

令和元年9月2日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08609

研究課題名(和文) 2型糖尿病由来間葉系幹細胞の単離およびその機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of mesenchymal stem cells derived from type 2 diabetes

研究代表者

大根田 修 (OHNEDA, OSAMU)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：30311872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は病状が進行に伴い3大合併症を併発し、血糖のコントロールと併せて、その合併症に対する治療が必要となる。糖尿病性壊疽を引き起こす創傷遅延は、極めて難治性であるが、遅延を引き起こすメカニズムについては十分に解明されていない。当該研究では、糖尿病由来間葉系幹細胞(dAT-MSC)を単離し、健常者由来間葉系幹細胞(AT-MSC)と比較解析することにより、創傷遅延を引き起こす原因遺伝子の探索を行った。結果、EGR-1(early growth factor-1)の発現が、dAT-MSCにおいて有意に上昇し、加えて炎症性サイトカインであるIL-6の発現が上昇していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究により、糖尿病患者さんに対し自己の幹細胞を用いた治療を行う際に、その幹細胞自体が正常に機能しないことから、何らかの方法を用いて正常に作用するように幹細胞を再機能化することが求められることが明らかとなった。その一つの手段として、健常者由来間葉系幹細胞から放出されるマイクロベシクルが大きな役割を果たすことを明らかにした。患者さんにおいて自家幹細胞移植を行う際に、各疾患に応じた幹細胞治療法に基づいて行う必要があることを示唆している点で社会的意義は大きい。今後、マイクロベシクルを用いた幹細胞加工法が確立し、機能性幹細胞治療法が大きく発展することが期待できる点において学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue has been a main focus for many studies aiming to elucidate the molecular mechanism of type 2 diabetes mellitus and its complications. Adipose tissue-derived MSCs (AT-MSCs) are easily isolated and used for auto transplantation. However, the distinctive characteristics of AT-MSCs from diabetic donors (dAT-MSCs) are still unclear. In this study, I demonstrate that dAT-MSCs have impaired wound healing ability, as shown through tissue analysis of an ischemic flap mouse model. Notably, dAT-MSCs exhibited impaired cell adhesion. I found the transcription factors, early growth response factor-1 (EGR-1) and hypoxic inducible factor-2 (HIF-2), were highly expressed in dAT-MSCs under hypoxic conditions. Of note, the target genes regulated by these transcription factors, including growth factors and adhesion molecules were significantly upregulated in dAT-MSCs as compared with nAT-MSCs. Knockdown of EGR-1 can restore the characteristic of dAT-MSCs and wound healing ability.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 糖尿病 創傷治療 マイクロベシクル 機能性幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1)各幹細胞を用いた細胞治療:胎生幹細胞であるES細胞は,多能性分化能を有しているが,細胞治療に用いる際に他家移植となることから拒絶反応が生じる可能性が極めて高いことが大きな問題点として挙げられる.加えてiPS細胞を用いた細胞移植は,自己の細胞由来iPS細胞を用いる事となり,拒絶反応は抑えられるが,依然として発癌の危険性が残ることが指摘されている.一方,成体幹細胞に分類される間葉系幹細胞(MSC)は,骨髄・臍帯血・胎盤・脂肪組織・歯髄等,生体内の様々な組織に存在し多分化能を有し,移植後発癌性を有しないことから,細胞治療に用いるのに大変優れている.

2)MSCを用いることの優位性:申請者は,臍帯血由来MSCにおいて増殖能・分化能が高い細胞集団を単離・同定することに成功し,その特性を明らかにした(Stem Cells Dev 2010).さらに,自家移植可能な骨髄・脂肪組織・歯髄からMSCを単離し比較解析を行ない,AT-MSCが他組織由来MSCと比較して増殖能が高く,動物移植モデルにおいて早期に骨石灰化を生じ,血流回復を誘導することを明らかにした(Stem Cells Dev 2014).加えて,AT-MSCが増殖能において他組織(特に骨髄)由来MSCと比較してきわめて高いことを見出している(倍加時間:骨髄由来,80.6時間;脂肪由来,48.6時間;歯髄由来,44.1時間)(Stem Cells Dev 2014).以上の結果は,AT-MSCが他組織由来MSCと比較して細胞治療として用いることが有益であることを示している.まとめると,MSCは,1)採取時の侵襲性の低さ,2)MSCの単離が容易であること,3)増殖能が高い,の理由からヒト脂肪由来MSC(AT-MSC)の細胞治療への応用が大きく期待されている.

