

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861513

研究課題名(和文) 糖尿病脂肪組織由来幹細胞の細胞生物学的特性の解明

研究課題名(英文) Clarification of cell biological properties of diabetic adipose tissue derived stem cells

研究代表者

須田 俊一 (SUDA, Shunichi)

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：70645861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者の増加に伴い難治性糖尿病性潰瘍患者も増えているが有効な治療法はなく下肢切断を余儀なくされる患者が多く、有効な治療法の開発が急務である。この原因の1つに糖尿病における血管幹細胞の機能低下がある。本研究では脂肪幹細胞に注目し、糖尿病における脂肪幹細胞の機能に関する解析を行った。その結果、脂肪幹細胞を血管に分化させることは困難であったが、血管を増殖させる因子を分泌することが判り、糖尿病ではこの因子が減少している事を見出した。さらにマウスにおいて潰瘍縮小促進作用、脂肪組織移植において脂肪幹細胞と血管幹細胞を同時に移植することで移植組織内の血管新生を促し生着率が向上する事を見出した。

研究成果の概要(英文)：As diabetic patients increase, the patients suffering from non-healing diabetic ulcer also increases and many of them go under lower limb amputations. There is no effective treatment for these patients after treatment modalities are exhausted. One of the etiologies is dysfunction of endothelial progenitor cells (EPC) which is the vascular stem cells in diabetic patients. Here, we focused the functions of adipose tissue-derived stem cells (ASC) in diabetes. We found that ASC were difficult to differentiate to vascular endothelial cells. On the other hands, ASC secreted various angiogenic factors to enhance angiogenesis. However, these founding were decreased in diabetes. ASC enhanced the wound closure and increased the viability of transplanted adipose tissue when mixing with EPC in mice. From these results, we conclude that ASC show strong indirect effects of angiogenesis through the secretion of angiogenic factors and the function is enhanced with co-transplantation with EPCs.

研究分野：形成外科学

キーワード：形成外科 幹細胞 脂肪組織 血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

2001年に初めて皮下脂肪組織中に骨髄由来幹細胞と同様の性質を有する細胞が存在することが世界で初めて発見されてから脂肪組織由来幹細胞(脂肪幹細胞、ASC; Adipose Stem Cell)は多くの研究者の注目を集めている(Zuk et al, Tissue Eng 2001)。更に脂肪組織由来幹細胞は *in vitro*, *in vivo* においても様々な成熟細胞(脂肪、骨、骨格筋など)に分化することが証明されている。脂肪幹細胞は実際の臨床応用を考えた際、骨髄由来幹細胞に比べ全身に大量に存在するため多くの細胞数を一度に採取できるという利点があるため将来の再生医療における重要な細胞源の一つとして認識され、世界中で臨床研究が開始されている。この脂肪幹細胞は近年、血管内皮細胞にも分化可能であることが証明され、動物実験において下肢虚血病変や虚血性心疾患の改善に有用であることがわかってきた(Planat-Bernard et al, Circulation 2004)。ヨーロッパでは心筋梗塞や下肢虚血に対して脂肪幹細胞移植の臨床研究が始まっている。

## 2. 研究の目的

近年、食生活の変化や高齢化に伴い動脈硬化、糖尿病の患者は増加の一途をたどっている。糖尿病性潰瘍の発症機序には神経性潰瘍と虚血性潰瘍の二つがあり、虚血が重度なほど治療に難渋する。そして、血管病変には大血管障害と微小循環障害が存在するが、大血管障害にはバイパス術などの血行再建術が有効であるが、微小循環障害では薬物療法に抵抗性である場合には有効な治療法がないのが現状である。糖尿病患者の増加に伴い難治性糖尿病性潰瘍患者も増えているが有効な治療法はなく下肢切断を余儀なくされる患者が多い。今後、有効な治療法の開発が急務であると考えらる。

これまでに糖尿病患者と健常人での比較の研究では、糖尿病患者と健常人の末梢血血管内皮前駆細胞(EPC; Endothelial Progenitor Cell)の数や増殖能、血管形成能、遊走能、接着能で糖尿病患者では優位に末梢血血管内皮前駆細胞の能力が低下していることが報告されている(Tepper OM et al, circulation 2002)。また、Caplaはマウス皮弁虚血モデルに対して糖尿病性患者と健常人血管内皮前駆細胞を静脈注射し、皮弁虚血部位における血管内皮前駆細胞の集積を解析したところ、糖尿病患者の血管内皮前駆細胞を注射した群において優位に血管形成や血管内皮前駆細胞の低下していることを証明している(Capla, JM et al, Plast Reconstr Surg 2007)。つまり糖尿病患者の血管内皮前駆細胞は虚血組織への遊走やホーミングが障害されていることが明らかにされた。そして、我々は過去に難治性糖尿病性潰瘍患者に対する骨髄由来末梢血血管内皮前駆細胞移植を行ったが、糖尿病患者にお

