

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293170

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞の培養上清およびExosomeを用いた再生医療

研究課題名(英文) Regenerative medicine using dedifferentiated fat cell-derived condition media and exosome

研究代表者

松本 太郎 (MATSUMOTO, Taro)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：50366580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト脱分化脂肪細胞(DFAT)が分泌する脂質小胞(エクソソーム)の解析を行い、その治療効果を検討した。その結果、DFATから分泌されるエクソソーム中には、細胞間情報伝達を担うマイクロRNAが豊富に含まれ、そのプロファイルは脂肪組織由来幹細胞(ASC)に類似していた。DFAT由来エクソソームは、Tリンパ球の増殖を抑制し、制御性T細胞への分化促進作用を示した。またDFAT由来エクソソームは、椎間板髄核細胞の増殖を促進し、軟骨再生に係わる転写因子SOX9の発現を増加させた。DFAT由来エクソソームはTリンパ球の異常を伴う自己免疫疾患や変形性脊椎症に対し治療効果をもつことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the characteristics and therapeutic potential of dedifferentiated fat (DFAT) cell-derived exosomes. As results, we found that DFAT cell-derived exosomes contained a variety of microRNAs that are thought to play important roles in intercellular communications. The expression profile of microRNAs in DFAT cell-derived exosomes was very similar to that in adipose-derived stem cell (ASC)-derived exosomes. DFAT cell-derived exosomes inhibited proliferation of T lymphocytes and promoted differentiation of naive T cells into regulatory T cells. In addition, DFAT cell-derived exosomes stimulated proliferation of nucleus pulposus cells of intervertebral disc and increased expression of SOX9, a critical transcription factor for chondrogenesis. These results suggest that DFAT cell-derived exosomes have therapeutic potential for T cell-mediated autoimmune disorders and intervertebral disc degeneration.

研究分野：再生医学 血管生物学

キーワード：脱分化脂肪細胞 細胞治療 間葉系幹細胞 再生医療 エクソソーム

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ある種の細胞から分泌される脂質小胞 (エクソソーム) がマイクロ RNA(miRNA) や機能性タンパク質を多く含み、細胞間情報伝達に重要な役割を果たしていることが明らかにされた【図】(文献1)。エクソソームは脂質二重膜構造を有し体液中でも安定であることが知られ、がんなどの疾患に対するバイオマーカーとしての有用性のほか、核酸やタンパク質のデリバリーシステム(DDS)としての応用も期待されている。

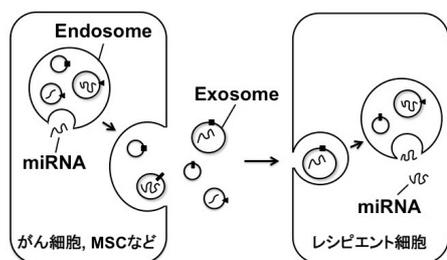


図. エクソソームを介する細胞間情報伝達

最近、エクソソームが間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) から豊富に分泌され、種々の治療効果を示すことが報告されている(文献2, 3)。研究代表者らは、成熟脂肪細胞を脱分化培養することにより得られる細胞群 (脱分化脂肪細胞: dedifferentiated fat cell, DFAT) が MSC に類似した多分化能を獲得することを明らかにした(文献4)。DFAT は少量の脂肪組織からドナー年齢に関係なく調製できるため、患者から安定的にエクソソームを調整する細胞ソースとして期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では同一ドナーに由来する皮下脂肪、骨髄脂肪から DFAT を調製し、その培養上清に含まれる種々の液性因子やエクソソームのプロファイルを網羅的に解析し、骨髄 MSC や脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cell, ASC) と比較する。また各種培養細胞 (血管内皮細胞、単球・マクロファージ、T リンパ球、椎間板髄核細胞など) に DFAT や ASC に由来するエクソソームを添加し、細胞への取り込みや、細胞増殖、細胞形質、細胞機能に及ぼす効果を比較検討する。上記の検討により、DFAT に由来するエクソソームの治療特性や DDS としての有用性を検証する。これらの研究を通じて DFAT 由来培養上清やエクソソームを用いた再生医療の可能性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) DFAT、骨髄 MSC、ASC のセレクトーム解析

