

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591344

研究課題名(和文) 1型糖尿病に対する脱分化脂肪細胞を用いた新規免疫抑制療法の開発

研究課題名(英文) Novel immunosuppressive therapy of type 1 diabetes mellitus using adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells

研究代表者

石毛 美夏 (ISHIGE, Mika)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：90420950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：自然発症1型糖尿病モデルマウス(NOD)を用いて脱分化脂肪細胞(DFAT)の作成と機能解析を行った。NODから作成したDFAT(NOD-DFAT)の細胞表面抗原は既報のMSC類似であり、同様の免疫制御能をもつことが期待された。糖尿病発症直後にNOD-DFATを移植治療した個体では生存期間が長い傾向が認められた。DFATの治療効果の要因を検討するため、胎児組織由来MSCを用いて細胞性免疫抑制の検討を行った。臍帯由来MSCでは細胞濃度依存的にリンパ球増殖を抑制し、免疫制御関連因子の発現が増加していた。以上より、NOD-DFATは免疫制御能を持ち、1型糖尿病の新たな治療法になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined efficient induction of mice adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells, which were prepared from mature adipose tissue of nonobese diabetic (NOD) mice with autoimmune type 1 diabetes. The results showed that DFAT cells prepared from NOD (NOD-DFAT) expressed same surface markers as Mesenchymal stem cells (MSC). Mice treated with NOD-DFAT cells increased their lifespan, as compared with untreated mice. MSC from human umbilical cords showed dose-dependent effect of inhibition of T cell proliferation and mRNA expression of several immunosuppressive factors. These results suggest that DFAT cells may be an attractive new immunosuppressive therapy source for cell-based therapy in young patients with type 1 diabetes.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 1型糖尿病 免疫抑制療法

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は遺伝素因に環境因子などが加わり、自己免疫機序により膵細胞が破壊されインスリンの絶対的欠乏が生じて発症する疾患である。10~12歳をピークとした小児期に発症し、わが国での新規発症は10万人に2人弱、総患者数は約5千人と推定される。

生活習慣病である2型糖尿病と比較し非常に少ないが、2型糖尿病とは異なり膵細胞におけるインスリンの産生は発症直後からほぼ皆無となるため、膨大な生涯医療費を必要とし、患児やその家族は数十年もわたる生涯の療養生活を強いられる。さらに、罹病期間が長期にわたるため、網膜症や腎症など合併症の発症も多く、女兒においては、成人後の妊娠・出産の問題などもある。治療は生涯にわたり全例インスリン自己注射を行うが、煩雑で低血糖などの副作用もあり患者の生活の質は大幅に低下する。そのため、1型糖尿病のインスリン以外の治療法として膵島移植などが試みられているが、ドナー不足や移植後の拒絶の問題があり、さらに移植後の膵島が再び自己免疫機序により破壊される例もあり実用化には遠い。1型糖尿病の発症にはT細胞の制御異常などの自己免疫機序が関与するため、ステロイドなどの免疫抑制療法、自己反応性T細胞の抑制効果をもつCD3抗体治療や骨髄移植によるなど免疫調節療法も試みられているが、薬剤副作用や効果が短いことなどの問題があり、骨髄移植は1回のみでの治療しか行えず永続的な効果は望めない。

最近、骨髄間葉系幹細胞(MSC)による免疫抑制療法が考えられ、様々な自己免疫疾患に試用されはじめており、ヒト1型糖尿病に対する移植でも一定の効果が認められたとの報告がある。しかし、糖尿病を発症した時点では、すでに細胞の80%は破壊されているとされ、発症後いかに迅速に免疫抑制療法を開始できるかが残存膵細胞温存による治療効果を左右するが、MSCは骨髄中にごく微量に存在する幹細胞であるため、移植に必要な細胞数を確保するには多量の骨髄の採取または長い培養期間を必要とし、これでは対象患者の多くが小児である1型糖尿病の発症直後の治療に用いるのは困難である。脂肪など他の組織からのMSCを用いる手段も考えられるが、これらにはさまざまな細胞群が含まれるため、移植による効果の機序を詳細に検討することは難しく、予想外の細胞への分化の危険性などが否定できない。臍帯由来MSCなどの自己組織以外のMSCを用いた他家移植もあるが、感染や拒絶の問題が残る。

我々の研究グループでは、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することによって得られる細胞群(脱分化脂肪細胞: dedifferentiated fat cells, DFAT)がMSCに類似した高い増殖能と多

