

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：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461260

研究課題名(和文) 移植脂肪幹細胞の傷害腹膜における再生誘導機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of transplanted adipose tissue stem cells isolated from omentum promoting tissue repair in injured peritoneum

研究代表者

濱田 千江子 (HAMADA, Chieko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50291662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：著明な線維化と炎症細胞浸潤を呈する障害腹膜に、中皮細胞を移植しても炎症状態下ではむしろ線維化が惹起されるが、脂肪幹細胞を移植することで線維化が抑制されることを確認した。腹膜組織の固有細胞である中皮細胞を抗酸化処理することで障害刺激(腹膜透析液)による形質転換誘導を低減し、炎症サイトカインならびに線維化誘導因子の合成・分泌を抑制できることを明らかとした。また、脂肪幹細胞と中皮細胞を共培養ならびに脂肪幹細胞の刺激培養上清で中皮細胞を培養しても同様に中皮細胞の形質転換誘導が抑制されることが分かり、移植脂肪幹細胞の再生誘導機序の1つとして組織固有中皮細胞の機能・形態変化を正常化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transplanted mesothelial cells into peritoneal cavity aggravated peritoneal injury while progressing peritoneal fibrosis and infiltrating inflammatory cells. However, adipose tissue stem cells (ADSCs) suppressed fibrosis and promote peritoneal repair. Mesothelial cells (MCs) pre-treated with anti-oxidative agent showed resistant to stimulation (peritoneal dialysate) derive epithelial-mesothelial transition (EMT) and production of inflammatory cytokines and growth factors. Furthermore, EMT and production of inflammatory cytokines and growth factors were suppressed in co-culture of ADSCs and MCs under stimulation, and supernatant derived from stimulated ADSCs also inhibited EMT in mesothelial cells against peritoneal dialysate. These results suggested that endocrine effect of ADSCs to mesothelial cells, component cells in peritoneum one of mechanism to promote tissue repair in injured peritoneum.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腹膜透析 組織再生 細胞移植 細胞形質転換 組織線維化 抗酸化物質

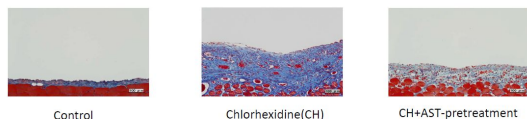
【研究課題番号 26461260】移植脂肪幹細胞の傷害腹膜における再生誘導機序の解明

1. 研究開始当初の背景

(1) 透析は、末期腎不全治療の1つであるが、高濃度のブドウ糖を含有する透析液を使用することで、腹膜組織では線維性の肥厚と変性さらに小血管の閉塞が生じる。この組織変化は、腹膜の物質交換機能の低下や腹膜硬化による腸閉塞を生じ、腹膜透析の永続的な継続の障害となっている。

(2) 我々はこれまでに腹膜線維化動物モデルを用いて、骨髄幹細胞や腹膜中皮細胞、さらに脂肪幹細胞を腹腔内に注入し傷害腹膜の修復への効果とその機序を調べ、細胞種によって修復期の作用が異なることを確認した。さらに移植細胞としては中皮細胞ではなく、脂肪幹細胞が組織修復に有用であることを確認した。腹腔内脂肪組織である大網は、腹膜透析導入時に容易に大量採取可能な自己組織であるため、よりレシipientによって負担の少ない体網組織から抽出した脂肪幹細胞は傷害腹膜再生の細胞株として期待される。しかし、移植脂肪幹細胞の修復腹膜組織における経時的な存在を確認したところ、移植3日以内の早期に移植細胞は消退していた。大網細胞由来脂肪幹細胞の組織修復における挙動を検証することにより、固有組織内の脂肪組織に存在する脂肪(間葉系)幹細胞の組織修復への誘導治療への発展が期待される。

(2) 抗酸化物質であるアスタキサンチン(AST)を含んだ餌であらかじめ飼育したラットの腹腔にクロールクロールヘキシジン(CCH)を注入して腹膜障害を誘導した場合、通常の餌で飼育したラットに比べ障害腹膜の治癒が早いことをすでに我々は確認し、腹膜組織の修復において中皮細胞が重要な役割を果たすことを確認した。