ける骨髄由来幹細胞は健常人に比べ数は少なく、組織再生能が有意に劣っているため十分な移植効果を認められなかったことを報告している(Tanaka et al, Cell Transplant, 2014)。これらの研究結果に基づき現在は、糖尿病患者の創傷治癒遅延や心血管系合併症の原因の一つとして、糖尿病環境下にある骨髄と末梢血血管内皮前駆細胞の機能障害が関係していると考えられている。現在血管再生治療として臨床研究ではあるが血管内皮前駆細胞の移植が行われているが、糖尿病患者に対して自己血管内皮前駆細胞移植を行う場合、血管内皮前駆細胞の量、質ともに健常人に比べ低下していることから移植効果が不十分となる可能性が考えられる。上記の結果を踏まえ、糖尿病性潰瘍の患者に対して新しい治療法を検討する必要がある。

2型糖尿病患者においては、血糖の上昇以外に肥満を伴うことが多く、脂肪組織由来組織の増加が観察される。しかしながら、その脂肪組織内における脂肪幹細胞の増減、機能に関しては、依然不明である。よって、現在までに脂肪幹細胞移植による難治性糖尿病潰瘍治療は行われておらず、糖尿病患者における脂肪幹細胞の細胞生物学的特性はまだ明らかにされていない。

本研究は、①糖尿病における脂肪幹細胞の細胞生物学的特性を明らかにする。そして②マウス潰瘍モデル、虚血モデルに対する脂肪幹細胞移植の有効性を評価することを目的とする。本研究の具体的目的は下記の通り実施する。

1. 脂肪幹細胞の血管内皮細胞への分化の有無を *in vitro*, *in vivo* で明らかにする。

2. I型とII型糖尿病マウス脂肪幹細胞のVEGF、TGF- $\beta$ 、HGFなどを測定することで健常マウスと糖尿病性マウスでの血管再生能、血管形成能、接着能、増殖能、遊走能を評価し比較する。そして、機能低下が認められる場合には、その原因の検索を行う。

3. 動物実験においてI型とII型糖尿病マウス脂肪幹細胞の生体内での創傷治癒における役割を明らかにする。

4. 我々が過去に行ったマウス潰瘍モデルに対する糖尿病骨髄由来幹細胞移植効果と比較する。

現在難治性糖尿病性潰瘍患者に対する有効な治療法はないが、本研究で有効な治療法であることが証明できれば世界初であり、今後の糖尿病患者における新しい再生治療としての可能性が生まれる。

## 3. 研究の方法

### 脂肪幹細胞の血管内皮細胞への分化誘導

脂肪幹細胞は、マウス鼠径部より採取する。各群のマウスより取り出した脂肪組織をコラゲナーゼで消化したのち、遠心分離により脂肪組織に多く含まれる脂肪細胞と幹細胞を分離する。分離した脂肪幹細胞は、10% FBSを含むDMEMあるいはIMDMにて培養を行

う。以降の実験には、3 継代以内の細胞を用いて下記を確認する。

**血管内皮細胞への分化の確認**：血管内皮前駆細胞への分化誘導は、各群より調整した脂肪幹細胞を Flt-3L, TPO, VEGF, IL-6, SCF を加えた造血幹細胞用無血清増殖培地 StemSpan にて培養を行うことにより行う。あるいは、無血清で分化誘導培養が困難な場合は 10%FBS 添加 DMEM あるいは IMDM にレチノイン酸または VEGF を添加した培地を用いて分化誘導を行う。上記培養で得られた脂肪組織幹細胞由来血管内皮細胞の評価は以下のごとく行う。