3)基礎疾患と幹細胞:AT-MSCを提供するドナーが何かの疾患に罹患している場合,その患者さん由来AT-MSCの機能について,未だ十分に解析されておらず,健康人由来MSCと同様の投与方法が行なわれているのが現状である.また,慢性疾患等を抱える患者さん由来のMSCは,健康者のMSCに比べて治療効果が低いことが既に報告されている.本研究では,大きな社会問題となっている生活習慣病(肥満・糖尿病・心疾患)に着目し,特に慢性に経過し細胞移植の適応となる種々の合併症を来す2型糖尿病(T2DM)に焦点を当て解析を進める.

2. 研究の目的

生活習慣病の一つである糖尿病(DM)は,血糖コントロールに加え,三大合併症に対する治療が不可欠である.糖尿病性壊疽を引き起こす創傷治癒遅延は,QOLに大きく影響することから,その分子機構解明が急務である.それらの難治性症状に対し,幹細胞を用いた治療法の導入が検討されている.成体幹細胞の一つである間葉系幹細胞(MSC)は骨髄・臍帯血・胎盤・脂肪組織等,生体内の様々な組織に存在し多分化能を有することから,幹細胞治療のソースとして有望であり,以下の利点を有している;1)採取が比較的容易である(特に脂肪),2)移植後発癌性を有しない,3)細胞増殖能が高く自家移植が可能である.しかし,基礎疾患を有する患者由来MSCは,各基礎疾患の病態に影響されやすく,健康人由来MSCとは異なる特性を有することから,病態に応じた幹細胞治療法の確立が急務である.本研究ではDM患者由来MSCに着目し,1)糖尿病疾患を有する群とDM疾患を有しない群間におけるMSC比較解析を行ない,2)創傷治癒マウスモデルを用いてDM合併症に対する幹細胞治療法を開発する,3)得られた知見を基に他幹細胞移植への応用を図る.

3. 研究の方法

申請者は,先行研究においてヒト脂肪由来MSC(AT-MSC)が,他組織由来MSCと比較して,1)増殖能が高く,2)血管再生能に優れていることを見出した.本研究では,DMを有する患者さん由来AT-MSC(dAT-MSC)を用いて,1)増殖能,2)分化能,3)低酸素応答性,4)動物移植モデル(血管再生,創傷治癒)について解析し,MSC自体における原因遺伝子を明らかにするとともに,DM環境から移植MSCへの影響について,DMモデルマウスを用いた解析を行う.また,原因遺伝子を加工したdAT-MSCを投与することにより創傷治癒が回復することを移植実験により明らかにする.

(平成28年度)DMがMSCに与える影響を明らかにする:

AT-MSCの樹立:外科手術の際に不要となる脂肪組織をインフォームド・コンセントにより了承が得られている患者さんから提供して頂く.以下の手順により,AT-MSCを採取・培養を行う.脂肪組織を細切する,脂肪組織をPBSで洗浄する,コラゲナーゼ処理(37,60分),比重遠心法(1.083)により単核細胞分画を採取する,細胞をPBSで洗浄する,DMEM-H/10%FBS+bFGF培養条件下により細胞を維持する.【比較検討項目】(nAT-MSC v.s. dAT-MSC)

細胞形態,細胞表面マーカー発現(FACS解析),細胞増殖能,細胞分化能,分化細胞(骨・脂肪・軟骨)に特異的な遺伝子発現解析(Real time PCR法)創傷治癒モデルマウスを用いた解析;マウス背部を脱毛し,コの字型に皮膚を切開した後に背部に戻し縫合し,皮弁周囲4ヶ所(右2ヶ所,左2ヶ所)に 1×10^6 個の細胞を皮下注入する.投与後1週間目に皮弁尾側部位における壊死している組織面積を計測する.本in vivo解析により,AT-MSCが持つ創傷治癒効果を比較解析することが可能である.標的遺伝子の発現:Real

time PCR法) : dAT-MSCとnAT-MSC間において、創傷治癒能に影響する因子を遺伝子発現解析により同定し、その役割について解析を行なう。

(平成29年度)細胞加工したdAT-MSCの移植実験:

マウス移植モデルを用いた解析: レシピエントマウスにDMの病態を反映させたDMモデルマウスを用いて移植実験を行う: 創傷治癒モデルを用い、マウス背部にnAT-MSCあるいはdAT-MSCを投与することにより、創傷治癒効果を移植後7日目に背部壊死面積を計測する。また、上記モデルマウスを用いてDM環境をin vivoで再現した後、以下の実験を行なう。平成28年から解析しているnAT-MSCとdAT-MSC間で異なる発現を示す遺伝子群において、dAT-MSCを遺伝子加工することにより、nAT-MSCと同程度の創傷治癒能を獲得できるかについてin vitro及びマウス移植実験により明らかにする。

(平成30年度)移植後幹細胞の性状について解析を行う:

今までの解析から、幹細胞においても基礎疾患による影響を受け、幹細胞治療に影響することが明らかとなった。今後、自家移植を考えた場合、加工した幹細胞が移植後に基礎疾患ならびに投与薬剤によってどのように影響を受けるのかについて解析を行なう。

4. 研究成果

本研究では、糖尿病由来MSCの特性を健常者由来MSCと比較検討することにより、創傷遅延を引き起こす原因遺伝子を探索することを目的に研究を行った。in vitroでの機能解析に加え、創傷治癒モデルマウスを用いたin vivoでの解析を実施した。

申請者は、既にヒト脂肪由来MSC(AT-MSC)が他組織由来MSCと比較して、1)増殖能が高く、2)血管再生能に優れていることを報告している。

当該研究では、dAT-MSCとnAT-MSCにおいて、以下の項目について比較検討を行った: 1)細胞形態、2)細胞増殖能、3)細胞分化能、4)細胞表面マーカー。3)の細胞分化能において、dAT-MSCがnAT-MSCと比較して、脂肪への分化能が亢進していることが明らかとなったが、他項目において有意差は見られなかった。5)の比較項目として、創傷治癒モデルマウスを用いた創傷治癒能の解析を行ったところ、細胞移植後7日目に、dAT-MSCにおいて有意に低下していることが分かった。

創傷治癒モデルマウスを用いたAT-MSCの創傷治癒能力について、健常者および糖尿病患者間での比較検討を行った。dAT-MSCでは、健常者由来と比べて創傷治癒遅延が顕著であることが明らかとなった。遺伝子発現解析により、接着因子であるCyr61の発現が有意に上昇していることが確認された。加えてCyr61の発現を調節しているEGR-1(early growth response factor-1)の発現がdAT-MSCにおいて、有意に上昇していることが明らかとなった。

さらに、dAT-MSCの機能改善を目的とし、細胞から放出されるマイクロベシクル(MVs)をnAT-MSCより回収し、その機能解析を行った。その結果、MVsを取り込ませたdAT-MSCにおいて、細胞遊走能、生存能、血管新生能に係る遺伝子発現が上昇することが明らかとなった。さらに、健常者由来MVsを取り込んだdAT-MSCは、創傷治癒機能回復能が改善することがマウスを用いた実験により明らかとなった。

創傷治癒遅延の原因として考えられるEGR-1遺伝子が、どのような機能を介して創傷治癒遅延を引き起こしているのかについて、その機能解明を行う予定である。加えて、動物移植モデルにより、原因遺伝子の関与を明確にし、糖尿病由来患者の自家移植方法について検討を行う。健常者由来MVsを取り込んだdAT-MSCにおいて、創傷治癒能改善が引き起こされた原因因子について解析を行う。また、MSC由来MVsが、MSC以外の幹細胞に対してどのように影響を及ぼすのかについて解析を行い、細胞治療法の開発に発展させる。

ステロイド治療を有している患者さんにおいて、高頻度に骨粗鬆症が引き起こされるが、その分子メカニズムが十分には解明されていない。ステロイド治療を受けている患者さんからAT-MSCを単離し、骨分化能抑制メカニズムについて解析を行った。結果、骨分化能抑制因子として、DKK-1(Dickkopf-1)の発現がステロイド治療を有している患者さん由来MSCで上昇していることを明らかにした。加えて、ステロイド治療を有している患者さんにおいて、創傷治癒能が低下していることに着目し解析を行った。ステロイド治療を受けている患者さん由来MSCにおいて、血管内皮前駆細胞を創傷部位に遊走するケモカイン因子であるSDF-1(stromal cell derived factor-1)の発現が低下しているのが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1) Kato T, Khanh VC, Sato K, Kimura K, Yamashita T, Sugaya H, Yoshioka T, Mishima H, Ohneda O. Elevated Expression of Dkk-1 by Glucocorticoid Treatment Impairs Bone

Regenerative Capacity of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*,27,2,85-99, 2017.