2. 研究の目的

進行する腹膜組織の障害を低減し、さらに障害腹膜の再生を誘導・促進する治療は、長期間腹膜透析を安全かつ有効に継続するうえで必須条件である。我々は、この戦略として細胞移植を使った治療法の開発の研究をおこなっている。これまでの研究から、脂肪幹細胞は組織の障害を抑制し、組織再生を誘導する作用を示すが、移植された幹細胞自体は組織内での生存期間は短く、その効果は短期間に過ぎず、長期間にわたって脂肪幹細胞の効果が得られる条件に関する検討が必要である。一方、中皮細胞は、移植組織が炎症状態では、線維芽細胞へ形質転換し組織の炎症を増悪させ、さらに組織修復を遅延させる結果であった。移植中皮細胞は、脂肪幹細胞と異なり組織には長期間とどまっていることが確認できている。したがって、形質転換が

抑制された中皮細胞を移植することで、腹膜組織障害の進展抑制ならびに傷害腹膜の治癒誘導が期待できると考えられた。これらの推論から、

脂肪幹細胞は、抽出した組織によって増殖能・分泌能・再生分化能が異なる。

同じ間葉系細胞である中皮細胞も炎症下での形質転換を抑制することで、脂肪幹細胞移植と同様の結果を得られる可能性がある

腹腔内脂肪幹細胞は、傷害組織再生において、中皮細胞の形質転換抑制や炎症性サイトカイン・線維化関連因子分泌の調整を介している。

上記3点の研究を行った。

3. 研究の方法

I. 麻酔したラットの皮下脂肪および腹腔内の大網から脂肪幹細胞を抽出し、3-4 継代培養し、それぞれの脂肪幹細胞の形態ならびに細胞表面の表現型を抗体を用いて同等性を確認した。さらにそれぞれの脂肪幹細胞を腹膜透析液(PDS)で刺激し、炎症性サイトカイン・成長因子の合成・分泌能の同等性を検討した。

II. アスタキサンチンを用いてあらかじめ腹膜中皮細胞を抗酸化処理し、その後PDS刺激し、非処理中皮細胞群との形態学的変化ならびに炎症性サイトカイン・成長因子分泌に関する検討を行った。

III. 抗酸化処理の形質転換抑制と、線維化関連成長因子の合成・分泌抑制効果を確認するため、中皮細胞のPDS刺激とともにアスコルビン酸(AG)を添加し、AG添加中皮細胞群と非処理群と比較検討した。

IV. 脂肪幹細胞の腹膜組織障害低減ならびに傷害組織の再生促進効果が腹膜中皮細胞とのcross-talkによる中皮細胞の形質転換ならびに炎症性サイトカイン・成長因子分泌調整に関する検討を行った。

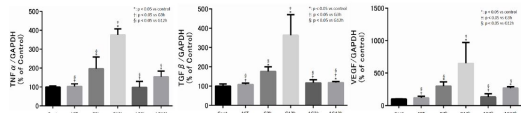
4. 研究成果

(1) 皮下脂肪および腹腔内の大網から抽出した脂肪幹細胞を継代培養(3-4継代)したところ、いずれの細胞群も増殖速度に相違はなく、形態学的変化(顕微鏡的形態評価および細胞表面の形質マーカーの結果は、同一であった。脂肪幹細胞をPDSで刺激し、炎症性サイトカイン・成長因子の合成・分泌能(TNF-、TGF-)を比較検討したが、いずれの細胞群も同程度の分泌能であり、刺激時間依存的に分泌能が高まる結果であり、以上のことから抽出部位による脂肪幹細胞の相違は認めなかった。

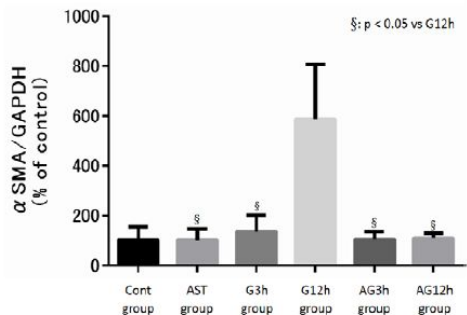
(2) 腹膜障害誘導因子として、動物実験で使用したクロールヘキシジンから臨床で使用している高糖濃度含有腹膜透析液(PDS)に変更して、細胞への障害を検討したが、PDSの刺激によって、中皮細胞は炎症性サイトカインや線維化関連成長因子を分泌するととも

