

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16329

研究課題名(和文) 虚血性疾患治療に向けた、皮下脂肪組織を活用する新たな血管再生技術の開発

研究課題名(英文) Characterization of adipose tissue derived stromal vascular fraction cells with high angiogenic potential

研究代表者

高田 仁実 (TAKADA, Hitomi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80641068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞は、骨髄や脂肪から比較的容易に採取できることから急速に臨床応用が進んでいる。しかしながら本細胞はヘテロな混合細胞集団であり、その性状解析が非常に遅れていることが再生医療技術の進展を阻む問題となっていた。そこで本研究は、脂肪組織由来間質細胞の1細胞遺伝子発現解析を行い、ヘテロ細胞集団に存在する間葉系幹細胞の種類および性状を解析した。その結果、間葉系幹細胞は2つのクラスターに分かれ、一方の細胞は成長因子の発現で特徴付けられるのに対し、もう一方は細胞外分泌因子の発現が顕著であることが示された。以上の結果から、脂肪組織には2種類の性質が異なる間葉系幹細胞が存在することが示された。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) are promising cell source for regenerative medicine. However, the global picture of cell-type composition in MSCs has not been clarified. In this study, we used a newly developed high-throughput single-cell RNA-seq method, Quartz-Seq2, to analyze gene expression of freshly prepared stromal vascular fraction obtained from mouse adipose tissue. Dimensionality reduction and clustering of single-cell transcriptome data showed the separation of 11 clusters. Among them, we identified two types of CD34 positive MSCs, Efemp1+ MSCs and Col15a1+ MSCs. To investigate the difference between the two MSC clusters, we analyzed differentially expressed genes. Efemp1+ MSCs were characterized by the expression of growth factors, while Col15a1+ MSCs were characterized by the expression of genes that encodes extracellular matrix proteins. These data showed that the MSC population is divided into two clusters, suggesting that there is less heterogeneity of MSCs than expected.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 再生医療 1細胞解析

## 1. 研究開始当初の背景

高血圧、糖尿病、高脂血症などの生活習慣病の増加に伴い、足の血管に動脈硬化がおこる閉塞性動脈硬化症を発症している患者は日本において40万人を超えると推定される。本疾患に対し、従来血管形成術やバイパス手術による治療が行われてきたが、重症化した患者に対する効果は限定的であり、依然として年間約1-2万人の患者は下肢切断を余儀なくされている。近年本疾患に対する新たな治療法として、患者の自己末梢血中の血管内皮前駆細胞を移植する血管再生療法が考案された。

しかしながら、重症下肢虚血の患者は末梢血に存在する血管内皮前駆細胞の量が大幅に低下しており、その血管形成能も低下していることから、移植に十分な細胞数の確保が困難であることが明らかになってきた。また、iPS細胞から血管内皮細胞を分化させる技術も開発されつつあるが、iPS細胞の分化コントロールは不完全であり造腫瘍性の問題も解決されておらず、実用化までには長い時間を要すると考えられる。以上のような背景から、細胞の数、質、および安全性の問題を解決した新たな移植用細胞の培養技術の開発が課題となっていた

## 2. 研究の目的

脂肪組織は血管新生が盛んにおこる組織であり、血管形成に必要な部品となる細胞や、血管新生の促進に働く細胞が豊富に含まれることが予想される。脂肪組織からそれら細胞を選択的に培養増殖させることができれば、血管内皮前駆細胞の数と質の問題を回避することができるとともに、iPS細胞から高いコストをかけて血管内皮細胞を作り出す必要もない。そこで本申請研究では、皮下脂肪組織から血管形成能の高い細胞を培養する技術を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) マウス皮下脂肪組織をコラゲナーゼ処理した後、遠心して間質血管細胞 (Stromal Vascular Fraction, 以下 SVF) を回収した(図1)。

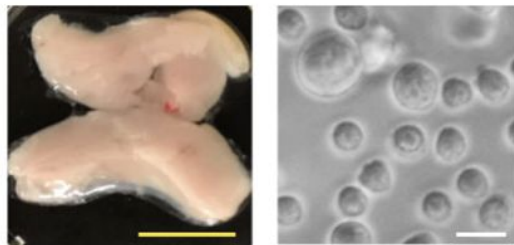


図1: マウス皮下脂肪組織およびSVF  
スケールバー: 1cm(左図), 10μm(右図)

