

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659443

研究課題名（和文）

新規脂肪由来間葉系幹細胞における免疫制御分子機構の解明

研究課題名（英文）

Elucidation of molecular mechanisms involved in the immunomodulatory function of newly developed adipose tissue derived mesenchymal stem cells 研究代表者

松尾 清一 (MATSUO SEIICHI)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70190410

研究成果の概要（和文）：

申請者らは、これまでに低血清培養型脂肪由来幹細胞（LASC）にはT細胞増殖抑制効果やM2型（免疫調整性）マクロファージ(MΦ)分化促進効果があることを発見し、その効果は高血清培養型脂肪由来幹細胞（HASC）や骨髄由来間葉系幹細胞（BM-MSC）に比べて格段に高いものであることを見出している。本研究では、LASC、HASC および BM-MSC を比較することにより LASC の免疫抑制効果の分子メカニズムの解明に取り組んだ。

中和実験、刺激実験から LASC 由来の PGE2, IL-6 が M2 マクロファージの形質転化に必須であることを見出し、さらに PGE2 は EP4 レセプターを介して M2 マクロファージの形質転化を誘導していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have proven that low serum cultured adipose derived mesenchymal stem cells (LASC) suppress T cell proliferation and induce polarization of macrophages into immunomodulatory M2 type, and that these effects of LASC were much stronger than high serum cultured adipose derived mesenchymal stem cells (HASC) or bone marrow derived mesenchymal stem cells (BM-MSC). In this study, we studied the mechanisms involved in the immunosuppressive function of LASC by comparing with HASC or BM-MSC. We found by neutralization experiment and stimulation experiment that LASC derived PGE2 and IL-6 are necessary for the polarization of M2 macrophages, and that PGE2 function via EP4 receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：幹細胞、再生医療、免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

近年、BM-MSC が免疫抑制作用を有することが明らかとなり、骨髄移植後の移植片対宿主病 (GVHD) に対する治療として臨床応用され効果を挙げている (Blanc KL, 2004 The Lancet)。一方、本申請者らは、ヒト皮下脂肪から分化能力と増殖能力の高い MSC の選択的分離培養法 (=低血清

培養法) を世界に先駆けて開発した (特願 2008-528826, 国際公開第 PCT/JP2009/000863)。これまでに、腎疾患をはじめとする各種免疫・炎症疾患モデルに対し、LASC が高い治療効果を示すことを明らかにしてきた。(特願 2009-233991, 米国 12/310,034(US)) さらに LASC は *in vitro* で T 細胞増殖抑制作

用や M2 型 (免疫調整性) マクロファージ (MΦ) への分化を促進することを発見した。これらの免疫調整能について、LASC、HASC、BM-MSC の 3 者で比較したところ、LASC の効果が最も強かった。LASC の免疫制御機構を解明することで MSC の本質に迫ることができると思う。

2. 研究の目的

本申請者らは、これまでに低血清培養型脂肪由来幹細胞 (LASC) には T 細胞増殖抑制効果や M2 型 (免疫調整性) マクロファージ (MΦ) 分化促進効果があることを発見し、その効果は高血清培養型脂肪由来幹細胞 (HASC) や骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) に比べて格段に高いものであることを明らかにした。本研究では、LASC、HASC および BM-MSC を比較することにより LASC の免疫抑制効果の分子メカニズムの解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究では、本申請者らが発見した低濃度血清培養型脂肪由来幹細胞 (LASC) の免疫抑制機構についての作用メカニズム解明を試みた。ラット LASC によるマクロファージの M2 への形質転換効果について、ラット腹腔内マクロファージとラット LASC を *in vitro* で以下の方法で検討した。M2 マクロファージは CD11b+CD163+マクロファージで定義した。

a. LASC による M2 への形質転化に液性因子が重要であるか、細胞同士の接着が必要であるかを transwell plate system により検討した。メンブレンは細胞が通過できない 0.4 μm を使用した。

b. 液性因子の解析において HASC と BM-MSC より LASC の分泌能が高い蛋白に注目して中和実験を行った。その中で LASC の PGE2 産生を抑制するため COX-2 阻害薬 (CAY10404) を培養液に添加し、また LASC の IL-6 を中和するため IL-6 中和抗体を培養液に添加して、LASC の M2 誘導因子の探索を行った。

