

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18587

研究課題名（和文）高品質DFAT細胞調達法の開発に向けたセノリティック薬と抗老化薬の応用

研究課題名（英文）Application of Senolytics and Anti-Aging Drugs for the Development of High Quality DFAT Cell Procurement Methods

研究代表者

笹山 智史（SASAYAMA, Satoshi）

大阪歯科大学・歯学部・講師（非常勤）

研究者番号：50865821

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：一般的に細胞は長期間培養されると複製老化がおこる。また、近年、老化した細胞は、炎症性物質等の細胞老化関連分泌形質（SASP）因子を分泌し、周囲組織に傷害を及ぼす事が明らかになっている。本研究では、細胞老化後の脱分化脂肪細胞（DFAT細胞）の特性評価や、骨再生を増強させる効果的な老化細胞の除去法の探索を通し、幹細胞治療の礎となる基礎知見の収集を目指した。その結果、継代数を重ねたDFAT細胞において、細胞形態の扁平化や、核の肥大化、複数の老化マーカー・SASP因子の発現増強が確認できた。研究期間内に、に到達は出来なかったが、複製老化DFAT細胞の特性に関して詳細な知見を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

均質で膨大な量の細胞の確保は、今なお再生医療の発展における足かせとなっている。組織採取が容易な脂肪に起源を持つ脱分化脂肪細胞（DFAT細胞）は、骨髄由来間葉系幹細胞（BMSC）同様に増殖能に優れ、新たな細胞ソースとして期待されている。本研究では、細胞老化後のDFAT細胞の詳細な特性の解析に取り組んだ。その結果、細胞形態の扁平化や、核の肥大化、複数の老化マーカー・種々のSASP因子の発現増強が確認できた。

研究成果の概要（英文）：Cells generally undergo replicative senescence when cultured for long periods. Senescent cells secrete senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors, such as inflammatory cytokines, causing deleterious effects on surrounding tissues. In this project, we aimed to collect basic knowledge that will serve as a foundation for stem cell therapy by (1) characterizing senescent dedifferentiated fat cells (DFAT cells) and (2) exploring effective methods of removing senescent cells to enhance bone regeneration. As a result, we observed the flattened shape of cells, nuclear enlargement, and expression of several senescence markers and SASP factors after repeated passages of DFAT cells. Although we could not reach the second project during the entire research period, we reached a detailed understanding of the characteristics of replicative senescent DFAT cells.

研究分野：再生医療

キーワード：老化細胞

1. 研究開始当初の背景

均質で膨大な量の細胞の確保は、今なお再生医療の発展における足かせとなっている。組織採取が容易な脂肪に由来を持つ脱分化脂肪細胞 (DFAT 細胞) は、骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) 同様に増殖能に優れ、免疫抑制効果を持つことから、新たな細胞ソースとして期待されている。しかし、再生医療に耐えうるだけの十分な細胞数を確保するには、他の細胞同様に長期間の細胞培養が必須となる。一般的に、細胞は長期間培養されると複製老化が起こり、細胞機能 (増殖能、分化能) が衰える。また、近年、老化した細胞は、炎症性物質等の細胞老化関連分泌形質 (SASP) 因子を分泌し、周囲組織に傷害を及ぼす事が明らかになっている。将来的な DFAT 細胞の安全な利用に向け、老化 DFAT 細胞の詳細な特性評価、抗老化処理、あるいは老化細胞の効率的な除去方法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究は、老化 DFAT 細胞と、同細胞への 3 種類の減少方法探索を通して、上記問いの一部を解明し、次世代の再生医療の礎を築くことを目的とした。
同計画完遂には下記の 2 つの課題が考えられた。

- ・課題 1) 老化程度の異なる DFAT 細胞の安定した調達と特性評価を行える環境
- ・課題 2) 老化細胞を除去・減少しうる効果的な薬剤の入手と使用経験

3. 研究の方法

下記のプロセスを実施し、目的の達成を目指した。1) 老化 DFAT 細胞の調達と特性評価、2) 抗老化・老化細胞除去条件の探索

Step1

1: 老化 DFAT 細胞の調達と特性評価

1-1) 老化 DFAT 細胞の調達

F344 ラットの鼠径部から脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理とフィルタリング後に、浮遊している成熟脂肪細胞を得る。その後天井培養法で 2 週間培養したものをラット DFAT 細胞とする。実験方法は右記の論文に準じた (Matsumoto, J Cell Physiology, 2008, 215, 210)。その後、通常培地内で培養し継代数 (老化程度) が異なる多種類の細胞を用意した。ばらつきを考慮し、3 匹の脂肪より調達した複数のロットを用意した。

1-2) 老化 DFAT 細胞の増殖能、細胞形態、SASP 因子の評価

上記で用意した異なる継代数の DFAT 細胞の増殖能を WST-8 評価で比較検討した。老化程度の比較には、代表的な細胞老化マーカー SA- β -Gal 染色 (細胞老化アッセイ酸性 β ガラクトシダーゼ測定キットの利用) や p16、p21、uPAR 抗体による免疫組織学的染色を用いた。また、核の形態評価には、DAPI 染色を、更に、SASP 因子の評価では Rat cytokine and chemokine RT2 Profiler PCR Array (cat. no. 330231 PARN-150ZA, Qiagen) を用いて評価した。統計的処理には、GraphPad Prism 8 software を用い Student's t-test にて評価した。DFAT 細胞の表面抗原マーカーの変化は FACS を用いて、CD34、CD45、CD90、CD105 について調査した。

