

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16666

研究課題名（和文）Lipogems処理脂肪組織による変形性膝関節症の治療効果因子のメタボローム解析

研究課題名（英文）Analysis of the therapeutic effect of metabolites secreted from Lipogems-treated adipose tissue on knee osteoarthritis

研究代表者

平田 寛明（HIRATA, Hiroaki）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：10887285

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）：変形性膝関節症の治療にLipogemsなどを用いて調製された脂肪組織の破砕物や、脂肪由来幹細胞が用いられている。近年、細胞の分泌物のうち、代謝産物が様々な生理活性を有することが示されているが、脂肪由来幹細胞の代謝産物が治療効果（抗炎症効果）をもつかは不明だった。本研究で実施したメタボローム解析の結果、ヒト脂肪由来幹細胞は大量の代謝産物Xを分泌していた。マクロファージにXを曝露した結果、炎症反応に関わる遺伝子の発現が抑制されていたことから、脂肪由来幹細胞による治療効果に代謝産物も寄与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

高齢化を背景に、変形性膝関節症患者は世界的に増加している。軽症患者にはヒアルロン酸やステロイド等が投与されているが、その効果には限界がある。近年、脂肪組織の破砕物や脂肪由来幹細胞による変形性膝関節症治療が広まりつつあり、一定の治療効果が認められている。これまで、脂肪由来幹細胞による治療効果はサイトカインやエクソソームによって担われていると考えられてきたが、本研究から、Xを含む代謝産物が「第3の治療因子」であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Fragmented adipose tissue prepared with kits such as Lipogems and adipose-derived stem cells have been used for the treatment of osteoarthritis of the knee. Recently, metabolites have been shown to have various physiological effects, but it was unclear whether the metabolites secreted by adipose-derived stem cells have therapeutic (anti-inflammatory) effects. Metabolomic analysis performed in this study revealed that human adipose-derived stem cells secreted a large amount of metabolite X. Exposure of macrophages to metabolite X suppressed the expression of genes involved in inflammatory responses, indicating that metabolites also contribute to the therapeutic effect of adipose-derived stem cells.

研究分野：整形外科学

キーワード：脂肪由来幹細胞 メタボローム トランスクリプトーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、変形性膝関節症の治療に、Lipogems などのキットを用いた破碎脂肪組織や、脂肪組織中に含まれる間葉系幹細胞(脂肪由来幹細胞)が用いられている。これまでの研究から、脂肪由来幹細胞による治療効果は、主に炎症性サイトカインやエクソソームによる炎症抑制作用によるものであると考えられてきた。一方、最近では代謝産物(メタボライト)が様々な生理活性を有していることが明らかとなりつつあるが、脂肪由来幹細胞の治療効果にメタボライトが寄与しているかどうかは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪組織中に含まれる脂肪由来幹細胞のメタボライトが、治療効果を有しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

メタボローム解析によって、ヒト脂肪由来幹細胞の培養上清に含まれるメタボライトを網羅的に探索した。メタボライトが抗炎症効果を有しているかどうかを検討するため、ヒト単球由来 THP-1 細胞から分化誘導したマクロファージに脂肪由来幹細胞の培養上清あるいはメタボライトを曝露し、RNA シークエンスによって網羅的遺伝子発現解析を実施した。また、メタボライトの取り込みを薬理的に阻害することで、脂肪由来幹細胞の培養上清がもつ抗炎症効果をキャンセルできるかどうかをリアルタイム PCR や ELISA によって検討した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

ヒト脂肪由来幹細胞のメタボローム解析

はじめに、6名の健康なヒトの脂肪組織から単離した脂肪由来幹細胞を培養し、培養上清に対してメタボローム解析を行った。その結果、様々な代謝産物が含まれていることがわかったが、その中で最も高濃度に含まれていたメタボライト X に着目し以降の実験を実施した。

