

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11558

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞の低酸素応答メカニズムの解明と新たな体外増幅法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of hypoxic response of adipose stem cells and development of a new in vitro amplification method

研究代表者

覚道 奈津子 (KAKUDO, Natsuko)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：00509490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト下腹部の正常脂肪組織から ASCs を調製した。ASCs の細胞増殖は低酸素培養にて促進し、低酸素下ではこれらの活性化に伴う、HIF-1 の増加が認められた。低酸素培養下では FGF-2 が ASCs に影響を与えて増殖を促進していた。FGF-2 遺伝子の HIF-1 結合部位を明らかにして、HIF-1 のノックダウンは FGF-2 の mRNA を低下させた。従って、脂肪幹細胞の低酸素下の増殖促進機構には HIF-1 の発現を介した FGF-2 の作用が関与することを解明した。また、ASCs の FGF-2 を介した増殖効果には Src が関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、低酸素下における脂肪幹細胞の増殖促進機構が明らかになった。低酸素下の脂肪幹細胞は増殖が促進し、FGF-2 や VEGF などの増殖因子も多量に分泌することが明らかになった。これらの培養法や増殖因子が分泌された培養上清は、今後の再生医療応用への利用に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：ASCs were prepared from normal adipose tissue of human lower abdomen, and the cell proliferation of ASCs was promoted by hypoxia, and the increase of HIF-1 was observed under hypoxia due to their activation. The knockdown of HIF-1 decreased the mRNA of FGF-2, indicating that the HIF-1 binding site of the FGF-2 gene is involved in the proliferation of ASCs. Therefore, we elucidated that the mechanism of proliferation promotion of adipose stem cells under hypoxia involves the action of FGF-2 through the expression of HIF-1. We also found that Src is involved in the FGF-2-mediated proliferative effect of ASCs.

研究分野：形成外科学、再生医療学、幹細胞学

キーワード：脂肪幹細胞 低酸素 増殖 FGF-2 HIF Src

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト皮下脂肪組織中に存在する脂肪幹細胞 ( Adipose-derived Stem Cells: ASCs ) の存在が知られるようになり、骨髄由来幹細胞に代わる幹細胞として再生医療への応用が期待されている。脂肪組織は、形成外科手術の際の余剰組織として採取することは容易であり、局所麻酔下で採取可能である。また骨髄幹細胞採取に比較して脂肪組織採取は侵襲も少なく、採取後の疼痛も極めて少なく、ドナーサイトの変形・欠損も非常に少なく行える。少量のドナーサイトから多量の幹細胞を得るためには、細胞の大量生産技術が求められているとともに、その増殖分化制御システムを解明することは科学の進歩に貢献するだけでなく、治療の効果や安全性を高めるのにも役立つことが期待される。

一方、酸素濃度の変化や FGF-2 が種々の細胞の増殖性をはじめとする生理活性に影響を与えることが報告されているが、その ASCs への影響については未解明であった。

## 2. 研究の目的

低酸素環境でヒト脂肪幹細胞を培養すると増殖が促進されること、及びそのメカニズムに低酸素誘導因子 ( HIF-1 ) を介した線維芽細胞増殖因子 ( FGF-2 ) の作用が関与するかどうかを明らかにする。脂肪幹細胞における FGF-2 の細胞増殖の検討とその細胞内情報伝達経路の解明を行う。

## 3. 研究の方法

ヒト下腹部の正常脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理により ASCs を調製した。低酸素下 ( hypoxia; 1% ) 通常酸素下 ( 20% ) にて培養を行い、細胞増殖度を検討した。低酸素培養下における各種タンパク発現を Western blot 法で測定し、VEGF と FGF-2 の mRNA の発現とタンパク産生量を RT-PCR と ELISA で測定した。特に、低酸素下における、転写因子である HIF-1 $\alpha$  ( Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  ) の発現について Western blotting 法で検討した。低酸素下で活性化し、核内移行した HIF-1 $\alpha$  が FGF-2 の promoter 領域もしくは本体部分に結合するかどうかを ChIP assay で検討した。

