

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07235

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞における薬物輸送解析と腎保護能を有する新規細胞医薬の開発にむけた最適化

研究課題名(英文) Characterization of drug transport in human adipose-derived stem cells and optimization in development of novel cell medicine with nephro-protective potency

研究代表者

竹林 裕美子 (yumiko, urakami-takebayashi)

大阪医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50805299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脂肪幹細胞における薬物トランスポーターmRNAの発現解析を行った。その結果、OCTN1およびOCTN2 mRNAの明確な発現が確認された。さらに、ABCトランスポーターであるMRP1、MRP2、MRP3 mRNAの発現が明確に確認された。また、OATP2B1 mRNAは非常に低いレベルであった。典型的なHIF-1標的遺伝子産物であるGLUT1について、低酸素培養したヒト脂肪幹細胞における発現及びグルコース輸送変動の解析を行った。その結果、通常培養下と比べ、低酸素培養下では、GLUT1のmRNAおよびタンパク発現は増加するとともに、GLUT輸送活性の有意な上昇が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、腎不全からの回復は腎移植以外に方法が確立されていないのが現状であり、新しい治療方法の開発は、患者のQOL向上や増え続ける医療費の抑制に繋がる。脂肪幹細胞は、再生医療への応用が期待されている。一方、障害組織への集積性を利用した脂肪幹細胞をDDSのデバイスとしての応用は、腎保護作用を有しながらも臓器移行性や薬物自身の薬理作用によって単独投与できない薬物を脂肪幹細胞に封入させることによって効率的に腎臓へ送達させる可能性を有し、新規腎指向型DDSとしての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We characterized the mRNA expression level of various drug transporters in human adipose-derived stem cells (hAdSCs). Real-time PCR analyses revealed that the mRNA of OCTN1 and OCTN2 was clearly expressed in hAdSCs. Furthermore, mRNA of MRP1, MRP2, and MRP3 was detected, and the mRNA of OATP2B1 was expressed at much lower level. The effect of hypoxia on expression and transporter activity of glucose transporter 1 (GLUT1) was investigated in hAdSCs because GLUT1 is one of well-known target gene of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). The mRNA and protein expression of GLUT1 in hAdSCs were increased under hypoxic conditions comparing normoxic conditions. In addition, GLUT inhibitor phloretin-sensitive glucose uptake in hAdSCs was significantly enhanced under hypoxic conditions.

研究分野：薬剤学

キーワード：脂肪幹細胞 トランスポーター 腎障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、間葉系幹細胞が障害組織への集積性・組織修復作用を有することが報告されており、再生医療分野での応用が期待されている。一方、障害組織への集積性を利用し、脂肪幹細胞をドラッグデリバリーシステム (DDS) のデバイスとして用いる方法が注目されている。腎障害時において、薬物を封入させた脂肪幹細胞を投与することは、新規腎指向型 DDS としての応用が期待されると同時に、脂肪幹細胞自身による腎保護効果も期待できると考える。脂肪幹細胞を薬物キャリア機能をもつ細胞医薬として応用するためには、脂肪幹細胞における薬物輸送メカニズムに関する情報が必須であるが、分子レベルでのトランスポーター発現の情報は未だ少なく、不明点が多い。

一方、腎障害部位では毛細血管の損傷などにより低酸素状態となることが想定されるが、脂肪幹細胞における輸送機能が低酸素環境下で変動する可能性が想定される。脂肪幹細胞の再生医療への応用を進める上で、脂肪幹細胞のトランスポーター発現および機能変動に関する基礎的な情報を得ることは必須である。

2. 研究の目的

本研究では、以下の2項目について検討し、情報を得ることを主な目的とした。

(1) ヒト脂肪幹細胞における各種薬物トランスポーターの発現解析

ヒト脂肪幹細胞における各種薬物トランスポーターの mRNA 発現について、リアルタイム PCR 法によって解析し、発現活性が高いトランスポーターを明らかにする。

(2) 低酸素環境下におけるヒト脂肪幹細胞の薬物輸送変動の解析

脂肪幹細胞を生体内に投与した際に晒される低酸素環境がヒト脂肪幹細胞のトランスポーター一介在性輸送に及ぼす影響について mRNA レベル、タンパクレベルおよび輸送活性レベルで検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト脂肪幹細胞 (PromoCell 社) は、5% FBS および抗生物質 (1% ストレプトマイシン/ペニシリン) を含む KBM ADSC-2 培地を用い、CO₂ インキュベーター内 (37 °C、5% CO₂-95% air) で培養した。細胞の継代は7日ごとに KBM Trypsin AOF を用いて細胞を剥離し 100 mm culture dish に播種した。培地交換は2~3日ごとに行った。