分化能を獲得することを明らかにした。さらには、心筋梗塞において血行改善作用を示すこと、脊髄損傷に対して機能改善を示すこと、臍帯血移植時に骨髄微小環境改善による生着促進機能を示すことを明らかにし、細胞治療源としてMSC以上に有用であることを証明している。DFATは成熟脂肪細胞から高効率(約40%)に産生されるため、非常に少ない脂肪組織量からわずか2週間で必要細胞数を調整でき、体重の少ない小児でも迅速な治療開始が可能であり、1型糖尿病小児の発症初期における免疫抑制療法に非常に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

前述のように、DFATは少量の脂肪組織からドナー年齢に関係なく迅速に大量培養調整が可能のため、体重の少ない小児においても1型糖尿病の発症直後の免疫抑制療法が可能となる。本研究は、1型糖尿病に対する新しい細胞治療の開発を行い、その予後改善をめざすものである。

3. 研究の方法

(1) 1型糖尿病モデルマウス

NOD/Shi Jic マウス(雌性8週齢)は、日本クレア(Tokyo, Japan)から購入し、日本大学医学部動物実験委員会の指針に従って実験を行った。動物実験は、日本大学動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号AP12M034)。

10週齢から毎週1回午前中に体重測定及び血糖値を測定した。血糖測定は尾静脈から1µl採血し、ワンタッチウルトラTMおよびLFS クイックセンサー[®](Johnson & Johnson Co., New Brunswick, NJ)を用いて行った。血糖値150mg/dlを超えたときを糖尿病発症と判断した。

(2) マウスDFATの調整および培養

マウス脂肪組織から脂肪細胞の単離は杉原らの方法を改変して行なった。NOD/Shi Jic マウスの皮下脂肪約1gを細切し、0.1%(w/v) コラゲナーゼ溶液(Koken, Tokyo, Japan)を用いて37℃、1時間処理し、細胞を単離した。次いで、孔径250µmのフィルターで未消化組織を濾過し、135 x gで3分間遠心分離した。浮遊層(成熟脂肪細胞分画)を採取し、Phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄を行ない、再度135 x gで3分間遠心分離した。遠心分離後、採取した成熟脂肪細胞を、20%ウシ胎児血清(Fetal bovine serum: FBS, JRH Bioscience, Lenexa KS, Lot 6G2146)含有DFAT調製用基礎培地(CSTI303-MSC,細胞科学研究所(株))で完全に満たしたT-25細胞培養用フラスコ(NUNC)に5 x 10⁴を導入し、37℃、5%CO₂条件下で培養を行った。培養7日後、培養液を交換し、細胞付着面が底になるようにフラスコを反転させ、培養を継続した。増殖培地

は 20%FBS 含有 CSTI303-MSD を用い、3-4 日毎に継代を行った。実験には P5 までの細胞を用いた。

(3) 胎児付属物由来 MSC の調整および培養

ヒト胎盤、臍帯は日本大学医学部附属板橋病院にて、正期産に予定帝王切開を施行した妊婦より採取した。検体は、事前に妊婦からインフォームドコンセントを得た後に、出産後廃棄予定の胎盤および臍帯の一部を採取した。ヒト胎児付属物を用いた全ての実験は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究審査委員会の承認を得て実施した。

胎児付属物由来 MSC はいずれも多分化能が確認され、幹細胞であることが文献報告されており、それと同様に MSC を調整した。胎盤羊膜は機械的に上皮と間質に分離し細切し、それぞれ 10ng/ml dispase (Sigma-Aldrich) と 0.1% collagenase type (Sigma-Aldrich) にて 37 で酵素処理を行った後、10%FBS 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) にて 2~3 週間培養した。臍帯は機械的に血管を除去した後、ワルトンジェリーをメスにて細切しディッシュに貼り付ける Explant 法にて、10%FBS 含有 DMEM で 2~3 週間培養し MSC を調製した。いずれも 80%コンフルエント以上で 0.05% Trypsin-EDTA (Invitrogen) で培養皿から剥離し、回収した細胞を継代し、5 継代(P-5)以内に実験に用いた。

羊膜上皮由来 MSC (以下 AEC)、羊膜間質由来 MSC (以下 AMC)、臍帯ワルトンジェリー由来 MSC (WJ-MSD) の 3 種類の MSC を調製し検討を行った。