**血管再生能の評価**：EPC-Colony Forming Assay により行う。増殖因子を添加したメチルセルロース培地に分化誘導した細胞を播種し、コロニー形成能を計測し、血管再生能を評価する。

**血管形成能評価**：Tube Formation Assay により行う。マトリゲルでコートした培養皿上に分化誘導した細胞を播種し、血管形成能を観察、計測し、血管形成能を評価する。

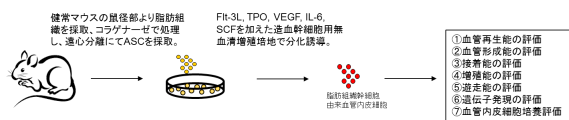
**血管内皮細胞培養評価**：EPC Culture Assay により行う。分化誘導した細胞を血管内皮細胞用培地にて培養し、Isolectin B-4 結合および LDL の取りこみを計測し、血管内皮細胞への分化の評価を行う。

**接着能評価**：Adhesion Assay により行う。マトリゲルでコートした培養皿上に細胞を播種し、接着する細胞を計測し、接着能の評価を行う。

**増殖能評価**：Proliferation Assay を行う。分化誘導した細胞をカウント、あるいは WST 試薬を用いて、培養による細胞の増加を計測し、細胞増殖能を評価する。

**遺伝子発現の評価**：Real-time PCR により行う。分化誘導前後の細胞から分離した mRNA より得た cDNA を鋳型として定量 PCR を行い VEGF, Ang-1, FGF-2 など血管新生関連遺伝子の発現を計測し、遺伝子発現の変化を評価する。

**サイトカイン分泌**：分泌されるサイトカインの測定は、既存の ELISA キットを用いて行う。培地を回収後、測定時まで凍結し保存する。回収した培地はそれぞれの定量範囲に応じて希釈して測定する。測定するサイトカインは、PDGF-AB, HGF, IGF, TGF- $\beta$ , VEGF とし、各 ELISA キットに添付された方法に従い測定を行う。



図：脂肪幹細胞の調製スキーム

## I 型糖尿病マウス及びラット脂肪幹細胞の血管再生能の評価

I 型糖尿病マウス及びラットはストレプトゾトシン投与により作成したマウス・ラッ

トを使用する。糖尿病群から健常と同様に脂肪幹細胞を採取し、上記と同様の実験を行い、その結果を健常マウス脂肪幹細胞の機能と比較し、糖尿病由来幹細胞より分化誘導した血管内皮細胞としての機能の低下・亢進など異常の有無を評価する。健常および糖尿病の各群より調製した脂肪幹細胞およびその細胞より分化誘導した血管内皮前駆細胞について生体内での機能評価を行うため、C57BL/6 マウスに下肢虚血あるいは潰瘍モデルを作成し各群とコントロールを移植する。移植後継時的に写真撮影にて潰瘍縮小率を確認し、組織学的評価による組織内血管密度 (CD 31 染色)、肉芽形成 (HE 染色)、上皮形成 (ケラチノサイト染色) の評価を行う。また、real-time PCR による血管内皮細胞特異的遺伝子発現 (CD31, VE-Cadherin, VEGFR-2) を確認する。

## マウス血管内皮前駆細胞と脂肪組織幹細胞の脂肪移植における評価

マウス血管内皮前駆細胞の調製は、すでに我々の研究室で確立された方法に従った。マウス骨髓細胞を取り出し、磁気ビーズを用いた方法で分化マーカーを発現する細胞群を除き、さらに c-Kit, Sca-1 が陽性な細胞の分離を FACS Aria によるソーティング機能を使用して行い、マウス血管内皮前駆細胞として KSL (c-Kit+, Sca-1+, lineage-) 細胞を調製した。調整した KSL 及び SVF (Stromal Vascular Fraction、間質血管細胞群) は、同系統のマウスより調製した脂肪組織と混合してマウスへ移植された。

移植された組織は、5 週間後回収し、生着率及び遺伝子発現を検証する。

## 4. 研究成果

### 健常及び糖尿病マウスからの脂肪幹細胞調製法の検討

最初にマウスから脂肪幹細胞を調製する方法の確立を行った。健常マウスの鼠径部より取り出した脂肪組織よりコラゲナーゼ処理、遠心分離を行い、SVF を調製し、分散・培養を行って脂肪幹細胞を採取する方法を確立した。

また、ストレプトゾトシンを投与して糖尿病を誘導したマウスを 1 型糖尿病モデルマウスとして、糖尿病マウスより脂肪幹細胞の調製を健常マウスと同様の方法で試み、確立した。

健常および糖尿病マウスについて脂肪幹細胞調整過程の比較を行ったところ、体重および回収した脂肪組織の重量に有意な差を認めしたが、SVF として調製された細胞数には有意差が見られず、ほぼ同数の細胞が得られた。