次に、得られた SVF を接着培養、浮遊培養、接着培養から浮遊培養、の3種類の条件で培養し、各方法においてどのような細胞が選択的に培養されているかを抗体染色および定量 PCR で解析した。

(2) 上記(1)に記載した3種類の条件で培養した細胞の血管誘導能を解析するため、下肢虚血モデルマウスを用いた細胞移植実験を行った。免疫不全マウスの大腿動脈を結紮後に切断して虚血状態を誘導した後、切断領域の周辺に細胞を移植し、1ヶ月後の下肢生存率および、細胞移植部位周辺における血管数を測定した。

(3) 培養前の SVF および、上記(1)に記載した3種類の条件で培養した細胞の性状をより詳しく解析するため、1細胞遺伝子発現解析を行った。各細胞を酵素処理によって乖離し、FACSを用いて384プレートにシングルセルを回収した後、1細胞ごとの遺伝子発現を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 3種類の条件で培養した SVF を用いて、定量 PCR を行なった結果、浮遊条件で培養した細胞では、接着条件で培養した細胞と比較して周皮細胞のマーカ遺伝子の発現および血管新生に関わる因子である VEGF の発現が上昇することが明らかになった。また、細胞の抗体染色を行なった結果、周皮細胞のマーカは浮遊条件で培養した細胞に特異的に発現することが示された。これら解析結果から、浮遊条件で培養した細胞は接着条件で培養した細胞と比較して、高い血管誘導能を持つことが示唆された。次に、3種類の条件で培養した細胞の治療効果を *in vivo* で解析するため、下肢虚血モデルマウスに対する移植実験を行った。その結果、浮遊条件下で培養した細胞が最も下肢の壊死抑制効果が高い可能性が示唆された。以上の結果は、細胞の培養条件の違いにより細胞の性質が変化するとともに、移植時の効果も変化することを示すものである。現在、下肢虚血モデルマウスに対する移植実験の結果の詳細を解析中であり、移植の効果と遺伝子発現との関連を解明することを予定している。

(2) 上記(1)の結果から、培養条件を変えることで細胞の性質が変化することが示された。しかしながら、培養した SVF の細胞はヘテロな細胞集団であり、定量 PCR 解析では細胞ごとの遺伝子発現変化を正確に捉えられていない可能性が示唆される。そこで次に、マウス皮下脂肪組織から回収された培養前後の SVF の1細胞解析を行った。研究を開始した時点では本解析を予定していなかったが、本助成期間中に1細胞解析の技術開発が急速に進展したため、1細胞解析によるヘテロ細胞集団の性状解析を行なうことを計画したものである。まず培養前の SVF から FACS を用いて 384well plate に細胞を回収し、Quartz-seq2を用いて約1000細胞の遺伝子発現を解析した。その結果、脂肪由来の SVF に含まれる細胞は全部で11個のクラスターに

分かれることが明らかになった(図 2)。各クラスター特異的に発現する遺伝子リストから、クラスター 1 とクラスター 8 は CD34 陽性の間葉系幹細胞、クラスター 3、4、9 は T 細胞、クラスター 5 は B 細胞、クラスター 6 はキラー T 細胞、クラスター 7 は NK 細胞、クラスター 2 はマクロファージ、クラスター 10 は樹状細胞、クラスター 11 は形質細胞様樹状細胞であることが示された。

