: Non-target, 1~6: NEP shRNA コンストラクト導入細胞

他方、NEP 発現レンチウイルスベクターの構築を行った。その過程で既報を基に膜貫通ドメインを欠失したコンストラクトの構築を行った。作製を試みた膜貫通ドメイン欠損型 NEP について精査を加え、当該蛋白の細胞外分泌が確認され、培養上清中に活性が検出された。これらの解析を通じて、NEP の mRNA 量、タンパク量の評価が可能となった。

レンチウイルスベクターによる NEP の shRNA 導入と機能解析を進めた。ノックダウンした細胞において、細胞増殖に有意な影響は認められなかったことから NEP そのものはこれらの細胞の増殖に関与しないと考えられた。さらに、NEP をノックダウンした細胞において、細胞骨格系のタンパク質の発現抑制が確認された (図 5)。

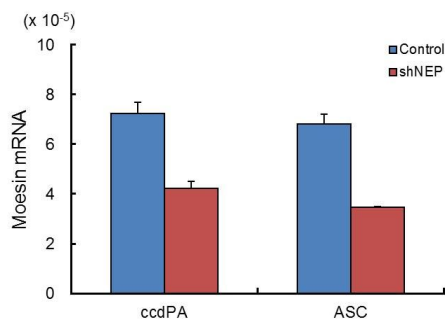


図 5. NEP 発現抑制による細胞骨格系遺伝子発現の抑制

これらの成績は NEP の発現量と細胞骨格系

のタンパク質の発現変化が連動することを示しており、NEP による細胞外 A β 1-42 濃度の感知機構が外的刺激となって、細胞骨格系を介した幹細胞の活性化機構の発現に連動している可能性を示唆していると考えられる。また、NEP のノックダウンにより、ASC、ccdPA ともに脂肪分化能が抑制されたこと（図 6）にも関与していると考えられた。

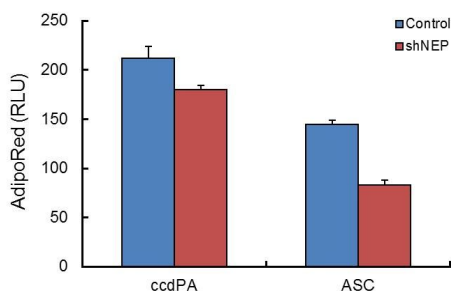


図 6. NEP ノックダウンによる脂肪分化能の低下

これまでの成績では通常の培養状態において、NEP の発現量は ccdPA よりも ASC が高いことが確認されている。ASC における NEP によるシグナル伝達機構をさらに検討するため、NEP のノックダウンコンストラクトと過剰発現コンストラクトを用いて評価を行った。ASC において、NEP のノックダウンにより、同定した走化性関連遺伝子の発現が上昇し、過剰発現により発現が低下した。NEP をノックダウンした ccdPA ではほとんど変化は認められなかった（図 7）。

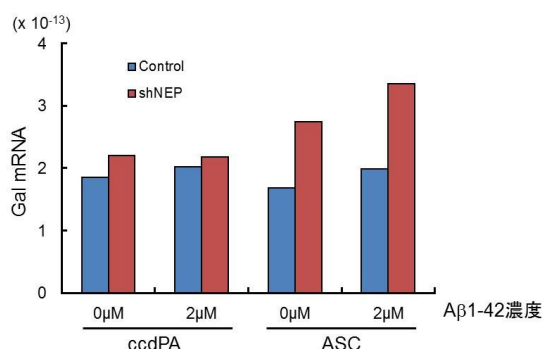


図 7. ASC の A β 1-42 暴露に反応した幹細胞走化性関連遺伝子発現に対する NEP ノックダウンの影響

本研究で ASC は、ccdPA に比べ、ネプリラ

イシンの発現変化に対してより鋭敏に反応する遺伝子制御機構を細胞内に有していることが明らかとなった。

(3) 血液脳関門 (BBB) の ASC 通過に関する検討

既報を参考に、ヒト内皮細胞 (HUVEC) のシートを準備し、それを蛍光標識した ASC が通過できるかどうかを指標として Transmigration assay の確立を試みた。今後は同定していた幹細胞走化性関連遺伝子の発現解析と組み合わせた検討をすることで本仮説に関する検討を進めたい。