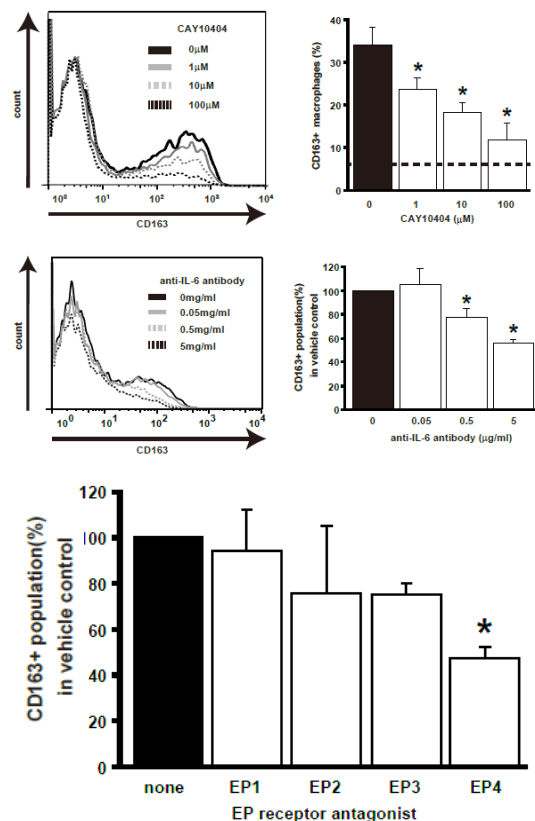
c. PGE2 がどのタイプのプロスタグランジン E2 レセプター (EP) を介して M2 マクロファージを誘導しているかを EP1~4 各レセプターアンタゴニストを使用して検討した。

4. 研究成果

LASC はマクロファージとの共培養により、BM-MSC、HASC と比べてより強力な IL-10 の産生能と M2 マクロファージ誘導能を発揮した。その機序として、transwell-plate system を

使用した実験から (研究の方法 a) LASC 由来の液性因子だけでも M2 マクロファージを誘導できるが、LASC とマクロファージの細胞間接着により M2 誘導能が増強されることが示された。この液性因子として PGE2 と IL-6 の関与が中和実験・刺激実験から明らかとなった。(研究の方法 b)

PGE2 レセプターとして EP1, 2, 3, 4 が知られているが、アンタゴニストを使用した実験より (研究の方法 c) EP4 レセプターアンタゴニストが有意に LASC による M2 マクロファージ誘導能を阻害した。



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 17 件)

1. Low serum cultured adipose tissue-derived stromal cells ameliorate acute kidney injury in rats. Katsuno T, Ozaki T, Saka Y, Furuhashi K, Kim H, Yasuda K, Yamamoto T, Sato W, Tsuboi N, Mizuno M, Ito Y, Imai E, Matsuo S, Maruyama S. Cell Transplant. in press. 査読有

2. Transforming growth factor-β induces vascular endothelial growth factor-C expression leading to lymphangiogenesis in rat unilateral