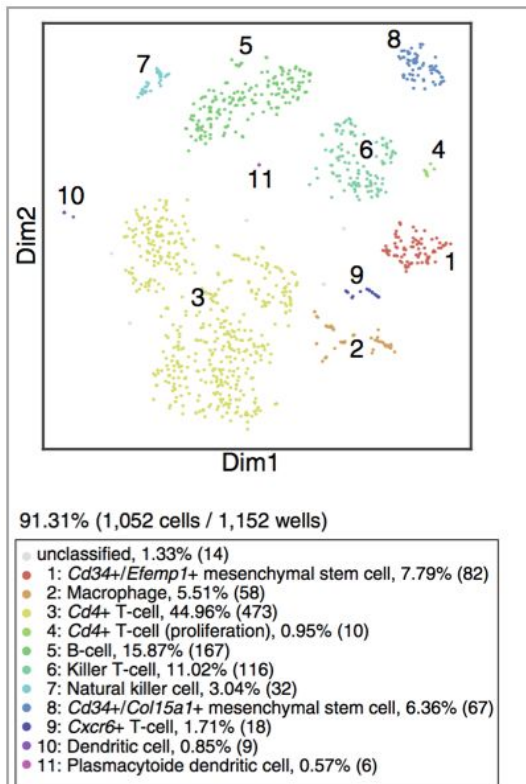


図2: SVFの1細胞遺伝子発現解析結果  
図中のCluster1およびCluster8がCD34陽性の間葉系幹細胞である。

そこで次に、各クラスターにおけるリガンドおよびレセプターの発現状態を解析した。その結果、クラスター 1 と 8 は様々なリガンド

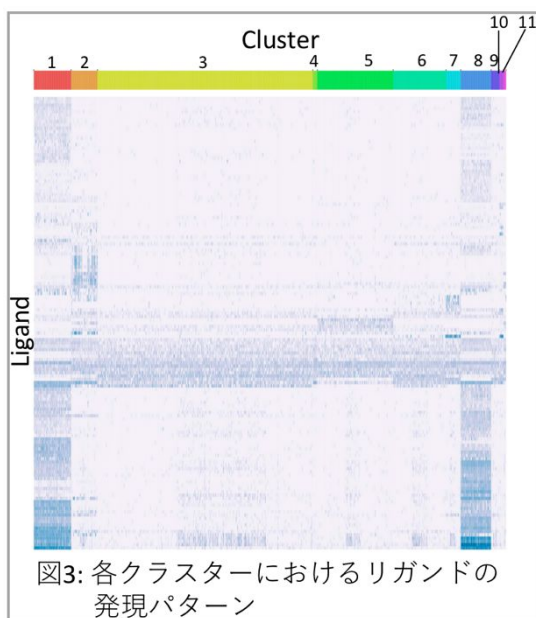


図3: 各クラスターにおけるリガンドの発現パターン

の発現が顕著であるのに対し、その他のクラスターにおいては限られたリガンドのみが発現していることが示された(図 3)。一方レセプターの発現頻度に関しては、各クラスター間で大きな違いは見られなかった。これらの結果から、クラスター 1 と 8 は様々なリガンドを分泌することによって治療効果を示す間葉系幹細胞であることが示された。

次に、同定した 2 種類の間葉系幹細胞の性質の違いを解明するため、2 つのクラスター間で発現変動する遺伝子の解析を行なった。その結果、クラスター 1 の細胞は、FGF2 や BMP2 などの成長因子および IGFBPs の発現によって特徴づけられることが明らかになった。一方、クラスター 8 の細胞はコラーゲンなど細胞外分泌因子の発現が顕著であることが明らかになった。