医学部付属病院にて人工関節置換術を受ける患者を対象に、皮下脂肪組織および骨髄組織 (骨髄液) の提供を受ける。皮下脂肪組織から皮下脂肪由来 DFAT および ASC を調製する。また骨髄液からは骨髄脂肪由来 DFAT

および骨髄 MSC を調製する。それぞれの細胞の培養上清を採取し、マルチプレックスアッセイや質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて培養上清中の分泌タンパク質を網羅的に解析する。またターゲットとする主要タンパク質 (IL-6, IL-10, MCP-1, SDF-1, IGF-1, VEGF, HGF, Leptin など) は ELISA 法を用いて定量解析を行う。

#### (2) DFAT、骨髄 MSC、ASC に由来するエクソソームの解析

上記細胞の培養上清からエクソソーム濃縮試薬を用い、エクソソームを単離する。走査電子顕微鏡でその形態を観察するとともに、タンパク質を抽出後、電気泳動を行いウエスタンブロッティング法にてエクソソームのバイオマーカー (CD63, CD9, CD81, HSP70) を検出する。単離したエクソソームから total RNA を抽出し、含有するマイクロ RNA のプロファイルを miRNA アレイやリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析する。バイオインフォマティクスを用いた統合的解析法により、それぞれの細胞に特徴的なマイクロ RNA の同定を試みる。

#### (3) DFAT 由来エクソソームの培養細胞に及ぼす影響

##### ① 培養血管内皮細胞に及ぼす影響

培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に皮下脂肪由来 DFAT、ASC から調製したエクソソームを添加し、細胞増殖能、細胞遊走能、管腔形成能の変化について定量解析を行う。エクソソームの HUVEC への取り込みは、PKH67 ラベルしたエクソソームを培養液中に添加し、24 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析する。

##### ② 培養単球・マクロファージに及ぼす影響

ヒト末梢血から調整した培養ヒト単球・マクロファージに PKH ラベルした DFAT、ASC 由来エクソソームを添加し、細胞への取り込み能を検討する。またそれぞれの細胞に由来するエクソソームを培養マクロファージに添加し、72 時間後に炎症性メディエーターの産生変化や M1 フェノタイプと M2 フェノタイプの割合の変化をフローサイトメーターを用いて検討する。

##### ③ T リンパ球に及ぼす影響

ヒト末梢血から単離した T リンパ球に PKH ラベルした DFAT、ASC 由来エクソソームを添加し、細胞への取り込み能を検討する。またそれぞれの細胞に由来するエクソソームをヒト T 細胞に添加し、T 細胞の増殖や各種 T 細胞サブセット (制御性 T 細胞、Th17 細胞など) への分化に対する影響をフローサイトメーターを用いて解析する。

##### ④ 椎間板髄核細胞に及ぼす影響

ウサギ椎間板から単離調整した培養髄核

細胞に PKH67 でラベルした DFAT、ASC 由来エクソソームを添加し、細胞への取り込み能を検討する。皮下脂肪由来 DFAT、ASC に由来するエクソソームを培養髄核細胞に添加し、細胞増殖能や II 型コラーゲン、各種プロテオグリカンの産生能の変化をリアルタイム RT-PCR 法などを用いて評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1)DFAT、骨髄 MSC、ASC のセレクトーム解析

人工関節置換術を受ける患者を対象に皮下脂肪組織、骨髄液の提供を受け、皮下脂肪組織から皮下脂肪由来 DFAT および ASC を調製し、骨髄液から骨髄脂肪由来 DFAT および骨髄 MSC を調製した。それぞれの細胞の培養上清を採取し、分泌されたサイトカインを網羅的に解析した。その結果、検討した 4 種類の細胞ともに分泌量の多いサイトカインとして MCP-1、IL-6、IL-8、GRO、TIMP-1、TIMP-2 などが同定された。ELISA 法にて定量解析した結果、皮下脂肪由来 DFAT では、ASC や骨髄 MSC に比べ、HGF、SDF-1、VEGF、Leptin の発現が高い傾向にあることが明らかになった。特に VEGF および Leptin の発現は低酸素刺激下に 24 時間培養した皮下脂肪由来 DFAT で有意に発現増加することが明らかになった。