- ureteral obstruction. Suzuki Y, Ito Y, Mizuno M, Kinashi H, Sawai A, Noda Y, Mizuno T, Shimizu H, Fujita Y, Matsui K, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Takei Y. *Kidney Int.* 81(9):865-79 2012. 査読有
3. Glomerular hyperfiltration in prediabetes and prehypertension. Okada R, Yasuda Y, Tsushita K, Wakai K, Hamajima N, Matsuo S. *Nephrol Dial Transplant.* 27(5):1821-5. 2012 査読有
4. Atelocollagen-mediated systemic delivery prevents immunostimulatory adverse effects of siRNA in mammals. Inaba S, Nagahara S, Makita N, Tarumi Y, Ishimoto T, Matsuo S, Kadomatsu K, Takei Y. *Mol Ther.* 20(2):356-66. 2012 査読有
5. Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy. Hirayama A, Nakashima E, Sugimoto M, Akiyama S, Sato W, Maruyama S, Matsuo S, Tomita M, Yuzawa Y, Soga T. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Dec;404(10):3101-9. 査読有
6. Distribution of hydrogen sulfide (H₂S)-producing enzymes and the roles of the H₂S donor sodium hydrosulfide in diabetic nephropathy. Yamamoto J, Sato W, Kosugi T, Yamamoto T, Kimura T, Taniguchi S, Kojima H, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Yuzawa Y, Niki I. *Clin Exp Nephrol.* 2013 Feb;17(1):32-40. 査読有
7. Combined Values of Serum Albumin, C-Reactive Protein and Body Mass Index at Dialysis Initiation Accurately Predicts Long-Term Mortality. Takahashi R, Ito Y, Takahashi H, Ishii H, Kasuga H, Mizuno M, Suzuki Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Murohara T, Imai E, Matsuo S. *Am J Nephrol.* 2012;36(2):136-43. 査読有
8. Autologous cell therapy for cisplatin-induced acute kidney injury by using non-expanded adipose tissue-derived cells. Yasuda K, Ozaki T, Saka Y, Yamamoto T, Gotoh M, Ito Y, Yuzawa Y, Matsuo s, Maruyama S. *Cytotherapy.* 2012 Oct;14(9):1089-100. 査読有
9. Complete remission within 2 years predicts a good prognosis after methylprednisolone pulse therapy in patients with IgA nephropathy. Tatematsu M, Yasuda Y, Morita Y, Sakamoto I, Kurata K, Naruse T, Yamamoto R, Tsuboi N, Sato W, Imai E, Matsuo s, Maruyama S. *Clin Exp Nephrol.* 2012 Dec;16(6):883-91 査読有
10. ANCA-associated systemic vasculitis in Japan: clinical features and prognostic changes. Yamagata K, Usui J, Saito C, Yamaguchi N, Hirayama K, Mase K, Kobayashi M, Koyama A, Sugiyama H, Nitta K, Wada T, Muso E, Arimura Y, Makino H, Matsuo s. *Clin Exp Nephrol.* 2012 Aug;16(4):580-8. 査読有
11. Adipose-derived stromal cells cultured in a low-serum medium, but not bone marrow-derived stromal cells, impede xenoantibody production. Saka Y, Furuhashi K, Katsuno T, Kim H, Ozaki T, Iwasaki K, Haneda M, Sato W, Tsuboi N, Ito Y, Matsuo s, Kobayashi T, Maruyama S. *Xenotransplantation.* 2011 May-Jun;18(3):196-208. 査読有
12. Specific collaboration between rat membrane complement regulators Crry and CD59 protects peritoneum from damage by autologous complement activation. Mizuno T, Mizuno M, Morgan BP, Noda Y, Yamada K, Okada N, Yuzawa Y, Matsuo s, Ito Y. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Jun;26(6):1821-30. 査読有
13. Atrial natriuretic peptide ameliorates peritoneal fibrosis in rat peritonitis model. Kato H, Mizuno T, Mizuno M, Sawai A, Suzuki Y, Kinashi H, Nagura F, Maruyama S, Noda Y, Yamada K, Matsuo s, Ito Y. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Feb;27(2):526-36.
14. Management of anemia in chronic kidney disease patients: baseline findings from Chronic Kidney Disease Japan Cohort Study. Akizawa T, Makino H, Matsuo s, Watanabe T, Imai E, Nitta K, Ohashi Y, Hishida A. *Clin Exp Nephrol.* 2011 Apr;15(2):248-57. 査読有
15. Basigin/CD147 promotes renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. Kato N, Kosugi T, Sato W, Ishimoto T, Kojima H, Sato Y, Sakamoto K, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo s, Kadomatsu K. *Am J Pathol.* 2011 Feb;178(2):572-9. 査読有
16. Analysis of glial cell line-derived neurotrophic factor-inducible zinc finger protein 1 expression in human diseased kidney. Saito S, Murakumo Y, Tsuzuki T, Dambara A, Kato T, Enomoto A, Asai N, Maruyama S, Matsuo s, Takahashi M. *Hum Pathol.* 2011 Jun;42(6):848-58. 査読有
17. Growth factor Midkine is involved in

the pathogenesis of renal injury induced by protein overload containing endotoxin. Kato K, Kosugi T, Sato W, Arata-Kawai H, Ozaki T, Tsuboi N, Ito I, Tawada H, Yuzawa Y, Matsuo s, Kadomatsu K, Maruyama S. Clin Exp Nephrol. 2011 Jun;15(3):346-54. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Lack of Basigin Exacerbates Lupus Nephritis in Experimental Lupus Model. Kayaho Maeda, Tomoki Kosugi, Waichi Sato, Hiroshi Kojima, Yuka Sato, Hiroshi Nagaya, Mayuko Maeda, Tomohiro Masuda, Shoichi Maruyama Seiichi Matsuo, 45rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, San Diego, USA, 2012/11/2

2. Serum Starved Adipose-Derived Stromal Cells Ameliorate Rat Crescentic Glomerulonephritis by Promoting the Generation of M2 Immunoregulatory Macrophages. Kazuhiro Furuhashi, Naotake Tsuboi, Hangsoo Kim, Takayuki Katsuno, Waichi Sato, Enyu Imai, PhD, Seiichi Matsuo Shoichi Maruyama, 45rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, San Diego, USA, 2012/11/2

3. Low Serum Cultured Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Rat Model with Zymosan Induced Severe Peritonitis. Hangsoo Kim, Masashi Mizuno, Kazuhiro Furuhashi, Takayuki Katsuno, Takenori Ozaki, Kaoru Yasuda, Waichi Sato, Naotake Tsuboi, Yasuhiko Ito, Enyu Imai, Shoichi Maruyama Seiichi Matsuo, 45rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, San Diego, USA, 2012/11/3

4. POTENTIAL OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS FROM HUMAN/RAT/MOUSE AS A NEW TOOL FOR THE TREATMENT OF SYSTEMIC SCLEROSIS. Maruyama Shoichi, Shimizu, Asuka, Furuhashi, Kazuhiro, Ozaki Takenori, Kim, Hang Su, Abe, Tomoko, Katsuno, Takayuki, Tsuboi, Naotake, Matsuo seiichi, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, 横浜, 2012/6/13