2) Kato T, Khanh VC, Sato K, Takeuchi K, Carolina E, Yamashita T, Sugaya H, Yoshioka T, Mishima H, **Ohneda O**. SDF-1 improves wound healing ability of glucocorticoid-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 493,2, 1010-1117, 2017. Corrigendum to “SDF-1 improves wound healing ability of glucocorticoid-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cells” [*Biochem Biophys Res Commun.*, 493/2 (2017), 1010-1117] DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.179

3) Khanh VC, Ohneda K, Kato T, Yamashita T, Sato F, Tachi K, **Ohneda O**. Uremic Toxins Affect the Imbalance of Redox State and Overexpression of Prolyl Hydroxylase 2 in Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Involved in Wound Healing. *Stem Cells Dev.*, 26,13,948-963, 2017.

4) Trinh NT, Yamashita T, Tu TC, Kato T, Ohneda K, Sato F, **Ohneda O**. Microvesicles enhance the mobility of human diabetic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro and improve wound healing in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.*, 473,4, 1111-1118, 2016.

5) Trinh NT, Yamashita T, Ohneda K, Kimura K, Salazar G, Sato F, **Ohneda O**. Increased expression of EGR-1 in diabetic human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reduces their wound healing capacity. *Stem Cells Dev.*,25,10,760-73, 2016.

〔学会発表〕(計 20件)

1) Antonius Y, Khanh VC, and **Ohneda O**. Hypoxia ameliorates the wound healing ability of extracellular vesicles (EVs) derived from adipose tissue-mesenchymal stem cells (AT-MSCs). Tsukuba Global Science Week. Tsukuba, Japan. September 2018. Oral presentation.

2) Carolina E and **Ohneda O**. Glucocorticoid-impaired Wound Healing ability of Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells by Distinct Defect of SDF-1/CXCR4 cascade. The 10th International Heinrich F. C Behr Symposium on stem cells and cancer, 16th-19th September 2018, Heidelberg DKFZ. Poster presentation.

3) Khanh VC, Kato T, Yamashita T, Sato F, **Ohneda O**. Uremic Toxins Affects the Overexpression of Prolyl Hydroxylase 2 in Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Involved in Wound Healing. Public Health and Stem cell therapy Symposium in Vietnam. 2018.

4) Antonius Y, Khanh VC, and **Ohneda O**. Hypoxia ameliorates the function of extracellular vesicles (EVs) derived from adipose tissue-mesenchymal stem cells (AT-MSCs) in delayed wound healing. Biomarker and Biogenesis of Extracellular Vesicles (BBEV) Workshop, Padua, Italy. 29-31 August 2018. Poster presentation.

5) Kumagai H, Yoshioka T, Sugaya H, Kato T, Tomaru Y, Shimizu Y, **Ohneda O**, Yamazaki M, Mishima H. Evaluation of Mesenchymal Stem Cells Contained in Concentrated Autologous Bone Marrow Aspirate Transplants For The Treatment Of Osteonecrosis Of The Femoral Head: Predictive Factors And Differences By Etiology. 19th EFFORT Congress, 30 May – 01 June 2018.