##### (2)DFAT、骨髄 MSC、ASC に由来するエクソソームの解析

上記細胞の培養上清よりエクソソーム濃縮試薬を用いてエクソソームを単離した。電子顕微鏡観察にて直径約 50-100 nm のエクソソームに特徴的な脂質小胞を認め、またウエスタンブロッティング法により、エクソソームマーカーである CD63 の発現を確認した。また単離したエクソソームから total RNA を抽出し、マイクロ RNA が高濃度に含有されていることをバイオアナライザーにて確認した。同一ドナーに由来する DFAT および ASC の培養上清よりエクソソームを単離後、Total RNA を抽出し、エクソソーム中のマイクロ RNA のプロファイルをもとに miRNA アレイを用いて解析した (n = 4)。その結果、DFAT 由来エクソソーム、ASC 由来エクソソームともに 200 個以上のマイクロ RNA が検出され、両者は再現性よく近似したマイクロ RNA 発現プロファイルを示すことが明らかになった。ASC 由来エクソソームに検出されず、DFAT 由来エクソソームのみに検出されるマイクロ RNA が 6 個同定された。一方、ASC 由来エクソソームのみに検出されるマイクロ RNA は同定されなかった。以上の結果より、DFAT 由来エクソソームは ASC 由来エクソソームに類似したマイクロ RNA プロファイルを示し、さらに DFAT に特有のマイクロ RNA も存在することが示された。

##### (3)DFAT 由来エクソソームの培養細胞に及ぼす影響

###### ①培養血管内皮細胞に及ぼす影響

PKH67 で蛍光標識した DFAT、ASC 由来エクソソームのヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) への取り込みを検討した。その結果、両細胞に由来するエクソソームはどちらも HUVEC に取り込まれることが確認できた。DFAT と HUVEC を共培養すると、HUVEC の増殖、遊走、管腔形成が促進されたが、DFAT 由来エクソソーム添加では、これらの明らかな促進効果は認められなかった。

###### ②培養単球・マクロファージに及ぼす影響

PKH67 で蛍光標識した DFAT、ASC 由来エクソソームのヒト培養単球・マクロファージへの取り込みを検討した。その結果、DFAT、ASC 由来エクソソームのこれらの細胞への取り込みは検出できなかった。またエクソソーム添加による培養単球・マクロファージの炎症性メディエーターの発現変化は認められなかった。

###### ③ T リンパ球に及ぼす影響

PKH67 で蛍光標識した DFAT、ASC 由来エクソソームのヒト末梢血リンパ球への取り込みを検討した。その結果、DFAT、ASC 由来エクソソームは共にリンパ球への取り込みが認められた。末梢血 T リンパ球や臍帯血ナイーブ T 細胞に対し DFAT 及び ASC 由来エクソソームを添加し、リンパ球増殖反応や各種 T 細胞へのサブセット分化に対する効果を検討した。その結果、DFAT 及び ASC 由来エクソソームは、用量依存性に T リンパ球の増殖抑制を示し、さらに臍帯血ナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞への分化効率を有意に促進させた。DFAT 及び ASC 由来エクソソームはリンパ球増殖抑制や制御性 T 細胞への分化促進を介して免疫制御に関与する可能性が示唆された。

###### ④ 椎間板髄核細胞に及ぼす影響

PKH67 で蛍光標識した DFAT、ASC 由来エクソソームを用いてウサギ椎間板髄核細胞への取り込みを検討した。その結果、DFAT 及び ASC 由来エクソソームは共に効率よく髄核細胞へ取り込まれることが明らかになった。次に DFAT 及び ASC 由来エクソソームを髄核細胞に添加し、髄核細胞の増殖能や遺伝子発現に及ぼす影響を評価した。その結果、DFAT 及び ASC 由来エクソソーム添加により、髄核細胞の増殖が有意に促進され、II 型コラーゲンやアグリカンの発現に係わる転写因子 SOX9 や、椎間板細胞外基質を構成するパーシカンや I 型コラーゲンの遺伝子発現が有意に増加することが明らかになった。以上の結果より、DFAT 及び ASC 由来エクソソームは髄核細胞に対し、変性抑制的に作用することが示唆された。

