

令和元年9月2日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05500

研究課題名(和文) リプログラミングによる皮下脂肪細胞から皮膚線維芽細胞への直接誘導法の開発

研究課題名(英文) Direct induction of dermal fibroblasts via reprogramming of subcutaneous adipocytes

研究代表者

本間 康一郎 (Homma, Koichiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：10383762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：重症熱傷や難治性潰瘍では皮下脂肪組織が保たれていることが多く、ダイレクトリプログラミング法(DR)を用いて直接的に脂肪細胞を失われた皮膚線維芽細胞に分化させることにより、有効な治療となり得ると考えた。DRにはレトロウイルスベクターを使用し、6つの転写因子を脂肪細胞へ感染させた。脂肪細胞への感染効率は40%程度であった。脂肪細胞に発現し、線維芽細胞では発現しない特異的なマーカーが感染後、コントロール群に比して転写因子導入群で減少したことを確認した。また、IncuCyte systemを用いた感染後の細胞の継時的撮影により、細胞内脂肪滴の縮小及び細胞形状の紡錘形への変化を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生命予後が不良な重症熱傷、難治性創傷および難治性潰瘍の治癒促進による生存率の向上に直結する新規治療法に繋がる内容である。また、類似研究がなく、新規性が高い。しかしながら、研究成果としては不十分であるため、今後も本研究を遂行し新規治療法の開発に結びつけたい。

研究成果の概要(英文)：Subcutaneous adipose tissue is often preserved following severe burns, and adjacent to refractory ulcers. Direct reprogramming of adipocytes to differentiate into dermal fibroblasts would be an efficient mechanism to treat such lesions. Adipocytes were transfected with a retroviral vector encoding a group of six transcription factors, with a transfection efficiency of approximately 40%. Following transduction, adipocyte-specific markers normally expressed abundantly in adipocytes but not in fibroblasts were reduced in transfected cells with respect to control cells. In addition, continuous imaging of the transfected cells using the IncuCyte System revealed morphological changes, wherein the cells became spindle shaped, along with a shrinkage of intracellular lipid droplets.

研究分野：再生医療

キーワード：ダイレクトリプログラミング

1. 研究開始当初の背景

ダイレクトリプログラミングは細胞に鍵となる転写因子群を導入することによって目的の細胞へと直接誘導する技術である。

重症熱傷では、早期の創閉鎖がその治癒に重要であり、そのために皮膚移植が選択されることが多いが、広範囲熱傷においては、移植皮膚の採取部位の不足からその目的が達成困難である。

一方で皮膚組織の直下に存在する脂肪細胞は重症熱傷においても保たれていることが多い。

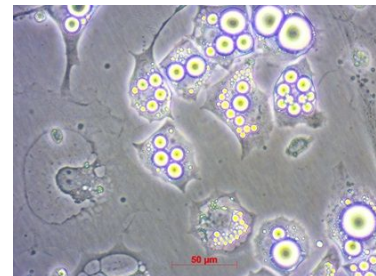
また、難治性皮膚潰瘍は通常なら治癒する傷が感染や血管障害などにより治癒しない状態である。難治性皮膚潰瘍の原因は様々であり、外傷、寝たきりによる褥瘡、糖尿病、閉塞性動脈硬化症、血管炎などが挙げられ、日本国内に約 130 万人の患者がいるとされている。今後、高齢者の増加により患者数は増加することは確実である。難治性皮膚潰瘍を治癒させることは困難であり、組み換え型線維芽細胞成長因子の投与や自家培養表皮の移植がある。これは、患者自身の皮膚組織を採取し、分離した表皮細胞を培養し、シート状に形成して患者の潰瘍に移植するものである。皮膚はこのような再生技術が最も進んでいる臓器である。しかしながら、自家培養表皮の移植は培養期間が1ヶ月かかるため、患者が受傷後1ヶ月以上後経過しないと施行できない(ダイレクトリプログラミングでは概ね1週間で可能)。さらに、大変高価な治療である上に、表皮の下層である真皮が失われているため、生着率が著しく不良であり、有効な治療とは言い難い。これは診療の現場でも多く聞かれる意見である。

2. 研究の目的

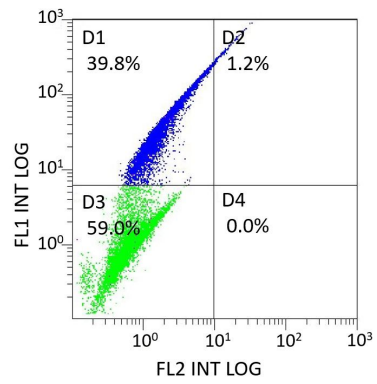
将来的に熱傷や難治性皮膚潰瘍に対する皮膚再生に繋がり得る、マウス脂肪細胞から dermal fibroblast へのダイレクトリプログラミングを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) マウス脂肪細胞の初代培養を行うため、当初は C57 BL6 マウスの後腹膜脂肪組織からの直接培養を試行したが、効率の良い結果が得られず、OP9 細胞から分化誘導メディアウムを用いての培養を行い、70~80%以上の効率で脂肪細胞への分化を得た。(右画像：分化誘導された脂肪細胞)