に線維芽細胞への形質転換を生じることが確認された。

(3) 抗酸化処理した腹膜中皮細胞の腹膜透析液刺激による形態学的変化ならびに炎症性サイトカイン・成長因子分泌に関する検討
 抗酸化物質(アスタキサンチン)であらかじめ処理された腹膜中皮細胞は、腹膜透析液の刺激で誘導される炎症性サイトカインや成長因子の合成・分泌が抑制されていた。同様に、抗酸化物質であるアスコルビン酸処理し



て PDS で刺激したが、アスコルビン酸でも同様に炎症性サイトカインや線維化関連成長因子の合成・分泌が抑制されることが確認した。抗酸化物質による炎症性サイトカインや線維化関連成長因子の分泌抑制効果は PDS の 3 時間刺激・12 時間刺激のいずれでも認められた。外的刺激(PDS)によってミトコンドリアが障害され、これによって産生されるラジカルが、中皮細胞自体の障害にとどまらず組織の炎症・線維化を惹起する要因の1つで



あることが示唆された。

(4) PDS の刺激によって中皮細胞の形質転換が誘導される機序においても、ミトコンドリア障害とラジカル産生が関与することが、アスタキサンチン(AST)ならびにアスコルビン酸(AG)を使ったラジカル捕捉ならびに産生抑制で確認され、高濃度グルコース刺激によりミトコンドリアから産生される ROS は、腹膜障害および EMT において重要な役割を果たすことが示唆された。

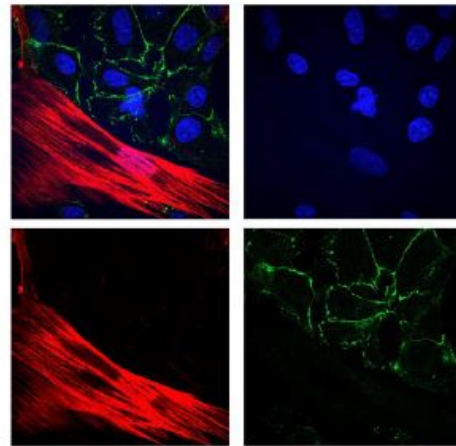
以上の結果から、腹膜透析における腹膜組織の障害ならびに線維化や炎症による障害腹膜において中皮細胞のミトコンドリア障害と障害より惹起されるラジカル発生は、外的刺激の種類を問わず共通した障害経路であるとともに中心的な役割を果たす可能性が示唆された。