(2) ヒト由来脂肪幹細胞における脂肪細胞への分化

ヒト脂肪幹細胞を24ウェルプレートに播種後、サブコンフルエントで分化誘導培地に置換し、14日間培養した。4% paraformaldehyde で固定後、0.18% Oil Red O 溶液を添加し、37 °C で15分染色した。添加溶液を除去後、Mayer's Hematoxylin solution を添加し、室温で5分間染色し、顕微鏡観察を行った。

(3) 低酸素培養条件下での細胞培養

低酸素培養は、ヒト脂肪幹細胞を播種後、CO₂ インキュベーター内で4日間培養後、低酸素濃度に設定したマルチガスインキュベーター内 (37 °C、5% CO₂、1% O₂) で48時間培養し、リアルタイム PCR、ウエスタンブロットングおよび輸送実験に用いた。

(4) リアルタイム PCR

ヒト脂肪幹細胞を35 mm culture dish に播種後、RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。Total RNA は ReverTra Ace™ を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA を用い、以下の条件で PCR 反応を行った。すなわち、逆転写によって得られた cDNA について 95 °C で30秒間加熱後、95 °C 10秒、60 °C 15秒、72 °C 15秒のサイクルを45回繰り返した。それぞれのサンプルの β -actin mRNA 発現量を解析し、その β -actin mRNA 発現量を内部標準として各種トランスポーターの mRNA 発現を評価した。

(5) ウエスタンブロットング

ヒト脂肪幹細胞を100 mm culture dish に播種後6日に細胞懸濁液を調整した。すなわち、

培地を除去後、細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し、セルスクレーパーで回収した。細胞懸濁液は 4 条件において 3,000 rpm で 5 分間遠心後、細胞を溶解液 [1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) SDS, and 1% (w/v) deoxycholic acid in PBS] で溶解した。30 分間氷上でインキュベーションした後、10,000 rpm で 5 分間遠心し、上清をイムノブロットングのサンプルとして用いた。サンプルは 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によって分離し、ニトロセルロース膜に転写した。その膜を 1% Tween-20 を含む PBS (PBS-T) を用いて洗浄後、5% スキムミルク含有 PBS-T で 4 晩ブロッキングした。その後、PBS-T で希釈した polyclonal anti-GLUT-1 antibody (1:500) と室温 2 時間反応させた。膜を PBS-T で洗浄後、ECL™ anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase-linked whole antibody を添加し、室温 1 時間でインキュベーションした。PBS-T で洗浄後、Amersham ECL chemiluminescent reagent により化学発光させ、Amersham Imager 600 により検出した。

(6) グルコース輸送実験

取り込み実験には 24 ウェルプレートに培養した細胞を用いた。培地を除去後、細胞を PBS で洗浄した。D-³H]-glucose を含む溶液を添加し、37 条件下インキュベーションした。一定時間インキュベーション後、基質溶液を除去し、氷冷した PBS で洗浄した。0.1M NaOH で細胞を溶解することにより各サンプルを回収し、細胞内蓄積量を液体シンチレーション法によって測定した。また、各サンプルのタンパク濃度を Lowry 法により定量した。

4. 研究成果

(1) ヒト由来脂肪幹細胞における脂肪細胞への分化

本実験で使用したヒト脂肪幹細胞 (PromoCell 社から購入) の分化特性を知るために、まずヒト脂肪幹細胞の脂肪細胞への分化について検討した。脂肪細胞への分化促進培地の組成としては、10 µg/mL insulin, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM IBMX を含む high-glucose DMEM を基本培地とした。さらに、一般的に脂肪分化培地に indomethacin が添加されることが多いが、過去の報告によって indomethacin 濃度に差異があることから、本研究では、脂肪幹細胞の脂肪分化における最適な indomethacin 濃度 (0, 100, 200 µM) についても検討した。その結果、対照培地に比べ、indomethacin を含むすべての培地において oil red O によって赤く染まった脂肪滴が観察されるとともに、indomethacin 濃度依存的に脂肪滴生成が促進される傾向が認められた。一方、200 µM indomethacin 処理では、処理開始後 2 週間経過すると、低濃度 indomethacin 処理に比べて細胞数の減少が認められた。これらの結果より、本実験系で用いたヒト脂肪幹細胞が適切な幹細胞特性を有していることを確認した。