Step2

2: 抗老化・老化細胞除去の最適条件の探索

抗老化効果がある薬剤を、非老化細胞の細胞生存率が低下しない濃度で細胞培養液に添加し、抗老化効果を評価することを計画した。しかし、老化細胞の調製や特性評価に時間がとられ、本助成期間においては遂行出来なかった。同実験は、将来的に有用な細胞ソースを得るための効果的な方法となると考えており、後日再度研究の遂行を計画している。

4. 研究成果

1-1) 老化 DFAT 細胞の調達

ラット鼠径部の脂肪組織から成熟脂肪細胞を回収後、天井培養法を用いて接着細胞を回収した。継代数 1 においては、依然として多数の血球系の細胞が混入していたが、継代数 3 になると、線維芽細胞様の形態を示す接着細胞が多数を占めた。更に、継代数 60 まで継代を重ね、継代数 3、

15、40、60、他の細胞を最終的に得た。

1-2) 老化 DFAT 細胞の特性、細胞・核形態、SASP 因子の評価

継代数の増加にもかかわらず、調査した 4 つの表面抗原マーカーでは顕著な差が認められなかった。継代数 15 までは、細胞形態が線維芽細胞状を示していたが、継代数 40 や 60 では、より扁平な細胞形態へとの変化が認められた。継代数 60 の細胞では、継代数 3 の細胞に比べ顕著に p21、p16、uPAR などの老化マーカーが陽性である細胞の増加が認められた。継代数 60 では p21 陽性細胞が殆どを示したのに対し、p16 あるいは、uPAR 陽性の細胞は p21 陽性細胞より少ない量に留まった。継代数 60 の細胞では、核の肥大が認められた。一方、DNA 損傷を示す、 γ H2AX が陽性の細胞が継代数 60 の細胞ではより多く認められた。

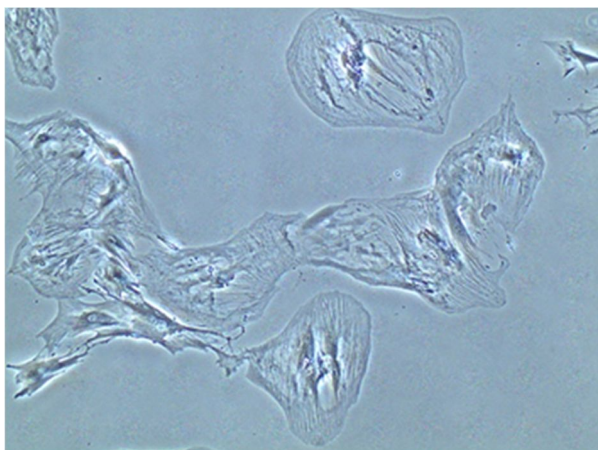


図 1：継代を重ねて扁平化した DFAT 細胞の光学顕微鏡像

SASP 因子を確認するために行った PCR アレイの結果、継代数 60 の細胞で *IL-6*、*tnf* をはじめ多くのサイトカインに関連する遺伝子の発現増強が認められた。一方、*Bmp6*、*Spp1* 等については、継代数 3 の細胞より発現が低下することが明らかとなった。

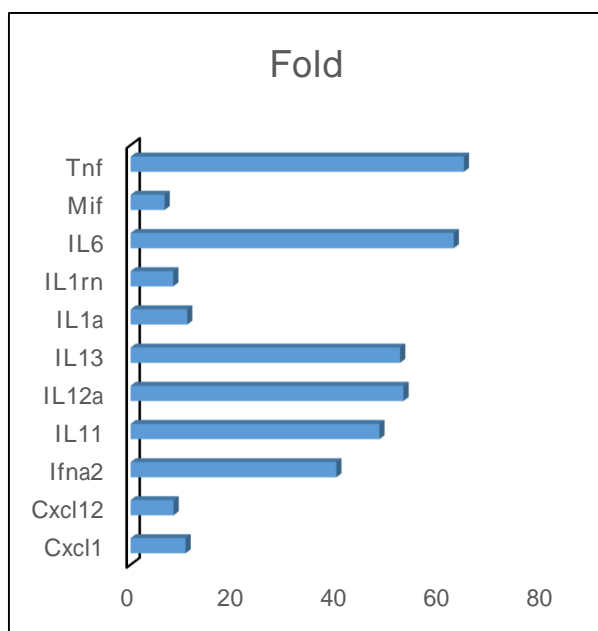


図 2：複製老化した DFAT 細胞で発現が増強した遺伝子の例（PCR array の結果）

以上の結果、本研究期間では、老化 DFAT 細胞の効果的な除去法の探索までは到達出来なかったが、複製老化した DFAT 細胞の形質について複数の知見を得た。同知見は、継代を重ねた DFAT 細胞を用いた再生医療や、他の幹細胞研究の一助となると思われる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1 . 著者名 DENG Wenqi、JO Jun-ichiro、MORIKUNI Hidetoshi、SASAYAMA Satoshi、HASHIMOTO Yoshiya、MATSUMOTO Naoyuki、HONDA Yoshitomo	4 . 巻 42
2 . 論文標題 Senescence-associated secretory phenotypes in rat-derived dedifferentiated fat cells with replicative senescence	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 Dental Materials Journal	6 . 最初と最後の頁 351 ~ 359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2022-242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------