5. Mac-1 Deficiency Protects Mouse from Pulmonary Hemorrhage, Whereas Exacerbates Glomerulonephritis in Experimental Model of Systemic Lupus Erythematosus. Shi Yiqin, Naotake Tsuboi, Kazuhiro Furuhashi, Asuka Shimizu, Hansu Kimu, Tanya Mayadas, Shoichi Maruyama Seiichi Matsuo, The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012(AP-VAS), 東京コンファレンスセンター, 2012/3/29

6. Low Serum Cultured Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Crescentic Glomerulonephritis by Functional Polarization of Macrophages into Immunoregulatory M2 Phenotype. Kazuhiro Furuhashi, Naotake Tsuboi, Asuka Shimizu, Hangsoo Kim, Takayuki Katsuno, Yousuke Saka, Takenori Ozaki, Waichi Sato, Enyu Imai, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama, The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012(AP-VAS), 東京, 2013/3/29

7. Low Serum Cultured Adipose Derived Stem Cells Ameliorate Zymosan Induced Severe Rat Peritonitis Model, Hangsoo Kim, Masashi Mizuno, Kazuhiro Furuhashi, Takayuki Katsuno, Kaoru Yasuda, Takenori Ozaki, Waichi Sato, Naotake Tsuboi, Yasuhiko Ito, Enyu Imai, Shoichi Maruyama Seiichi Matsuo, 44rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, 2011/11/11

8. Association of Adipokines with Cardiovascular Mortality in Patients on Hemodialysis. Shoichi Maruyama, Kaoru Yasuda, Hirotake Kasuga, Yoshinari Yasuda, Tomoki Kosugi, Waichi Sato, Naotake Tsuboi, Yasuhiko Ito, Enyu Imai, Seiichi Matsuo, 44rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, 2011/11/10

9. Low Serum Cultured Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells, but Not Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells, Ameliorate Rat Crescentic Glomerulonephritis by Functional Polarization of Macrophages into Immunoregulatory Phenotype. Kazuhiro Furuhashi, Naotake Tsuboi, PhD, Hangsoo Kim, Takayuki Katsuno, Takenori Ozaki, Waichi Sato, Enyu Imai, Seiichi Matsuo, S hoichi Maruyama, 44rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, 2011/11/10

10. ナノチューブを介したオルガネラ交換 - 幹細胞治療の新たなメカニズム. 安田香、丸山 彰一、佐藤和一、坪井直毅、伊藤恭彦、今井圓裕、松尾清一, 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2012/06/01

11. 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた難治性腎疾患への新たな治療戦略. 古橋 和弘、清水 明日香、阿部 智子、金 恒秀、勝野 敬之、尾崎 武徳、佐藤 和一、坪井 直毅、今井 圓裕、丸山 彰一、松尾 清一, 第 54 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2011/06/17

12. 脂肪細胞由来幹細胞は腎臓をどう守るのか. 丸山 彰一、古橋 和弘、勝野 敬之、

尾崎 武徳、坪井 直毅、松尾 清一，第54回日本腎臓学会学術総会，横浜，2011/06/15
13. 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた壊死性半月体形成腎炎への新たな治療法の確立～骨髄由来間葉系細胞にはなく塩脂肪由来幹細胞がもつ Macrophage への unique character～. 古橋和拓 清水明日香 阿部智子 金恒秀 勝野敬之 尾崎武徳 佐藤和一 坪井直毅 丸山彰一 松尾清一. 第三回 腎疾患と高血圧研究会，大阪，2011/06/27

14. 脂肪由来間葉系幹細胞 (ASC) を用いた難治性腎疾患・自己免疫疾患に対する新たな治療戦略. 古橋和拓 清水明日香 阿部智子 金恒秀 勝野敬之 尾崎武徳，坪井直毅 丸山彰一 松尾清一，再生医療学会，東京，2011/3/1

〔産業財産権〕

○取得状況 (計2件)

名称：脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤

発明者：尾崎武徳、安田香、丸山彰一、山本徳則、後藤百万、松尾清一、北川泰雄

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：2008-528826

取得年月日：平成18年8月23日

国内外の別：国内

名称：糖尿病性腎症鑑別用マーカー及びその用途

発明者：丸山彰一、湯澤由紀夫、松尾清一、佐藤和一、尾崎武徳、秋山真一、曾我朋義、平山明由

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：2012-128588

取得年月日：平成24年9月14日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 清一 (MATSUO SEIICHI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70190410

(2) 研究分担者

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

秋山 真一 (AKIYAMA SHINICHI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：20500010

尾崎 武徳 (OZAKI TAKENORI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：10452195

(3) 連携研究者なし