- 6) 菅谷 久、加藤 俊貴、吉岡 友和、熊谷 洋、山下 年晴、**大根田 修**、山崎 正志、三島 初「ステロイド治療は wnt/ β catenin シグナルを介して脂肪組織由来間葉系幹細胞の骨分化能を低下させる」 第 17 回日本再生医療学会総会 2018 年 3 月 横浜
- 7) 熊谷 洋、加藤 俊貴、菅谷 久、吉岡 友和、佐藤 和聡、山下 年晴、**大根田 修**、山崎 正志、三島 初「脂肪組織由来間葉系幹細胞の骨再生能にステロイド治療が与える影響」 第 17 回日本再生医療学会総会 2018 年 3 月 横浜
- 8) 菅谷 久、加藤 俊貴、吉岡 友和、熊谷 洋、山下 年晴、**大根田 修**、山崎 正志、三島 初「ステロイド治療は wnt/ β catenin シグナルを介して脂肪組織由来間葉系幹細胞の骨分化能を低下させる」 第 32 回日本整形外科学基礎学術集会 2017 年 10 月 沖縄
- 9) 熊谷 洋、加藤 俊貴、菅谷 久、吉岡 友和、佐藤 和聡、山下 年晴、**大根田 修**、山崎 正志、三島 初「脂肪組織由来間葉系幹細胞の骨再生能にステロイド治療が与える影響」 第 32 回日本整形外科学基礎学術集会 2017 年 10 月 沖縄
- 10) Kato T, Khanh VC, Sato K, Kimura K, Yamashita T, Sugaya H, Yoshioka T, Mishima H, and **Ohneda O**. Chronic glucocorticoid treatment the bone regeneration capacity of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by upregulating Dkk-1. The 16th Joint Mini-Symposium 2017 of National Taiwan University, Kyoto University, and University of Tsukuba: September 24, 2017.
- 11) Sugaya H, Yoshioka T, Kato T, Wada T, Akahagi H, **Ohneda O**, Ochiai N, Yamazaki M, Mishima H. Analysis of proliferation ability of mesenchymal stem cells from steroidal osteonecrosis of the femoral head. The 90th Annual meeting of the Japanese Orthopedic Association, Sendai, May 2017.
- 12) Kato T, Sato K, Kimura K, Yamashita T, Yoshioka T, Mishima H, **Ohneda O**. Chronic glucocorticoid therapy impairs the bone regeneration potential of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. The 16th congress of Japanese Society for Regenerative Medicine, Sendai, March 2017.
- 13) Sugaya H, Yoshioka T, Kato T, Wada T, Akahagi H, **Ohneda O**, Ochiai N, Yamazaki M, Mishima H. Analysis of proliferation ability of mesenchymal stem cells from steroidal osteonecrosis of the femoral head. The 16th congress of Japanese Society for Regenerative Medicine, Sendai, March 2017.
- 14) Kato T, Khanh VC, Sato K, Kimura K, Yamashita T, Sugaya H, Yoshioka T, Mishima H, and **Ohneda O**. Chronic glucocorticoid therapy impairs the bone regeneration potential of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, December 2016.
- 15) Thuy TN, Yamashita T, Tu TC, Kato T, Ohneda K, Sato F, **Ohneda O**. Micro-vesicles enhance human diabetic AT-MSCs mobilization and migration in vitro. Asia-Pacific International Molecular Biology Network (A-IMBN) Conference. Vietnam. November 2016. Poster presentation.
- 16) Khanh VC, Kato T, Yamashita T, Sato F, **Ohneda O**. Chronic kidney disease affects the overexpression of prolyl hydroxylase 2 in human adipose tissue derived mesenchymal stem cells involved in tissue repair. The 89th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Sendai, September 2016.

17) Khanh VC, Kato T, Yamashita T, Sato F, **Ohneda O**. Uremia Affects the Overexpression of Prolyl Hydroxylase 2 in Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Involved in Wound Healing. Tsukuba Global Science Week. Tsukuba, Japan. September 2016. Oral presentation.

18) Sugaya H, Yoshioka T, Kato T, Nakatani T, Taniguchi Y, Wada T, Akahagi H, **Ohneda O**, Ochiai N, Yamazaki M, Mishima H. Basic analysis of the novel bone regeneration therapy using bone marrow – evaluation of growth factors and mesenchymal stem cells in concentrated bone marrow, The 89th Annual meeting of the Japanese Orthopedic Association, Yokohama, May 2016.

19) Sugaya H, Yoshioka T, Kato T, Nakatani T, Taniguchi Y, Wada T, Akahagi H, **Ohneda O**, Ochiai N, Yamazaki M, Mishima H. Basic analysis of the novel bone regeneration therapy using bone marrow – evaluation of growth factors and mesenchymal stem cells in concentrated bone marrow, The 15th congress of Japanese Society for Regenerative Medicine, Osaka, March 2016.

20) Kato T, Sato K, Kimura K, Yamashita T, Yoshioka T, Mishima H, **Ohneda O**. Chronic glucocorticoid therapy impairs the bone regeneration potential of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. The 15th congress of Japanese Society for Regenerative Medicine, Osaka, March 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ：<http://www.md.tsukuba.ac.jp/stemcell/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山下年晴

ローマ字氏名：Yamashita Toshiharu

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：助教

研究者番号(8桁)：50400677

(2)研究協力者

研究協力者氏名：平松裕司

ローマ字氏名：Hiramatsu Yuji

研究協力者氏名：濱田 洋実

ローマ字氏名：Hamada Hiromi