

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15815

研究課題名(和文)再生医療に用いる新規高品質間葉系幹細胞の開発

研究課題名(英文)Development of novel high quality mesenchymal stem cells for regenerative medicine

研究代表者

藤澤 浩一(Fujisawa, Koichi)

山口大学・医学部・講師(寄附講座等)

研究者番号：00448284

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):MSCは再生医療に用いられており、培養環境の違いにより細胞の未分化能、治療効果に違いがでることが考えられる。そこで、低酸素環境になくても幹細胞を同様の代謝状態に保つために有用な低酸素模倣剤DFOにより起こる代謝変化について低酸素処理した細胞のそれと比較検討した。比較的低濃度のDFO投与により増殖抑制が認められたもののミトコンドリア活性の低下、アポトーシス抑制効果が認められ、MSCのプレコンディショニングに有用である可能性が示唆された。本研究では、BMSCにおけるDFO投与による各種代謝産物に及ぼす影響を網羅的に評価し、BMSCにDFOを添加することで低酸素培養の代わりになる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄キレート剤(DFO)投与により細胞増殖抑制は現れるものの、アポトーシス抑制効果を示し、低酸素誘導性タンパクの発現上昇と、ミトコンドリア機能低下を起こすDFOの濃度での培養を行うことが有用であることを解明した。また代謝解析により、低酸素培養の代替にDFO投与が有用であることがわかった。本研究のデータは今後MSCを用いた再生医療を行う際に必要なMSCの調製に重要な知見になることが示された。

研究成果の概要(英文):Mesenchymal stem cells (MSC) are used in regenerative medicine applications.

We conducted a comparative assessment of metabolic changes in MSCs induced by deferoxamine (DFO), an iron chelator that can be used as a mimetic hypoxia reagent useful for maintaining cells in the same metabolic state even in low-oxygen environments, and MSCs that underwent low-oxygen treatment. Although inhibition of cell division was observed after administering DFO at a relatively low concentration, both decreased mitochondrial activity and an inhibitory effect on apoptosis were also observed, suggesting the possibility that DFO at low concentrations may be useful for MSC preconditioning. In this study, we comprehensively evaluated the effect of DFO on various metabolites in cultured human mesenchymal stem cells (BMSC) as well as the feasibility possibility of replacing the hypoxic culturing technique by treating BMSCs with DFO.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 肝幹細胞

次に DFO の抗アポトーシス効果を評価した。効率よくアポトーシスを起こす Dox を投与し 24 時間後の Caspase3/7 活性を測定した。0 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M の DFO を投与した BMSC に 10 μ M の Dox 投与を行ったところ、Caspase3/7 活性の低下が認められ、BMSC における抗アポトーシス作用が確認された (Figure 1D)。

低酸素下培養は DFO 添加で起こる増殖抑制を阻害する

DFO 添加で起こる細胞増殖抑制についてさらに解析するため、BMSC を 21%、5%、1% の各酸素濃度で DFO の増殖に及ぼす影響を比較した。21%酸素下では DFO10 μ M の増殖抑制能は 70%程度であったが、1%では 40%程度の増殖抑制を示すなど、酸素濃度低下に伴い DFO の細胞増殖抑制効果が低減された (Figure 1E)。

遺伝子発現解析 (SAGE) で DFO は Cell survival に関わる遺伝子発現亢進と HIF1 下流遺伝子発現増加による代謝変化を誘導する

IPA ソフトウェアを用いて遺伝子の機能分類を行ったところ、cell viability, cell survival などの細胞生存に関わる機能に関わる遺伝子の発現増加や、metabolism of carbohydrate に関わる遺伝子の発現の増加が認められた (table S1)。

既知のパスウェイランキングでは Mitotic Roles of Polo-like kinase や Cell cycle に関わる pathway が挙げられた (Fig2A)。

また DFO による低酸素模倣を調べるため Glycolysis パスウェイについて調べたところ 6-phosphofructokinase, fructose-bisphosphate aldolase, phosphoglycerate kinase などの酵素の発現の増加が認められた (Fig2B)。

また各遺伝子発現では、ピルビン酸からアセチル CoA を作る PDH を抑制する PDK1、ミトコンドリア品質管理に関わる BNIP3、ピルビン酸を乳酸に変換する酵素 LDHA など解糖系に関わる遺伝子、血管新生に関わる VEGF の増加を認めた (Fig2C)。