(2) ヒト脂肪幹細胞における各種薬物トランスポーターの発現解析

これまでに、ヒト脂肪幹細胞に発現が報告されているグルコーストランスポーター GLUT1 および尿酸排出トランスポーター BCRP について検討を行ったところ、両トランスポーターの mRNA 発現が観察された。

次に、発現解析の報告がなされていない薬物トランスポーター群について検討を進めた。まず、有機カチオントランスポーター群では、OCTN1 および OCTN2 mRNA の明確な発現が確認されたが、OCT1, OCT2 および OCT3 mRNA は確認できたものの低値であった (Fig.1)。また、有機アニオントランスポーター群 OAT1, OAT2, OAT3 および OAT4 mRNA 発現は非常に低レベルであった。

さらに、腎保護作用を有する薬物の輸送に関与するトランスポーターについて検討を行った。まず、HMG-CoA 還元酵素阻害薬やアンジオテンシン変換酵素など、薬物の取り込みに関与することが報告されている OATP1B1, OATP1B3 および OATP2B1 mRNA 発現について検討した。その結果、OATP2B1 mRNA は確認できたものの非常に低値であり、OATP1B1 および OATP1B3 に関しては検出限界以下であった。一方、薬物の排泄に関わる ABC トランスポーターの発現に関しては、MRP 1、MRP2、MRP3 mRNA の明確な発現が確認された (Fig.1)。

以上の結果より、ヒト脂肪幹細胞において、これら薬物トランスポーター mRNA 発現量に顕著な差があることが明らかとなり、特に細胞外への薬物排出に関与することが予測される ABC トランスポーターの発現が認められた。しかし、薬物の取り込みに関与する OATP1B1, OATP1B3 および OATP2B1 に関しては mRNA 発現レベルにおいて非常に低く、これらトランスポーターを介する脂肪幹細胞内への薬物導入は期待し難いものと推察された。