(5) 脂肪幹細胞および腹膜中皮細胞の相互作用による形態学的変化ならびに炎症性サイトカイン・成長因子分泌に関する検討

移植した脂肪幹細胞が組織再生の早い段階で消退する可能性として、幹細胞と他の間葉系細胞との融合の可能性を考え、脂肪幹細胞と中皮細胞を共培養行ったが、細胞の

通常培養条件ならびに透析液刺激下のいずれにおいても細胞融合の所見は認められなかった。

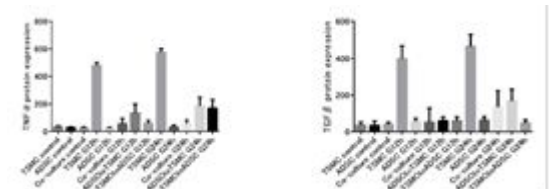
脂肪幹細胞と中皮細胞を共培養すると線維



Co-culture

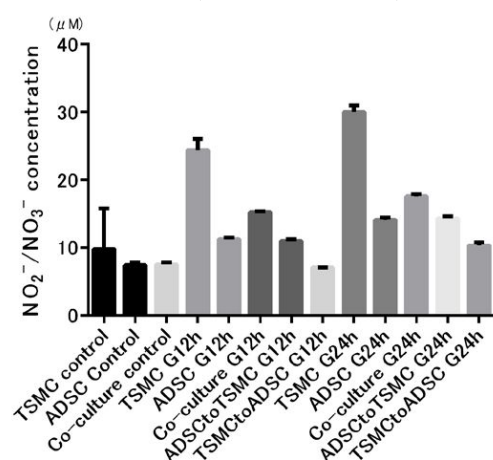
化関連成長因子の合成・分泌が明らかに抑制された。また、PDS で刺激した中皮細胞上清で脂肪幹細胞を培養したが、線維化関連成長因子の合成・分泌の増加はなく、脂肪幹細胞を PDS で刺激した培養上清で中皮細胞を培養した群では、共培養同様中皮細胞での成長因子の合成・分泌は抑制されていた。また、中皮細胞の PDS による線維芽細胞様細胞への形質転換も抑制されていた。

共培養ならびに脂肪幹細胞、中皮細胞内の



ラジカルを測定したところ、中皮細胞が PDS 刺激によって惹起されるラジカルが脂肪幹細胞の関与によって抑制されることが示された。

以上の結果から、脂肪幹細胞は、ミトコン



ドリア障害を抑制あるいはミトコンドリアから発生したラジカルを捕捉する物質を分泌することで、組織の線維化をはじめとす

る障害を抑制し、障害組織の再生を促す可能性が示唆され、今後この物質の同定を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Kazuaki Hara, Chieko Hamada, Yasuhiko Tomino. SUPPRESSIVE EFFECT OF ASTAXANTIN ON EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION IN MESOTHELIAL CELLS ISOLATED FROM TEMPERATURE SENSITIVE SV40 LARGE T ANTIGEN GENE TRANSGENIC RATS. 2015 年 5 月 28 日-30 日第 52 回欧州腎臓学会・欧州透析移植学会@ロンドン(米国)
2. Kazuaki Hara, Chieko Hamada. IMPACT OF OXIDATIVE STRESS ON EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN MESOTHELIAL CELLS ISOLATED FROM TEMPERATURE-SENSITIVE SV40 LARGE T-ANTIGEN GENE TRANSGENIC RATS. 2016 年 2 月 27 日~3 月 1 日、第 16 回国際腹膜透析学会@メルボルン(オーストラリア)
3. Kazuaki Hara, Chieko Hamada, Keiichi Wakabayashi, Reo Kanda, Hiroaki Ito and Satoshi Horikoshi. IMPACT OF OXIDATIVE STRESS ON EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN MESOTHELIAL CELLS ISOLATED FROM TEMPERATURE-SENSITIVE SV40 LARGE T-ANTIGEN GENE TRANSGENIC RATS. 2016 年 5 月 21 日 24 日第 53 回欧州腎臓学会・欧州透析移植学会@ウィーン(オーストリア)
4. Chieko Hamada. Crosstalk between adipose tissue stem cells and mesothelial cells in epithelial-mesechymal transition (EMT). The 8th APCM-ISP2017 March 22-25 in Guangzhou, China
5. 原 一彰、濱田 千江子. 腹膜中皮細胞

に対するアスタキサンチンの抗炎症効果の検討. 第 60 回日本透析医学会がく学術総会. 2015 年 6 月 26 日 28 日. パシフィコ横浜(日本)

6. 原 一彰、濱田 千江子、若林 啓一、神田 怜生、井尾 浩章、金子 佳代、堀越 哲. 腹膜中皮細胞における抗酸化物質アスタキサンチンの上皮間葉転換抑制に関する検討. 2016. 6 月 17 日-19 日. 第 59 回日本腎臓学会学術総会, 横浜
7. 原 一彰、濱田 千江子、若林 啓一、神田 怜生、井尾 浩章、金子 佳代、堀越 哲、鈴木 祐介. 腹膜中皮細胞における抗酸化物質アスタキサンチンの上皮間葉転換抑制に関する検討. 2016 年 12 月 10 日. 第 7 回腎不全研究会
8. 濱田 千江子、原 一彰. アスタキサンチンは高濃度グルコース環境下における腹膜中皮細胞の上皮間葉転換を抑制する. 2017 年 2 月 18 日 第 1 回 Uremic Toxin 研究会、東京

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 千江子 (Hamada Chieko)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 26461260

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

原 一彰 (Hara Kazuaki)