

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861515

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞と低酸素プレコンディショニング法を用いた血管・皮膚再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of blood vessel and skin regeneration therapy using Adipose-derived Stem Cells and hypoxic preconditioning

研究代表者

覚道 奈津子 (KAKUDO, Natsuko)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：00509490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪幹細胞(ASCs)は脂肪組織から精製される成体幹細胞で、再生医療において骨髄間葉系幹細胞に代わる幹細胞として注目されている。本研究では、脂肪幹細胞に対する低酸素の影響を検討した。脂肪組織をコラゲナーゼ処理することにより、脂肪幹細胞を得た。ASCsの細胞増殖は低酸素培養にて有意に促進した。低酸素下5～15分で、MAPキナーゼの中でも、ERK1/2のリン酸化が亢進した。HIF-1の発現も認められた。低酸素培養下にてERK阻害剤、Akt阻害剤を添加したところ、増殖活性は抑制された。低酸素培養はASCsの増殖に影響を与え、その調節機構にはERK1/2、Akt経路とHIF-1の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue-derived stem cells (ASCs) have been recently isolated from human subcutaneous adipose tissue. ASCs may be useful in regenerative medicine as an alternative to bone marrow-derived stem cells. Changes in the oxygen concentration influence physiological activities, such as stem cell proliferation. However, the effects of the oxygen concentration on ASCs remain unclear. In the present study, the effects of hypoxia on ASC proliferation were examined. Normal human adipose tissue was collected from the lower abdomen, and ASCs were prepared with collagenase treatment. ASC proliferation was significantly enhanced in the hypoxic culture and was inhibited by ERK and Akt inhibitors. Hypoxia for 5-15 minutes stimulated the phosphorylation of ERK1/2 among MAP kinases and induced HIF-1 expression.

研究分野：形成外科

キーワード：脂肪幹細胞 低酸素 増殖

1. 研究開始当初の背景

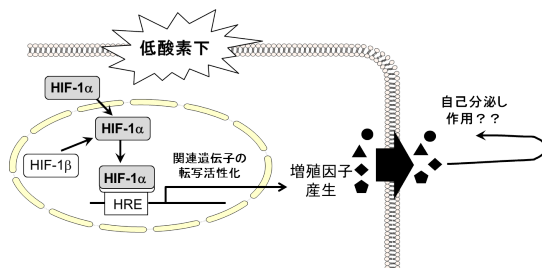
近年、脂肪組織の中に体性幹細胞が存在することが明らかになった。この脂肪幹細胞は、骨髄間葉系幹細胞と同等の性質・分化能を有し、腹部の切除・吸引脂肪より調製ができるため、簡便に侵襲少なく採取することができる。骨髄由来幹細胞に比べ採取に伴う侵襲や倫理的問題、培養時の増殖能、分化能などで優位性があるといわれており、脂肪由来幹細胞は骨髄由来幹細胞に代わる再生医療の細胞源としての関心を集めている。

その一方で、組織幹細胞を用いた治療効果は限定的で個人差が大きいことや、移植した幹細胞の生着率が非常に低いことが指摘されており、治療効果を向上させるための研究が求められている。

本研究計画は、短時間かつ簡便な脂肪幹細胞のあたらしい機能増強法として、移植前の *ex vivo* での低酸素培養(低酸素プレコンディショニング)を考案し、その組織再生能の機能促進の検討とメカニズムの解明をおこなった。

2. 研究の目的

我々は多分化能を有する間葉系幹細胞として脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived Stem Cells:ASCs) 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 ASC への影響については不明な点が多い。HIF は低酸素誘導性の転写因子で、酸素濃度が低下するにつれて漸増し、vascular endothelial growth factor (VEGF) やエリスロポエチン (EPO) をはじめとする遺伝子発現を誘導し血管新生や造血などを刺激するといわれている。近年、低酸素下では、通常酸素に比較し ASCs の増殖が促進されるという報告も散見する。一方で、ASCs は低酸素下にて VEGF, FGF-2 の蛋白産生を増加させることが報告されている。そこで今回、低酸素培養における ASC の増殖効果と、その機序について検討をおこなった。



3. 研究の方法

脂肪幹細胞を低酸素下で培養し、増殖能・分化能・遊走能、血管新生関連増殖因子の産生能の変化とその HIF, Akt, ERK1/2, p38 シグナル伝達経路の関与について検討する。

研究方法：手術の余剰組織から得られた 1g 前後のヒト脂肪組織を採取後、十分に洗浄し、

コラゲナーゼタイプにて 40 分 40 にて震盪させ、組織を消化する。消化終了後、基礎培地を加えて 1,600rpm 3min にて遠心処理を行い、下部に沈殿した細胞ペレットを新しい基礎培地の入った遠心管に移して攪拌し、3 回洗浄したのち脂肪幹細胞を得る。なお、この方法で得た脂肪幹細胞は、骨・軟骨・脂肪へ分化する、多分化能を有することが明らかになっている。

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 を調整した。低酸素下 (1%)、通常酸素下 (20%) にて培養を行い、ERK1/2 阻害剤 (PD98059) 存在下・非存在下での細胞増殖度を検討した。細胞増殖度は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, USA) を用い、DNA 合成量は DNA・IdU Labeling and Detection Kit (Takara Bio, Otsu, Japan) を使用した。低酸素培養における HIF-1 の発現と MAP キナーゼのリン酸化を Western blot 法で測定した。また、低酸素下 (1%)、通常酸素下 (20%) での VEGF と FGF-2 の mRNA の発現と産生量をそれぞれ Real-time RT-PCR を用いて測定した。それぞれの増殖因子が ASCs に与える増殖効果を検討した。