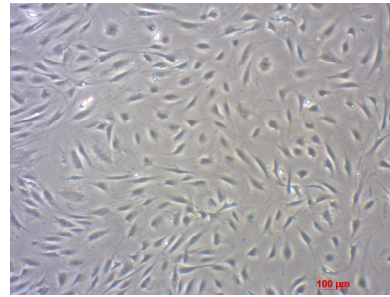


- (2) ダイレクトリプログラミングにはレトロウイルスをベクターとして使い、6つの転写因子群 (No.1-6) と GFP を Platinum E cell へ導入し、ウイルス分泌液を脂肪細胞へ感染させた。
- (3) 脂肪細胞へのウイルスの感染効率は FACS を用いて評価を行い、40%程度の感染効率を認めている。(右図)

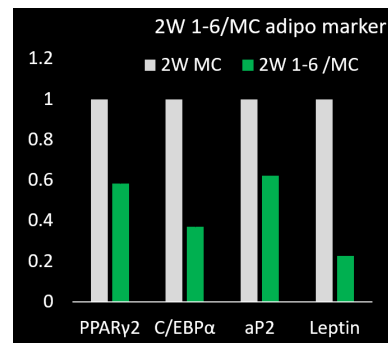


4. 研究成果

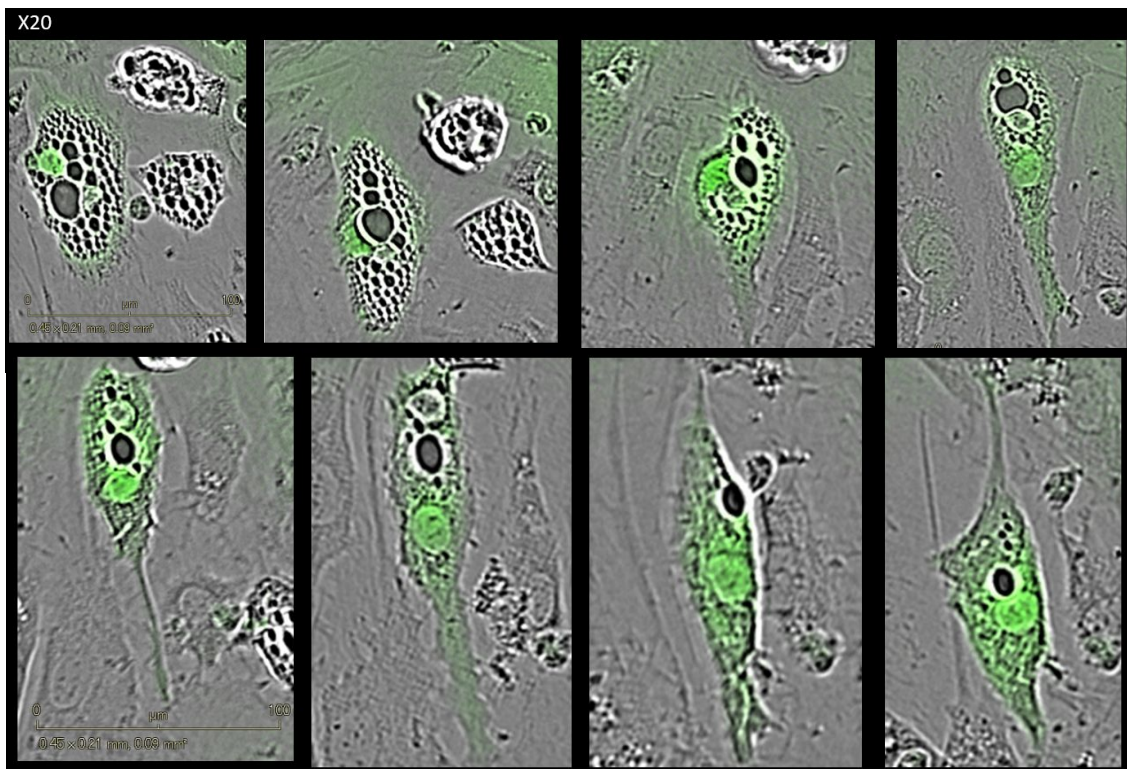
マウス dermal fibroblast の positive control は C57 BL6 マウスの尾部皮膚組織を直接培養した細胞（右画像）とした。



脂肪細胞が dermal fibroblast へ変化したかの判断には、脂肪細胞に多く発現し、OP9 細胞や dermal fibroblast には発現しない脂肪細胞特異的なマーカー（PPAR γ 2, C/EBP α , aP2, Leptin）が感染後 2 週間時点でコントロール群に比して転写因子導入群で減少したことを確認している。（右グラフ）



また、IncuCyte[®] system を用いた感染後の細胞の継時的撮影により、細胞内脂肪滴の縮小及び細胞形状の紡錘形への変化を確認している。（下画像）



今後は、細胞の感染効率の向上のために新規 OP9 細胞の使用、状況によりウイルスベクターの種類の変更を検討し、また dermal fibroblast に比較的特異的に発現するマーカー (Thy1 等) の感染細胞での発現上昇を確認したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：家田 真樹
ローマ字氏名：IEDA, Masaki
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部（信濃町）
職名：客員教授
研究者番号（8桁）: 70296557

研究分担者氏名：村岡 直人
ローマ字氏名：MURAOKA, Naoto
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部（信濃町）
職名：特別研究員（PD）
研究者番号（8桁）: 70528728
2017年度まで研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：豊崎 光信
ローマ字氏名：TOYOSAKI, Mitsunobu

研究協力者氏名：鈴木 さゆり
ローマ字氏名：SUZUKI, Sayuri

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。