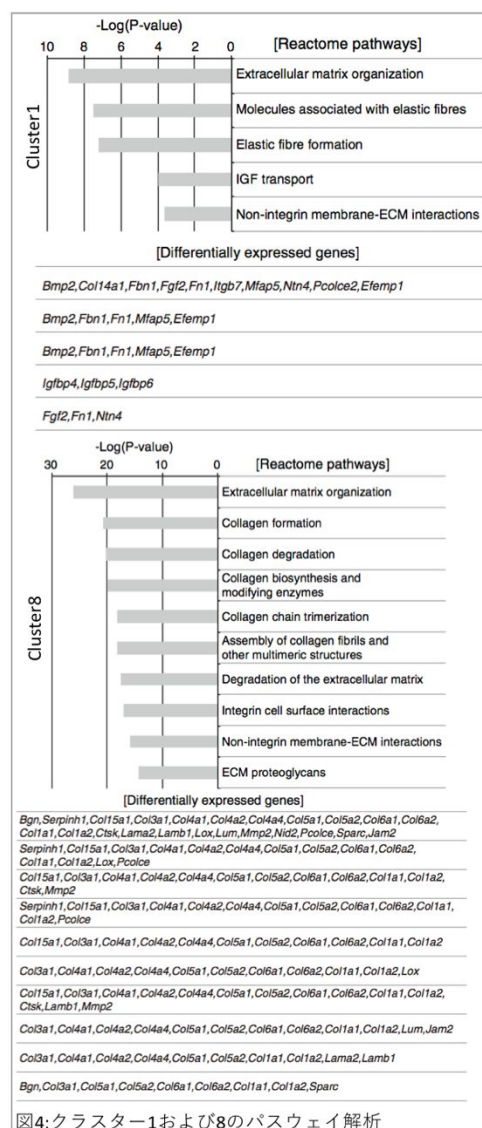


図4: クラスター 1 および 8 のパスウェイ解析

さらに、パスウェイ解析を行った結果、クラスター 1 の細胞はエラスチン繊維パスウェイおよび IGF トランスポートパスウェイが同定された。一方、クラスター 8 の細胞は、コラーゲンパスウェイおよび脂肪代謝パスウェイが同定された。以上の結果より、SVF 中には性質の異なる 2 種類の間葉系幹細胞が

存在することが明らかとなった。現在、培養後の細胞の1細胞遺伝子発現データを解析中であり、近日中に論文投稿する予定である。本研究は、SVFのヘテロ細胞集団の1細胞遺伝子発現解析を行うことにより、これまで長らく議論となっていた間葉系幹細胞の種類およびその性状を解明することに成功した。今後は、現在解析中である培養後の細胞の遺伝子発現データと比較することにより、培養前後の間葉系幹細胞における遺伝子発現変化および機能変化を解明する予定である。さらに、今回得られた1細胞解析データを元に、遺伝子発現状態と細胞の治療効果との相関を解明することで、移植用細胞の選別技術や細胞の標準化技術を開発し、再生医療技術の発展に貢献したい。

#### 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 5件)

Sasagawa Y\*, Danno H\*, Takada H\* (\*Equally contributed), Ebisawa M, Tanaka K, Hayashi T, Kurisaki A, Nikaide I. Quartz-Seq2: a high-throughput single-cell RNA-sequencing method that effectively uses limited sequence reads. *Genome Biol.* 2018 Mar 9;19(1):29. 査読有  
DOI: 10.1186/s13059-018-1407-3.

Mashiko T, Takada H, Wu SH, Kanayama K, Feng J, Tashiro K, Asahi R, Sunaga A, Hoshi K, Kurisaki A, Takato T, Yoshimura K. Therapeutic effects of a recombinant human collagen peptide bioscaffold with human adipose-derived stem cells on impaired wound healing after radiotherapy. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Jan 26. 査読有, DOI: 10.1002/term.2647.

Nishimura K, Ohtaka M, Takada H, Kurisaki A, Tran NVK, Tran YTH, Hisatake K, Sano M, Nakanishi M. Simple and effective generation of transgene-free induced pluripotent stem cells using an auto-erasable Sendai virus vector responding to microRNA-302. *Stem Cell Res.* 2017 Jun 20;23:13-19. 査読有,  
DOI:10.1016/j.scr.2017.06.011.

Nishimura K, Aizawa S, Nugroho FL, Shiomitsu E, Tran YT, Bui PL, Borisova E, Sakuragi Y, Takada H, Kurisaki A,

Hayashi Y, Fukuda A, Nakanishi M, Hisatake K. A Role for KLF4 in Promoting the Metabolic Shift via TCL1 during Induced Pluripotent Stem Cell Generation.

*Stem Cell Reports.* 2017 Mar 14;8(3):787-801. 査読有, DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.01.026.

Enomoto K, Watanabe-Susaki K, Kowno M, Takada H, Intoh A, Yamanaka Y, Hirano H, Sugino H, Asashima M, Kurisaki A. Identification of novel proteins differentially expressed in pluripotent embryonic stem cells and differentiated cells. *J Med Invest.* 2015;62(3-4):130-6 査読有, DOI: 10.2152/jmi.62.130.

[学会発表](計 2件)

Hitomi Takada, Yasu-yuki Kida, Akira Kurisaki. Spheroid culture condition optimally expands angiogenic cells of adipose tissue-derived stromal vascular fraction. ISSCR 2016

Hitomi Takada, Yutakada Saito, Toutai Mituyama, Zong Wei, Eiji Yoshihara, Sandra Jacinto, Michael Downes, Ronald M Evans, Yasu-yuki Kida. Methylome, transcriptome, and PPAR $\gamma$  cistrome analyses reveal two epigenetic transitions in fat cells. ISSCR 2015

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 仁実 (TAKADA, Hitomi)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・助教  
研究者番号: 80641068