メタボライト X による炎症抑制効果の検討

メタボライト X が抗炎症効果を有しているかどうかを検討するため、ヒト単球由来 THP-1 細胞を用いた *in vitro* 実験を行った。THP-1 細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate によって M0 マクロファージへと分化させ、続いて lipopolysaccharide を用いて炎症促進性の M1 マクロファージへと分極させた。この M1 マクロファージに、脂肪由来幹細胞の培養上清あるいはメタボライト X を曝露した後、RNA を回収して RNA シークエンスを行った。その結果、炎症性サイトカインの一種である TNF- α をコードする *TNF* 遺伝子や、シクロオキシゲナーゼ 2 (COX2) をコードする *PTGS2* 遺伝子の発現が有意に抑制されていることが明らかとなった。

メタボライト X トランスポーター阻害剤の効果の検証

メタボローム解析で示されたとおり、脂肪由来幹細胞の培養上清中には様々な物質が含まれており、培養上清による抗炎症効果にはメタボライト X 以外が寄与している可能性も考えられる。そこで、既知のメタボライト X トランスポーター阻害剤の適用下で培養上清処理を行った場合に、炎症抑制反応がキャンセルされるかどうかを検討した。リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現を調べた結果、炎症抑制に関与する遺伝子の発現が、培養上清処理によって上昇した一方、阻害剤適用によって有意に低下していることが明らかとなった。逆に、培養上清処理によって低下した *TNF* 遺伝子の発現レベルが、阻害剤適用によって有意に上昇しており、同様の傾向が TNF- α ELISA によるタンパク質レベルでの検討でも示された。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

近年の高齢化を背景に、炎症性疾患の一つである変形性膝関節症の患者数は世界中で増加の一途をたどっている。重症化すると、関節軟骨の減少による激しい痛みが生じるため歩行が困難となり、生活の質(QOL)が大きく低下する。治療には人工関節置換術が行われるが、患者の負担が大きく、人工関節にも耐用年数があるため、症状を進行させない、あるいは摩耗した関節軟骨を回復させることが重要となってくる。一方、軽症患者にはヒアルロン酸やステロイド等の投与が行われているが、その効果には限界があることが報告されている。最近では、軽症~中等症患者に対して、破碎脂肪組織や脂肪由来幹細胞の投与による治療が世界中で行われており、一定の治療効果が認められている。作用機序としては、特にサイトカインや細胞外小胞による炎症抑制効果が指摘されてきた。これらの知見に対して、本研究では低分子代謝産物である X も抗炎症作用を有していることを明らかにし、メタボライトがサイトカインや細胞外小胞に続く「第3

の治療因子」であることを世界で初めて証明することができた。

(3) 今後の展望

サイトカインや細胞外小胞は大量に用意することが難しく、統一された品質基準も存在しない。一方、Xを含む代謝産物の多くは工業的に大量生産が可能であり、安価で高純度な製品を入手することができる。そこで、今後は脂肪由来幹細胞に加えてXを投与することで、さらに治療効果を増強できるかどうかを検討するなどして、本研究成果が臨床現場に還元されていくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hironori Kitajima, Takuya Sakamoto, Tetsuhiro Horie, Atsushi Fuku, Yuka Nakamura, Hiroaki Hirata, Yoshiyuki Tachi, Naoki Yamamoto, Yasuo Iida, Yasuhito Ishigaki, Yusuke Shimizu, Toru Ichiseki, Ayumi Kaneuji, Satoshi Osawa, Norio Kawahara,	4. 巻 12(2)
2. 論文標題 Synovial Fluid Derived from Human Knee Osteoarthritis Increases the Viability of Human Adipose-Derived Stem Cells through Upregulation of FOSL1.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells.	6. 最初と最後の頁 330 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12020330	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 Fuku A, Taki Y, Nakamura Y, Kitajima H, Takaki T, Koya T, Tanida I, Nozaki K, Sunami H, Hirata H, Tachi Y, Masauji T, Yamamoto N, Ishigaki Y, Shimodaira S, Shimizu Y, Ichiseki T, Kaneuji A, Osawa S, Kawahara N.	4. 巻 11(3)
2. 論文標題 Evaluation of the Usefulness of Human Adipose-Derived Stem Cell Spheroids Formed Using SphereRing R and the Lethal Damage Sensitivity to Synovial Fluid In Vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 337 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11030337	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀江哲寛、平田寛明、坂本卓弥、中村有香、市塚徹、川原範夫、石垣靖人
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞由来のメタボライトによる免疫抑制機構の解明
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第41回大会
4. 発表年 2023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
---------	---------