(4) フローサイトメーター

NOD-DFAT を 0.2% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 添加 PBS に懸濁し、 $5 \times 10^5/200 \mu\text{l}/\text{tube}$ に調整した。非特異的結合を阻害するため、 $20 \mu\text{l}$ の正常ウサギ血清(Funakoshi, Tokyo, Japan)を添加し、10 分間室温で静置した。0.2%BSA 添加 PBS を用いて細胞を洗浄した後、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス CD90、Phycoerythrin (PE) 標識抗マウス CD11b、CD73、CD105 (以上 BD Biosciences, San Jose, CA) を $1 \mu\text{l}$ 添加し 30 分間暗所で冷置した。陰性コントロールとして FITC 標識または PE 標識 Rat IgG₁ 抗体 (BD Biosciences) を用いて同様の処理を行った。反応させた細胞を洗浄後、再び 0.2%BSA 添加 PBS で懸濁しメッシュフィルターを通して 5ml FACS チューブ (BD Falcon, Franklin Lake, NJ) に移した。死細胞を検出するために各チューブ 7-aminoactinomycin D (7AAD, BD Biosciences) を $5 \mu\text{l}$ ずつ添加した。FACSCalibur フローサイトメーター (Becton Dickinson, Bedford, MA) を用いて細胞表面

抗原の測定を行い、CellQuest ソフトウェア (Becton Dickinson) を用いて測定結果の解析を行った。

(5) 1 型糖尿病モデルマウスに対する DFAT 移植

計 4 匹の NOD/Shi Jic マウスをランダムに 2 群 (DFAT 治療群 $n=2$ 、コントロール群 $n=2$) に分け、血糖値が 150mg/dl を超えたときに、それぞれ NOD-DFAT ($5 \times 10^5/300 \mu\text{l}$ 乳酸加リンゲル液)、または乳酸加リンゲル液 ($300 \mu\text{l}$) を尾静脈より投与した。投与後 1 週間毎に体重測定およびマウス尾静脈から $1 \mu\text{l}$ 採血し、ワンタッチウルトラTM および LFS クイックセンサー[®] で血糖値を測定した。

(6) MSC における T リンパ球増殖抑制能の評価

Mitomycin C 処理を行った同一ドナー由来 AEC, AMC, WJ-MSD を 24well プレートに 2.5×10^3 , 2.5×10^4 , 5×10^4 ずつ播種し、10% FBS 含有 DMEM、37、5%CO₂ 下で培養した。コントロールとして Lonza 社から購入した Fibroblast 株を用いた。12 時間後培養液を除去し、末梢血単核球 2.5×10^5 を播種し、ヒト CD3 Dynabeads、ヒト CD28 Dynabeads (以上 Miltenyi Biotec)、30U/l ヒト IL-2 (Wako) 10%FBS を RPMI1640 (GIBCO) に添加した培養液で 4 日間共培養した。細胞を回収し、CFSE Cell Division Assay Kit (Funakoshi) を用いて FACS Caliber により細胞分裂を測定した。解析には、CELL Quest を用いた。

(7) MSC における免疫抑制関連因子発現の評価

AEC, AMC, WJ-MSD ($2 \times 10^4/\text{ml}$) を 10 cm プラスチックディッシュに播種し、80%コンフルエントに達した時点で、ヒトリコンビナント TNF (Sigma-Aldrich) 10 ng/ml もしくはヒトリコンビナント IFN (Sigma-Aldrich) 150 U/ml (7.5 ng/ml 相当) を添加した培地に交換し 37、5%CO₂ 条件下で 72 時間刺激した。

mRNA 発現変化は、TaqMan[®] gene expression assay (Life Technologies) を用いたリアルタイム reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR 法にて解析した。細胞を培地吸引後に PBS で 2 回洗浄し、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA ($100 \text{ng}/\mu\text{l}$) を、High Capacity cDNA reverse Transcription Kit (Life Technologies) を用いて逆転写反応を行い、T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, California, USA) で cDNA を得た。得られた cDNA を鋳型とした PCR 反応は 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、50 2 分、95 10 分で加温後、95 15 秒と

60 1 分を 40 サイクル行った。すべてのサンプルの cDNA 量は 20 ng に統一し、PCR 反応液として TaqMan® Universal Master Mix, no UNG (Applied Biosystems) を用いた。解析遺伝子として以下のプライマープローブ (Applied Biosystems) を使用した。Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2, Hs00153133_m1)、HGF (Hs00300159_m1)、IDO1 (Hs00984148_m1)。遺伝子発現の比較は、human 18S リボソーム RNA (Hs99999901_s1) に対する相対的定量解析法 (comparative Ct 法) によって行った。

(8) 統計処理

実験データは mean ± SD で示し、リアルタイム RT-PCR の遺伝子発現レベルとフローサイトメーター解析による Proliferation index の多群間比較は、One-way analysis of variance (ANOVA) もしくは Kruskal-Wallis にて H 検定を行った後、Post-hoc 検定として Tukey's multiple comparison test を行い評価した。p < 0.05 を有意水準とし、統計解析は StatMate IV ソフトウェア (version 4.01) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 1 型糖尿病モデルマウス DFAT の *n vitro* における機能解析