マウス脂肪幹細胞からの分化誘導について、血管内皮細胞への分化に関して、健常マウスより調製した SVF について解析を行った。血管内皮前駆細胞を分化誘導する方法は、

我々の研究室ですでに開発している。この方法に基づいて3種類の培地を用いてSVFから血管内皮細胞への分化誘導に関する実験を行った。すなわち血管内皮前駆細胞より血管内皮細胞へ分化させるための方法として、①Stemspan培地へ5種類のサイトカイン・増殖因子を添加した培養方法、②血管内皮細胞を増殖させるEGM-2培地を用いた培養、③通常のSVFより脂肪幹細胞を調製するための培養法(10%FBS添加DMEM培地)について比較を行った。血管内皮細胞は、FITCラベルしたIsolectin B4及びDil-AcLDLにより染色される細胞として検出を行った。この結果、①の条件ではSVFの細胞接着及び増殖がうまくいかず、少数のスピンダル状の細胞が得られただけであり、今後の実験に十分な細胞数が得られないことが判った。②及び③の条件下では、細胞の接着及び増殖が見られたが、②でも③と同様の血管内皮細胞数しか得られなかった。

### 脂肪幹細胞から分泌されるサイトカイン/増殖因子の検討

以上のことより、現行法によってSVFあるいは脂肪幹細胞より血管内皮細胞への分化誘導は極めて困難であると考えられた。

先に確立した健常およびストレプトゾトシン誘導1型糖尿病マウスより脂肪幹細胞を調製する方法を応用し同様の方法を用いて、ラットよりそれぞれ脂肪幹細胞の調製したのち10%FBSを加えたDMEMで培養を行い、以下の実験に供した。

先の結果より脂肪幹細胞より血管内皮細胞あるいは血管内皮前駆細胞へのin vitroにおける分化誘導は極めて困難であることが判っている。このことから脂肪幹細胞を直接移植により投与してそのサイトカイン分泌などトロフィック効果により血管再生を促進出来ないか確認するためSVFおよび脂肪幹細胞より分泌される増殖因子(PDGF-AB,

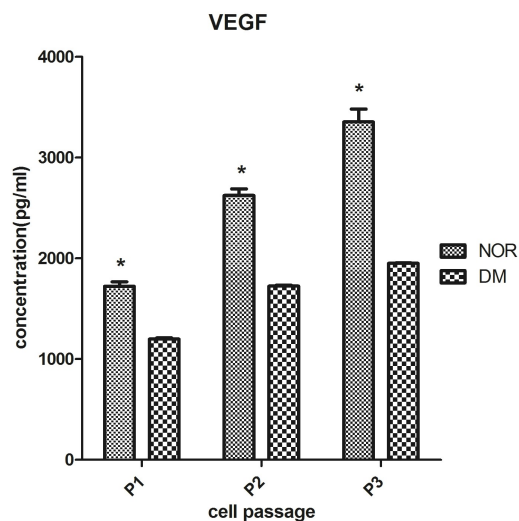


図1 健常及び糖尿病SVF及び脂肪幹細胞におけるVEGFの分泌

HGF, IGF, TGF- $\beta$ , VEGF)の解析をELISA法にて行った。この結果、SVF、脂肪幹細胞ともにPDGFの分泌は見られなかったが、SVF及び脂肪幹細胞でHGF, IGF, VEGF, TGF- $\beta$ の分泌が確認され、VEGF及びHGFでは糖尿病ラットにおいて分泌の有意な減少が見られた(図1, 2)。