(4) まとめ

研究開始当初は、BDNF、A β の感知機構を解明することを目的としていたが、ASC、ccdPA いずれも BDNF に対する応答性をほとんど示さなかったことから、A β の感知機構を明らかにすることを中心とした研究を行った。A β 1-42 の低濃度暴露により、ASC では細胞増殖が惹起され、ccdPA ではその効果は認められなかった。高濃度 A β (5 μ M 以上) ではいずれの細胞も細胞傷害性が認められた。NEP の基質として知られている ANP、また NEP 阻害剤の存在下で A β 1-42 の細胞増殖に対する影響を検討したところ、ANP の有無による影響は認めず、一方 NEP 阻害剤の存在下で、低濃度 A β 1-42 による細胞傷害性に変化が認められ、ASC の方が NEP 阻害剤の存在下でも A β 1-42 による細胞傷害性が低い傾向にあった。この成績は、NEP による基質の分解活性が、ASC の機能発現に重要であることを示唆する。また低濃度 A β 1-42 による細胞増殖の亢進と並行して、同定していた幹細胞走化性関連遺伝子の発現が上昇した。

ASC における NEP によるシグナル伝達機構をさらに検討するため、NEP のノックダウンコンストラクトと過剰発現コンストラクトを用いて評価を行った。ASC において、NEP のノックダウンにより同定した走化性関連遺伝子の発現が上昇し、過剰発現により発現が低下した。ccdPA ではノックダウンによる変化は認められなかった。また、NEP のノックダウンにより、ASC、ccdPA ともに脂肪分

化能が抑制された。

以上の成績から ASC は、ccdPA に比べ、NEP の発現変化に対してより鋭敏に応答する遺伝子制御機構を有していることが明らかとなり、脂肪組織内に A β に対する応答性の異なる前駆脂肪細胞が存在することにより脂肪組織の A β 濃度に対する応答能を修飾することが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Adachi N, Kubota Y, Kosaka K, Akita S, Sasahara Y, Kira T, Kuroda M, Mitsukawa N, Bujo H, Satoh K. Low-dose radiation pretreatment improves survival of human ceiling culture-derived proliferative adipocytes (ccdPAs) under hypoxia via HIF-1 alpha and MMP-2 induction. Biochem Biophys Res Commun. 2015; 463: 1176-83. (査読有)
2. 麻生雅是、黒田正幸 . ヒト脂肪細胞の初代分離・培養と臨床応用 . Organ Biology 2014; 21, 60-65. (査読無)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 黒田正幸、武城英明、麻生雅是、齋藤康、横手幸太郎 . 疾病治療用タンパク質分泌加工ヒト脂肪細胞の創薬開発と難病治療 . 日本薬学会第 135 年会 . 2015 年 . 3 月 . 神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)
2. 青柳靖之、黒田正幸、武城英明、浅田咲世、麻生雅是、齋藤康、横手幸太郎 . 加工脂肪細胞自家移植による持続的酵素補充療法の臨床導入 . 第 35 回日本肥満学会 . 2014 年.10 月 . シーガイアコンベンションセンター (宮城県・宮崎市)
3. 黒田正幸、武城英明、青柳靖之、浅田咲世、麻生雅是、齋藤康、横手幸太郎 . 遺伝子導入脂肪細胞の移植による酵素補充療法 . 第 19 回アディポサイエンス・シンポジウム . 2014 年.8 月 . 千里ライフサイエンスセンター (大阪府・豊中市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 正幸 (KURODA, Masayuki)
千葉大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号 : 00253005

(2)研究分担者

窪田 吉孝 (KUBOTA, Yoshitaka)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 10375735

(3)連携研究者

武城 英明 (BUJO, Hideaki)
東邦大学・医療センター佐倉病院・教授
研究者番号 : 80291300