上記結果より、DFAT から分泌されるエクソソーム中には、細胞間情報伝達を担うマイクロ RNA が豊富に含まれ、そのプロファイルは

ASC に類似していることが明らかになった。DFAT 由来エクソソームおよびASC 由来エクソソームは、T リンパ球の増殖を抑制し、制御性 T 細胞への分化促進作用を示した。また DFAT 由来エクソソームおよびASC 由来エクソソームは、椎間板髄核細胞の増殖を促進し、軟骨再生に係わる転写因子 SOX9 の発現を増加させた。近年、ASC 由来エクソソームは種々の病態に対して治療効果を示すことが報告されている(文献 5, 6)。本研究結果から DFAT 由来エクソソームも ASC 由来エクソソームと同等の治療特性を有することが示唆された。特に DFAT 由来エクソソームは T リンパ球の異常を伴う自己免疫疾患や、髄核細胞の変性をその主病態とする変形性脊椎症に対し高い治療効果が期待できる。

#### <引用文献>

- ① Valadi H, et al. Nat Cell Biol 9:645-659, 2007
- ② Lai RC, et al. Stem Cell Res 4:214-222, 2010
- ③ Bruno S, et al. J Am Soc Nephrol 20:1053-1067, 2009
- ④ Matsumoto T, Kano K, et al. J Cell Physiol 215:210-222, 2008
- ⑤ Katsuda T, et al. Methods Mol Biol 1212:171-181, 2015
- ⑥ Kim YS, et al. Exp Mol Med 49:e284, 2017

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 13 件)

- ① Ikado Y, Obinata D, Matsumoto T, Murata Y, Kano K, Fukuda N, Yamaguchi K, Takahashi S. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells for treatment of vesicoureteral reflux in a rat model. International Urology and Nephrology 査読有 48(12): 1951-1960, 2016. DOI: 10.1007 /s11255-016-1426-5
- ② Taniguchi H, Kazama T, Hagikura K, Yamamoto C, Kazama M, Nagaoka Y, Matsumoto T. An efficient method to obtain dedifferentiated fat cells. Journal of Visualized Experiments 査読有 Jul 15; (133), 2016. DOI: 10.3791/54177
- ③ Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto T, Kano K, Endo M, Kazama M, Kazama T, Ikeda J, Matsuda H, Ueno T, Abe M, Okada K, Soma M, Matsumoto K, Kawachi H: Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increasing in TNF-stimulated gene 6. Stem Cell Research & Therapy 査読有 6(1): 80, 2015 DOI: 10.1186/s13287 -015-0069-2

#### 〔学会発表〕(計 17 件)

- ① 小野賀功, 小沼憲祥, 金澤剛二, 後藤俊平, 橋本真, 越永従道, 松本太郎: ヒト脱分化脂肪細胞(hDFAT)由来 exosome の免疫抑制能の検討, 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 宮城県・仙台市 2017. 3. 7
- ② 副島一孝, 櫻村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 皮膚の再生医療における脱分化脂肪細胞(DFAT)の有用性, 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 宮城県・仙台市 2017. 3. 7
- ③ 松本太郎: 脂肪細胞を用いた再生医療, 第 19 回日本内分泌病理学会学術総会, アバンセ佐賀, 佐賀県・佐賀市, 2015. 10. 25

#### 〔図書〕(計 1 件)

丸山高史, 松本太郎: 腎疾患に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療, 65(6): p593-598, 臨床免疫・アレルギー科, 科学評論社, 東京, 2016. 6

#### 〔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

<http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/saisei/dfat.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松本 太郎 (MATSUMOTO, Taro)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号: 50366580

##### (2) 研究分担者

加野 浩一郎 (KANO, Koichiro)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 80271039

副島 一孝 (SOEJIMA, Kazutaka)  
日本大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00246589

風間 智彦 (KAZAMA, Tomohiko)  
日本大学・医学部・助手  
研究者番号: 80525668