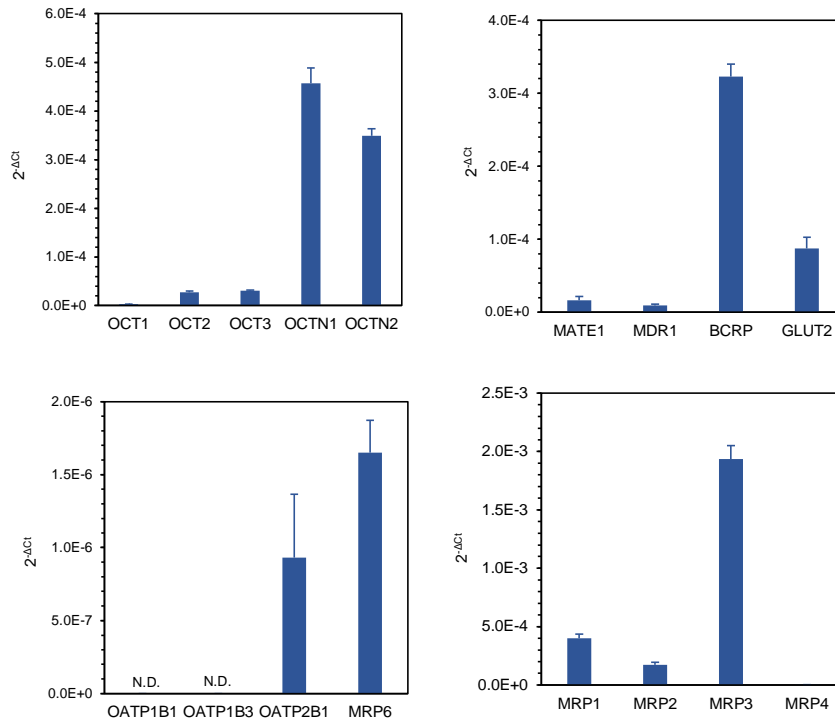


Fig. 1 ヒト脂肪幹細胞における種々トランスポーターmRNA 発現レベル

(3) 低酸素培養条件下におけるヒト脂肪幹細胞の輸送変動

まず、腎障害部位では低酸素状態となることが想定されることから、ヒト脂肪幹細胞における薬物輸送の変動要因として、低酸素誘導因子 HIF-1 による調節機構の関与に着目した。そこで、本研究では、HIF-1 標的遺伝子産物であるグルコーストランスポーター GLUT1 を選択し、低酸素培養したヒト脂肪幹細胞における GLUT1 発現および機能変動の解析を行った。

その結果、低酸素条件下で処理することによって、ヒト脂肪幹細胞における GLUT1 mRNA は顕著に増加した。さらに、ウエスタンブロット解析によって GLUT1 タンパクの発現変動を調べたところ、低酸素処理によって GLUT1 タンパクの増加が観察された。

ヒト脂肪幹細胞の GLUT1 輸送活性は、GLUT1 の基質であるグルコースの輸送を指標として評価することとした。すなわち、GLUT の輸送機能を選択的に評価するために、SGLT 由来の輸送活性を抑えることを意図した Na⁺ free 条件下で輸送実験を行うとともに、GLUT 阻害剤である phloretin を添加時の輸送活性を、phloretin 非添加時での群の輸送活性値から差し引くことで GLUT 輸送活性を評価した。その結果、ヒト脂肪幹細胞における GLUT 輸送活性は、通常酸素培養下に比べて、低酸素条件下において有意に上昇することが観察された。これらの結果は、ヒト脂肪幹細胞におけるトランスポーターの発現・機能変動に HIF-1 が一部関与し、ヒト脂肪幹細胞の各種輸送機能が低酸素環境下で変動する可能性を示唆するものと思われる。本研究では、HIF-1 標的遺伝子産物である GLUT1 に着目して検討を進めたが、今後、低酸素時における各種薬物トランスポーターの発現機能活性の変動について検討を行う必要があると考えている。

以上、本研究において脂肪幹細胞における薬物トランスポーターの発現について明らかにした。さらに、低酸素下におけるトランスポーターの変動についても新たな知見を得た。これら研究成果は脂肪幹細胞を薬物キャリアとして応用するための重要な基礎的情報を提供するものと考えられる。今後、これら研究成果をもとに、脂肪幹細胞への薬物の貯留特性などを明らかにすることで、脂肪幹細胞の DDS への応用にも貢献できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hongxin Sun, Yumiko Urakami -Takebayashi, Hideyuki Motohashi, Junya Nagai	4. 巻 77
2. 論文標題 Internalization of FITC-albumin in Human Adipose-derived Stem Cells: Involvement of Clathrin and Caveolin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmazie	6. 最初と最後の頁 141-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1691/ph.2022.2340.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土佐 勇策, 池田 祐介, 竹林 裕美子, 孫 紅昕, 本橋 秀之, 永井 純也
2. 発表標題 ヒト脂肪幹細胞におけるGLUT1およびABCG2の発現・機能に及ぼす低酸素培養の影響
3. 学会等名 日本薬剤学会 第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 祐介, 土佐 勇策, 竹林 裕美子, 孫 紅昕, 本橋 秀之, 永井 純也
2. 発表標題 低酸素培養条件下におけるヒト脂肪幹細胞のHIF-1関連遺伝子の発現変動
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪井崇洋, 水田朱梨, 須藤ほおみ, 大利昌広, 竹林裕美子, 伊井正明, 永井純也
2. 発表標題 ヒト脂肪幹細胞におけるエンドサイトーシス特性-FITC-dextranおよびFITC-albuminを基質とした検討-
3. 学会等名 日本薬剤学会 第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹林裕美子、水田朱梨、坪井崇洋、孫 紅昕、本橋秀之、伊井正明、永井純也
2. 発表標題 ヒト脂肪幹細胞における受容体介在性エンドサイトーシス特性の解析
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会
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

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