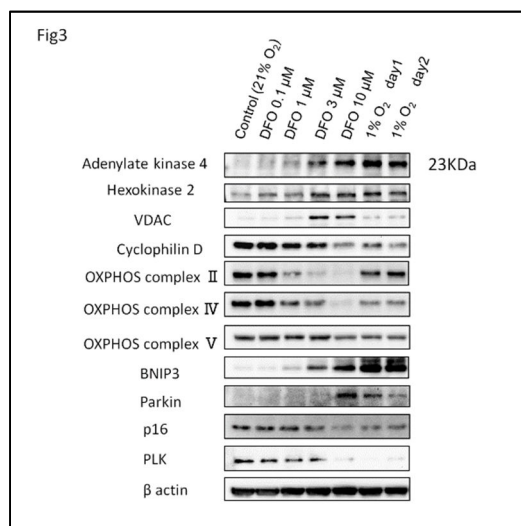
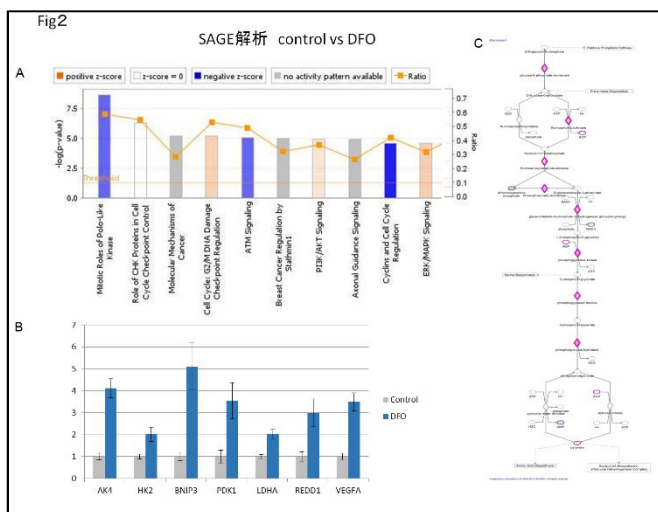
DFO はミトコンドリアに局在するタンパクの発現を抑制する

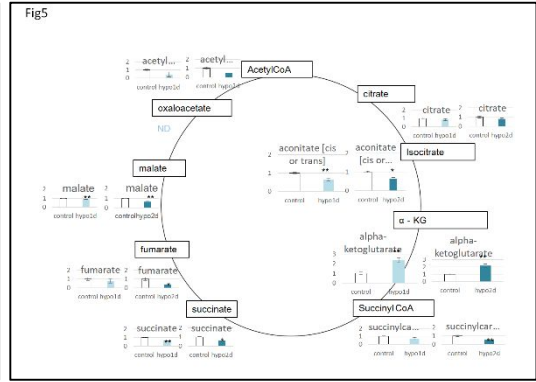
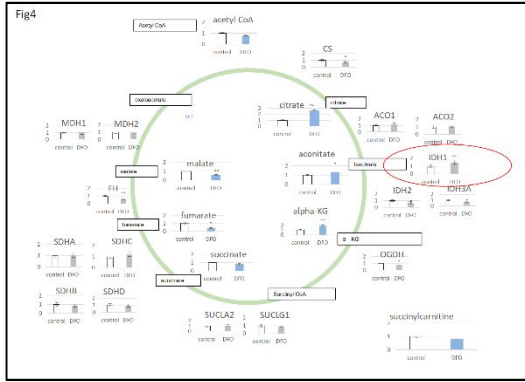
ミトコンドリア代謝に関わるタンパク発現について DFO 各種濃度と低酸素の比較を詳しく行うため、ウェスタンブロットングで評価した (Fig3)。

低酸素により誘導される adenylate kinase 4 (AK4), hexokinase 2 (HK2) の上昇が認められた。ミトコンドリア外膜に存在する voltage-dependent anion channel (VDAC) は DFO 3 μ M から低酸素より多く発現していた。またミトコンドリア膜タンパクでは cyclophilin D は低酸素と DFO では濃度依存性に発現が低下していた。一方 VDAC は DFO 3 μ M、10 μ M で発現上昇が認められたが、低酸素では発現上昇は認められなかった。酸化のリン酸化に関わるタンパクのうち Complex 2, 4 は DFO 濃度依存性に発現が低下し 10 μ M では低酸素より著明に低下していた。低酸素により誘導されミトコンドリア品質管理に関わる Bnip3 は低酸素と DFO では濃度依存性に発現が低下していたのに対し、Parkin は DFO 3 μ M までほとんど発現が認められなかったが、10 μ M で低酸素より高い発現が認められた。また細胞増殖に関わる plk1、老化に関わる p16 は低酸素と DFO では濃度依存性に発現が低下していた。

DFO は著明なグルタミンオリシスを誘導する

DFO 群と低酸素群を比較するとアミノ酸代謝、クレアチン代謝、尿酸代謝などに関わる多くの代謝産物の変化は同様の傾向が見られたが、興味深いことに TCA 回路に関わる metabolites に著明な変化が認められた。DFO 群でクエン酸、aconitate, alpha-KG の有意な上昇、フマル酸、リンゴ酸の有意な低下が認められた (Fig4)。SAGE 解析によりイソクエン酸と alpha-KG とを相互変換する酸化還元酵素である idh1 の発現上昇が認められた。一方低酸素群では alpha-KG の増加が認められたもののクエン酸、aconitate など TCA 回路に関わるその他の代謝産物は DFO 群に比べ量が少なかった (Fig5)。





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Fujisawa Koichi, Takami Taro, Sasai Nanami, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 21
2. 論文標題 Metabolic Alterations in Spheroid-Cultured Hepatic Stellate Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3451 ~ 3451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103451	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 -