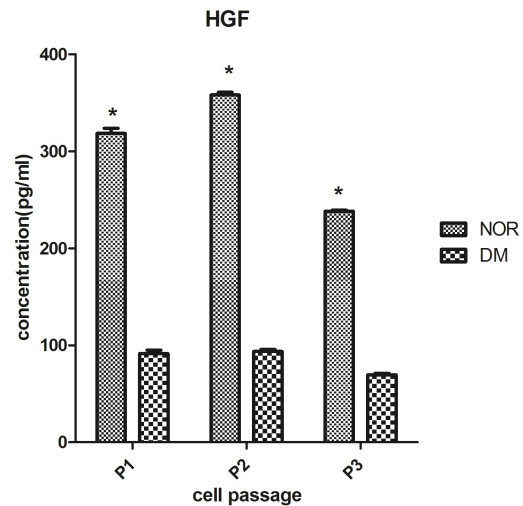


図2 健常及び糖尿病SVF及び脂肪幹細胞におけるHGFの分泌

以上の事実よりラット由来の脂肪幹細胞は、サイトカインの分泌により血管・組織再生効果が見込める可能性が示唆された。

### 脂肪幹細胞による潰瘍縮小促進効果の検討

これまでの結果より脂肪幹細胞を血管内皮細胞あるいは血管内皮前駆細胞へ分化誘導することは困難であることが明らかになったが、脂肪幹細胞がサイトカインなど血管増殖因子を分泌し、そのトロフィック効果により血管再生を促す可能性が示唆されている。そこで次にモデル動物における脂肪幹細胞を用いた血管・組織再生効果の検証及び脂肪幹細胞を含む脂肪組織と血管内皮前駆細胞の同時移植による脂肪組織生着率への影響を確認した。

潰瘍モデル動物としてラット背部に潰瘍を作成し、すでに確立した調整法に基づき調製したラット脂肪幹細胞を移植した。移植後20日までの観察により脂肪幹細胞移植群ではコントロール(生食移植)群に比べ潰瘍閉鎖までの時間が短縮されており、脂肪幹細胞の血管・組織修復及び再生促進への効果が示された。これらの結果は、先に明らかにした脂肪幹細胞が分泌するサイトカイン等の血管増殖因子によるトロフィック効果の関与が示唆される。

### 脂肪幹細胞及び血管内皮前駆細胞による移植脂肪組織の生着率の検討

次に我々が以前より研究を行っている血管内皮前駆細胞と脂肪幹細胞の相乗効果の検証を行う目的で動物実験を行った。脂肪幹細胞と血管内皮前駆細胞を混合した脂肪を

移植することで血管内皮前駆細胞による血管新生が移植組織の生着率にもたらす影響を検証した。当研究室で確立された方法により血管内皮前駆細胞を骨髄より KSL (c-Kit+, Sca-1+, Lineage-) 細胞として調製し、さらに当研究室で開発された数と血管再生能を向上させる生体外増幅培養 (QQ) 法に供した KSL-QQ 細胞を用いた。観察期間終了後の生着率を評価した。その結果、移植 5 週後のデータでは脂肪組織と KSL-QQ あるいは KSL-QQ+脂肪幹細胞移植群の生着率が有意に高く、血管内皮前駆細胞の関与が脂肪移植における血管形成において重要であることが示唆された。

以上、本研究期間においてマウス・ラットより調製した脂肪幹細胞を用いて糖尿病における当該細胞の性質の変化を明らかにした。さらに脂肪移植において脂肪幹細胞及び血管内皮前駆細胞の同時移植により血管形成の増加による移植組織の生着率の向上を明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(症例報告)

① 須田俊一、林 礼人、古元将和、荒川 敦、水野博司. 生下時より存在した臀部 Bednar 腫瘍の 1 例. 日形会誌、査読有、 35 No. 1 2015 pp24-3

〔学会発表〕(計 4 件)

① 須田俊一、古元将和、名取悠平、堀口雅敏、佐藤瑠美子、吉澤秀和、林礼人、水野博司. 梶川第 2 法における臍形成術に関する小工夫. 第 57 回日本形成外科学会総会・学術集会、2014. 4. 11、長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

② 須田俊一、望月真理子、佐藤瑠美子、林礼人、水野博司. 腹腔鏡術後の臍変形に対する梶川第 2 法“変法”による臍形成術の有用性. 第 58 回日本形成外科学会総会・学術集会、2015. 4. 10、ウエスティン都ホテル京都 (京都府京都市)

③ 北村理絵、須田俊一、林 礼人、水野博司. 脂漏性角化症から発症した Bowen 病の一例. 関東形成外科学会 第 283 回東京地方会、2015. 12. 5、ステーションコンファレンス東京 (東京都千代田区)

④ 北村理絵、須田俊一、曾我部陽子、友政

蘭、鈴木 忍、林 礼人、水野博司. 脂漏性角化症病巣内から発症した Bowen 病の一例. 第 32 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、2016. 5. 28、かごしま県民交流センター (鹿児島県鹿児島市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

須田 俊一 (SUDA Shunichi)  
順天堂大学・医学部・非常勤助手  
研究者番号：70645861

##### (4) 研究協力者

田中 里佳 (TANAKA, Rica)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：70509827

飛田 護邦 (TOBITA, Morikuni)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：10599038

水野 博司 (MIZUNO, Hiroshi)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：80343606