4. 研究成果

ASCs の細胞増殖は低酸素培養にて有意に促進し、その増殖効果は ERK 阻害剤の添加で抑制された。低酸素下 5~15 分で、MAP キナーゼの中でも ERK1/2 のリン酸化が亢進し、HIF-1 の発現も認められた。低酸素培養下で ASCs における VEGF と FGF-2 の mRNA 発現と産生量は有意に促進したが、両者のうちで ASCs の増殖に影響を与えたのは FGF-2 であった。低酸素培養により ASCs の増殖は促進し、その調節機構には FGF-2 産生と ERK1/2 経路の関与が示唆された。

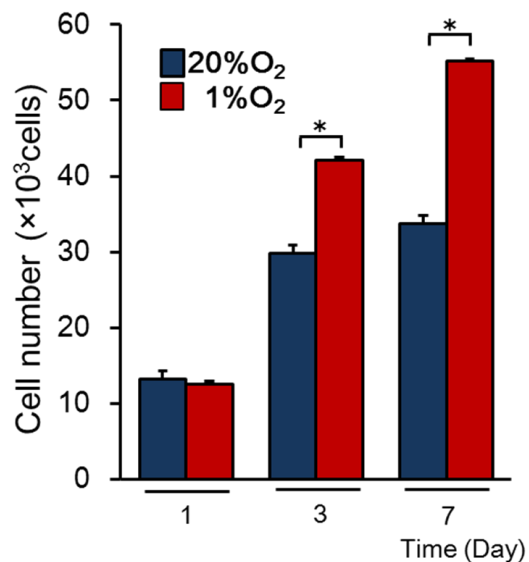
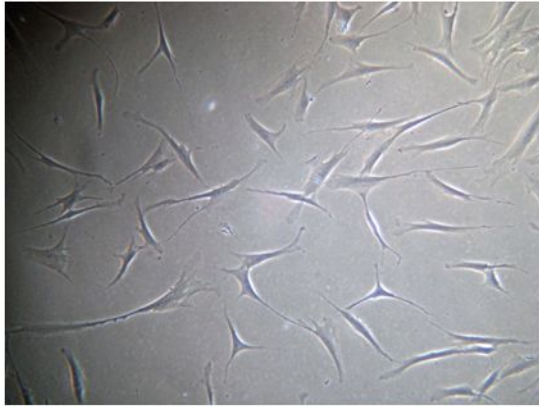
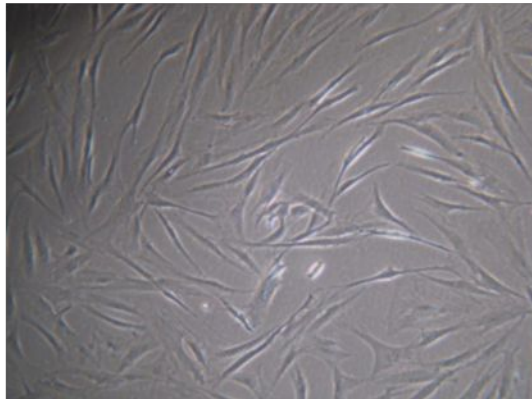


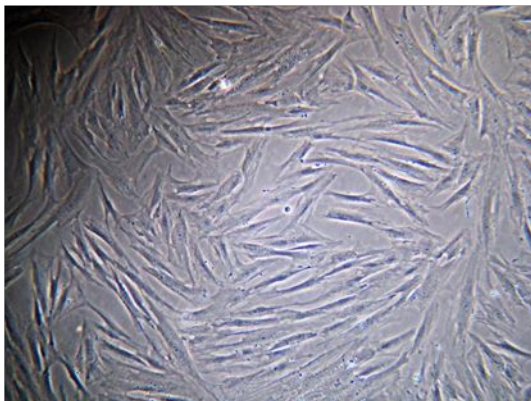
図1 低酸素培養の増殖促進効果



脂肪幹細胞



通常酸素培養 (36時間)



低酸素培養(36時間)

細胞の数が増加している

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 2件)

覚道奈津子, 森本尚樹, 尾川武史, Lai Fangyuan, 楠本健司、脂肪幹細胞を用

いた脂肪組織再生療法、*BIO Clinica*、
査読有、31(10)、2016、66-69

Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, Taketani S, Kusumoto K, 脂肪幹細胞を用いた脂肪組織再生療法、*PLOS ONE*、
査読有、10(10)、2015、Article No. e0139890

〔学会発表〕(計 3件)

1. 覚道奈津子, 森本尚樹, 楠本健司、脂肪由来幹細胞を用いた脂肪再生の現状と展望、第24回日本形成外科学会基礎学術集会(盛岡市)2015年10月

2. 覚道奈津子, 森本尚樹, 尾川武史, 楠本健司、低酸素培養における脂肪組織由来幹細胞の増殖効果、第14回日本再生医療学会総会(横浜市)2015年3月

3. 覚道奈津子, 森本尚樹, 尾川武史, 原朋也, 小倉常敬, 楠本健司、ヒト脂肪幹細胞における低酸素下でのFGF-2産生の制御、第23回日本形成外科学会基礎学術集会(松本市)2014年10月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
特記すべきことなし

6. 研究組織

(1)研究代表者

覚道 奈津子 (KAKUDO, Natsuko)

関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：00509490