1. 著者名 Miyaji Takashi, Takami Taro, Fujisawa Koichi, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 66
2. 論文標題 Bone marrow-derived humoral factors suppress oxidative phosphorylation, upregulate TSG-6, and improve therapeutic effects on liver injury of mesenchymal stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 213 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.19-125	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 -

1. 著者名 Matsunaga Kazuhito, Fujisawa Koichi, Takami Taro, Burganova Guzel, Sasai Nanami, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 64
2. 論文標題 NUPR1 acts as a pro-survival factor in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and is induced by the hypoxia mimetic reagent deferoxamine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 209 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.18-112	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 -

1. 著者名 Nishimura Tatsuro, Takami Taro, Sasaki Ryo, Aibe Yuki, Matsuda Takashi, Fujisawa Koichi, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Tani Kenji, Taura Yasuho, Sakaida Isao	4. 巻 14
2. 論文標題 Liver regeneration therapy through the hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0210588 ~ 0210588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0210588	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 -

1. 著者名 Fujisawa Koichi, Takami Taro, Nagatomo Takahiro, Fukui Yumi, Hoshida Hisashi, Saeki Issei, Matsumoto Toshihiko, Hidaka Isao, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 77
2. 論文標題 Usefulness of adult medaka fish as a model for the evaluation of alcoholic fatty liver	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Alcohol	6. 最初と最後の頁 147 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alcohol.2019.01.005	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 -

1. 著者名 Fujisawa Koichi, Takami Taro, Okada Sae, Hara Kazusa, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Yamasaki Takahiro, Sakaida Isao	4. 巻 36
2. 論文標題 Analysis of Metabolomic Changes in Mesenchymal Stem Cells on Treatment with Desferrioxamine as a Hypoxia Mimetic Compared with Hypoxic Conditions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 1226 ~ 1236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.2826	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa Koichi, Hara Kazusa, Takami Taro, Okada Sae, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 9
2. 論文標題 Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 13287-13297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-018-0825-1	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 -

1. 著者名 Tanimura Ayako, Miyoshi Keiko, Horiguchi Taigo, Hagita Hiroko, Fujisawa Koichi, Noma Takafumi	4. 巻 47
2. 論文標題 Mitochondrial Activity and Unfolded Protein Response are Required for Neutrophil Differentiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1936 ~ 1950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000491464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinoda Shuhei, Kaino Seiji, Amano Shogo, Harima Hirofumi, Matsumoto Toshihiko, Fujisawa Koichi, Takami Taro, Yamamoto Naoki, Yamasaki Takahiro, Sakaida Isao	4. 巻 9
2. 論文標題 Deferasirox, an oral iron chelator, with gemcitabine synergistically inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 25421-25428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25421	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 -

1. 著者名 Fujisawa Koichi, Takami Taro, Fukui Yumi, Nagatomo Takahiro, Saeki Issei, Matsumoto Toshihiko, Hidaka Isao, Yamamoto Naoki, Okamoto Takeshi, Furutani-Seiki Makoto, Sakaida Isao	4. 巻 7
2. 論文標題 Assessment of high-fat-diet-induced fatty liver in medaka	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 31534-31540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.031534	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 -

1. 著者名 Saeki Issei, Yamasaki Takahiro, Maeda Masaki, Hisanaga Takuro, Iwamoto Takuya, Fujisawa Koichi, Matsumoto Toshihiko, Hidaka Isao, Marumoto Yoshio, Ishikawa Tsuyoshi, Yamamoto Naoki, Suehiro Yutaka, Takami Taro, Sakaida Isao	4. 巻 10
2. 論文標題 Treatment strategies for advanced hepatocellular carcinoma: Sorafenib vs hepatic arterial infusion chemotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 571 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4254/wjh.v10.i9.571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa Koichi, Takami Taro, Nagatomo Takahiro, Fukui Yumi, Hoshida Hisashi, Saeki Issei, Matsumoto Toshihiko, Hidaka Isao, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 77
2. 論文標題 Usefulness of adult medaka fish as a model for the evaluation of alcoholic fatty liver	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Alcohol	6. 最初と最後の頁 147 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alcohol.2019.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Tatsuro, Takami Taro, Sasaki Ryo, Aibe Yuki, Matsuda Takashi, Fujisawa Koichi, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Tani Kenji, Taura Yasuho, Sakaida Isao	4. 巻 14
2. 論文標題 Liver regeneration therapy through the hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 210588-210596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0210588	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤澤浩一、高見太郎、坂井田功
2. 発表標題 メダカモデルを用いた肝脂肪化の評価
3. 学会等名 第30回日本肝臓医生物学研究会(プロメテウスの会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤澤浩一、高見太郎、福井悠美、松本俊彦、山本直樹、坂井田功
2. 発表標題 メダカ脂肪肝の非侵襲的モデルについて
3. 学会等名 第24回小型魚類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤澤浩一、高見太郎、福井悠美、松本俊彦、山本直樹、坂井田功
2. 発表標題 脂肪食投与によるメダカ脂肪肝の代謝変化とTransparent(透明)メダカを用いたUltrasoundによる非侵襲的脂肪肝評価
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------