1 型糖尿病モデルマウス (NOD) 由来脱分化脂肪細胞 (NOD-DFAT) の作成と解析を行った。NOD-DFAT は P2-P3 までは活発な増殖がみられるが、その後は成長停止し長期大量の培養は困難であった。培養可能期間は糖尿病発症の有無や年齢によつての相違はなく、ヒト脂肪細胞由来ではみられない現象であるため、マウス特有の問題と考えられた。

P2 における細胞表面抗原の解析を行った (図 1)。既報の MSC 同様に CD11b は陰性、CD73、CD105 は陽性であったが CD90 は陰性であった。CD73 発現は、DM 発症群は非発症群に対して高い傾向がみとめられた。

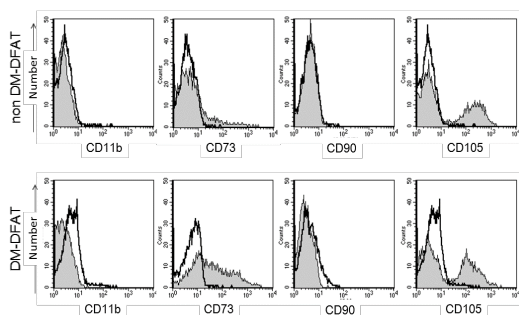


図 1. NOD-DFAT の細胞表面抗原プロファイル (non-DM DFAT: 糖尿病非発症群、DM-DFAT: 糖尿病発症群。太線: Isotype Control)

(2) 1 型糖尿病モデルマウスに対する DFAT 移植の効果

NOD に対する DFAT による治療効果を検討した。10 週以降、毎週血糖値を測定し、BS 150mg/dl を超えたものを糖尿病発症と判断した。150mg/dl を超えた後に血糖値が再度低下し自然治癒した個体はみられなかった。発症 1 週間以内に、 5×10^5 の NOD-DFAT を乳酸加リンゲル液 0.3ml に浮遊し、尾静脈から経静脈投与した (DFAT 移植群)。コントロール群として、同じく発症 1 週間以内に乳酸加リンゲル液 0.3ml のみ投与したマウスを用いた。糖尿病の発症は 20-29 週で発症時血糖値は 161-314mg/dl と幅があった。DFAT 投与群は発症後 8-12 週生存したのに対し、コントロール群は 5-11 週と短い傾向であり、一定の治療効果が認められると判断できた。DFAT 群とコントロール群との比較において、血糖値の推移 (図 2A) や体重減少 (図 2B) に明らかな相違はなかった。

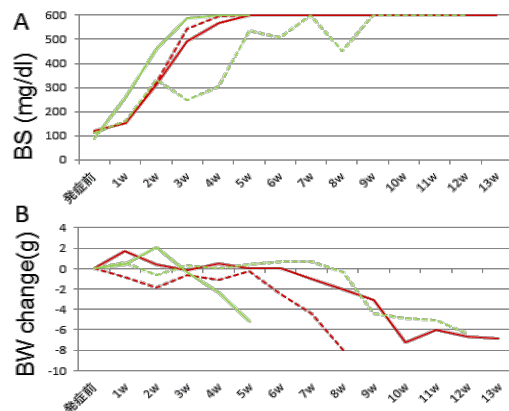


図 2. 1 型糖尿病発症マウスに対する NOD-DFAT 移植後の血糖値と体重の変化 (A: 血糖値、B: 体重減少。赤: DFAT 移植群、緑: コントロール群)

(3) MSC における細胞性免疫抑制の検討

DFAT の治療効果の要因検討のため、リンパ球増殖に与える影響と免疫制御関連因子の発現について解析を行った。当初は NOD-DFAT で検討したが長期培養が難しく、個体差が大きく安定した結果が得られなかったため、当研究室で作成している DFAT 類似の胎児付属物由来 MSC (AEC, AMC, WJ-MSC) を用いて同様の検討を行った。MSC と末梢血単核球を刺激下で共培養しリンパ球増殖を評価した。細胞濃度依存的にリンパ球コロニー数が減少する傾向が認められた (図 3A)。さらに、TNF または IFN 刺激下で MSC を刺激し免疫制御関連因子の mRNA 発現を解析した結果、WJ-MSC で PTGS2 (図 3B)、HGF (図 3C)、IDO1 (図 3D) の発現が高く、これらが治療効果に関与していると考えられた。