ヒト脂肪幹細胞を FGF-2 とともに培養し、細胞増殖を評価した。その増殖効果に対する FGF 受容体 ( FGFR ) 阻害剤 ( NVP-BGJ398 ) ERK1/2 阻害剤 ( PD98059 ) PI3K/Akt 阻害剤 ( LY294002 ) JNK 阻害剤 ( SP600125 ) および p38 MAPK 阻害剤 ( SB203580 ) および Src 阻害剤 ( PP1 ) の効果を検討した。同時に、タンパク質レベルで ERK1/2、JNK、p38、Akt などのいくつかのシグナル伝達酵素に対する FGFR 阻害剤の効果の評価し、FGF-2 による Src 活性化の関与も検討した。

## 4. 研究成果

ASCs の細胞増殖は低酸素培養にて促進し、培養 7 日目では通常培養の 1.6 倍の細胞数に

増加した。その増殖効果はシグナル伝達系の阻害剤で抑制される一方、低酸素下ではこれらの活性化に伴う、HIF-1 の増加が認められた。低酸素培養下では VEGF と FGF-2 の mRNA 発現と細胞外分泌量は促進したが、両者の増殖因子のうちで ASCs の増殖に影響を与えたのは FGF-2 であることを明らかにした。低酸素下 6 時間で HIF-1 の発現が認められた。Hypoxia における FGF-2 の遺伝子本体部分への結合が認められた。FGF-2 遺伝子の HIF-1 結合部位を明らかにし、HIF-1 のノックダウンは FGF-2 の mRNA を低下させることを明らかにした。従って、脂肪幹細胞の低酸素下の増殖促進機構には HIF-1 の発現を介した FGF-2 の作用が関与することを解明した。

FGF-2 は、脂肪幹細胞の増殖を著しく促進し、細胞周期における S および G2 / M 期への進行を促進した。FGF-2 による細胞増殖は、FGFR 阻害剤 (NVP-BGJ398) および Erk1 / 2 阻害剤 (PD98059) 、PI3K / Akt 阻害剤 (LY294002) 、JNK 阻害剤 (SP600125) 、および p38MAPK 阻害剤 (SB203580) などのさまざまなシグナル伝達経路阻害剤によって阻害された。FGFR 阻害剤は、いくつかのシグナル伝達経路で、AKT、Erk1 / 2、JNK、p38 などのプロテインキナーゼの活性化を低下させました。FGFR の下流キナーゼである Src は FGF-2 によって活性化され、その活性化は FGFR 阻害剤によってキャンセルされた。Src の下流キナーゼである MEK1 / 2 は、FGF-2 によって並行して制御されていた。Src 阻害剤 (PP1) は、Src および MEK1 / 2 の阻害を介して脂肪幹細胞の増殖を著しくブロックした。

本研究から、低酸素下における脂肪幹細胞の増殖促進機構が明らかになった。低酸素下の脂肪幹細胞は増殖が促進し、FGF-2 や VEGF などの増殖因子も多量に分泌することがわかった。これらの培養法や増殖因子が分泌された培養上清は、今後の再生医療応用への利用に役立つものと考えられる。今後、研究をさらに発展させ、低酸素環境が脂肪幹細胞形質の維持や分化の調節などにおいて影響を与えるかどうかを検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ma Y, Kakudo N, Morimoto N, Lai F, Taketani S, Kusumoto K.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Fibroblast growth factor-2 stimulates proliferation of human adipose-derived stem cells via Src activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem cell research & therapy	6. 最初と最後の頁 350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-019-1462-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ma Y, Kakudo N, Morimoto N, Lai F, Kusumoto K
2. 発表標題 Fibroblast growth factor-2 stimulates proliferation of human adipose-derived stem cells via Src activation
3. 学会等名 Plastic Surgery The Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	楠本 健司  (KUSUMOTO Kenji)  (20161630)	関西医科大学・医学部・教授    (34417)	
研究分担者	森本 尚樹  (MORIMOTO Naoki)  (40378641)	関西医科大学・医学部・准教授    (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------