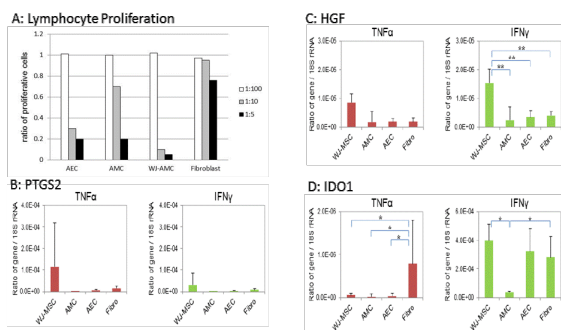


図 3. MSC における細胞性免疫抑制効果 (AEC:羊膜上皮由来 MSC、AMC: 羊膜間質由来 MSC、WJ-MSC: ワルトンジェリー由来 MSC。A:リンパ球増殖反応、B: PTGS2 mRNA 発現、C:HGF mRNA 発現、D:IDO1 mRNA 発現)

以上より、NOD-DFAT は免疫制御能を持ち、1 型糖尿病の新たな免疫抑制療法の細胞源として有用と考えられた。今後は症例数を増やした詳細な検討及び臨床化に向けての検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Tanaka R, Masuda H, Kato S, Imagawa K, Kanabuchi K, Nakashioya C, Yoshiba F, Fukui T, Ito R, Kobori M, Wada M, Asahara T, Miyasaka M. Autologous G-CSF-mobilized peripheral blood CD34⁺ cell therapy for diabetic patients with chronic nonhealing ulcer. *Cell Transplant*. 査読有、23, 2014: 167-79

鈴木 潤一、浦上 達彦、小児の治療指針 1 型糖尿病、小児科診療、査読無、77 巻 2014、604-606

浦上 達彦、1 型糖尿病のマネジメント、*Diabetes Contemporary*、査読無、1 巻、2014、60-61

麦島 秀雄、松本 太郎、藤井 里奈、谷ヶ崎 博、石毛 美夏、小林 寿美子、野呂千加子、鈴木 孝、臍帯血、臍帯組織幹細胞を用いた新規細胞治療の開発、*日本大学医学部総合医学研究所紀要*、査読無、1 巻、2013、1-7

[学会発表](計 6 件)

下澤克宜、松本太郎、大熊啓嗣、谷川俊太郎、金澤剛二、西川英里、風間智彦、谷ヶ崎博、麦島秀雄、ヒト胎児付属物由来幹細胞の免疫制御能の差異とそのメカニズムに関する検討、第 14 回日本再生医療学会、2015 年 3 月 19-21 日、パシフィコ横浜 (神奈川県、

横浜市)

大熊啓嗣、谷川俊太郎、金澤剛二、西川英里、下澤克宜、平井麻衣子、谷ヶ崎博、高橋昌里、風間智彦、松本太郎、臍帯血生着不全モデルマウスを用いたヒト胎児付属物由来幹細胞の生着促進効果の検討、第 14 回日本再生医療学会、2015 年 3 月 19-21 日、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

大熊 啓嗣、西川 英里、谷川 俊太郎、金澤 剛二、下澤 克宜、平井 麻衣子、谷ヶ崎 博、高橋 昌里、風間 智彦、松本 太郎、臍帯および胎盤羊膜から調製した間葉系幹細胞の造血細胞支持能の比較検討、第 76 回日本血液学会学術集会、2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日、大阪国際会議場 (大阪府、大阪市)

松本 太郎、風間 智彦、加野 浩一郎、脂肪細胞研究の update 脱分化脂肪細胞による再生医療、第 35 回日本肥満学会、2014 年 10 月 24-25 日、シーガイアコンベンションセンター (宮崎県、宮崎市)

下澤克宜、大熊啓嗣、河野正太、西川英里、石毛美夏、谷ヶ崎博、風間智彦、麦島秀雄、松本太郎、ヒト臍帯、胎盤組織由来幹細胞の免疫原性および免疫制御能の解析、第 13 回日本再生医療学会、2014 年 3 月 4-6 日、京都国際会館 (京都府、京都市)

風間美奈子、石毛美夏、辻孝、麦島秀雄、松本太郎、脱分化脂肪細胞 (DFAT) の臍帯血移植における造血幹細胞生着促進効果に関する検討、第 2 回日本大学幹細胞研究フォーラム、2013 年 1 月 18 日、日本大学会館 (東京都、千代田区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石毛 美夏 (ISHIGE, Mika)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 90420950

(2) 研究分担者

松本 太郎 (MATSUMOTO, Taro)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 50366580

麦島 秀雄 (MUGISHIMA, Hideo)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 80183648

浦上 達彦 (URAKAMI, Tatsuhiko)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 60223616