様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ９ 月 ２４ 日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2012～2014
課題番号：２４６１５００２

研究課題名（和文）機能性間葉系幹細胞の単離とその機能解析

研究課題名（英文）Characterization of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

研究代表者
大根田　修（OHNEDA, OSAMU）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：３０３１１８７２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,300,000円

研究成果の概要（和文）：創傷治癒に、組織に存在する間葉系幹細胞(MSC)が関与している。糖尿病患者は、健常者と比べ創傷治癒能低下が指摘されており、本研究では、健常人脂肪組織由来MSC(nAT-MSC)と糖尿病患者脂肪組織由来MSC(dAT-MSC)の比較解析を行った。nAT-MSC及びdAT-MSCは、細胞形態・細胞表面マーカーに差は認められなかった。分化能において、dAT-MSCは、nAT-MSCと比べ、脂肪分化が促進されることが分かった。dAT-MSCは、低酸素条件下で培養した時においてのみ、過剰な細胞接着性が観察された。接着因子発現解析により、dAT-MSCにおいて有意にCYR61の発現上昇が見られた。

研究成果の概要（英文）：It has been demonstrated that adipose tissue-resident MSC (mesenchymal stem cell) from diabetic donors (dAT-MSC) had different gene expression profiles. Therefore, this study elucidate the characteristics of dAT-MSC under normoxic and hypoxic condition and the in vivo wound healing in mouse model for the future application of dAT-MSC in stem cell therapy.
In this report, we found dAT-MSC have impaired wound healing ability, as shown through tissue analysis of an ischemic flap mouse model. Notably, dAT-MSC exhibited impaired cell adhesion under hypoxic conditions. AT-MSC had impaired cell adhesion under hypoxic conditions caused by many adhesion molecules including CYR61. We also found hypoxic inducible factor-2α (HIF-2α), was highly expressed in dAT-MSC under hypoxic conditions. Collectively, HIF might have an important role that causes diabetic complications. These information would be very useful to apply for clinical therapy using stem cells in future.

研究分野：再生医学

キーワード：幹細胞　間葉系幹細胞　サブタイプ

１．研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は骨髄・臍帯血・胎盤・脂肪組織・歯髄などさまざまな組織に存在しており、骨・軟骨・脂肪組織に分化する細胞と定義されているが、それだけにとどまらず、血管壁や肝細胞などにも分化する能力を秘めた再生医療に非常に有用な細胞である。

創傷治癒の際に、組織に存在する間葉系幹細胞(MSC)が関与していることが報告されている。糖尿病患者は、健常者と比べ創傷治癒能低下が報告されており、その理由の一つとして健常者とは異なる MSC の性質が上げられるが、その分子機能は未だ十分に解明されていない。

２．研究の目的

本研究では、健常人脂肪組織由来MSC(nAT-MSC)と糖尿病患者脂肪組織由来MSC(dAT-MSC)をそれぞれ単離して、その機能について比較解析することにより、異なる創傷治癒能に関係する分子を明らかとすることを目的とする。

３．研究の方法

筑波大学医の倫理員会の下、インフォームドコンセントが得られた患者さんより、手術時に廃棄する脂肪をいただき、以下の研究に用いた。

１）脂肪組織を細切した後、コラゲナーゼ処理を行い、遠心分離により成熟脂肪組織を取り除き、IMDM + 10% FBS を基礎培地として用い、L-glutamine 20 μg/mL 及び 10 ng/mL basic-FGF を添加した。培養は、37℃, 5% CO_2 条件下で行った。低酸素条件下の培養は、5% 酸素濃度下で実施した。

２）MSC を $5x10^4$ 個/35 mm 培養皿の濃度で播種し、24 時間ごとにトリプシンにより細胞を単離し、トリパンブルーを用いて生細胞数を血算板にて計測した。

３）1 well あたり 5×10^4 個の MSC を 4-well plate へ播種した。細胞をコンフルエントまで増殖させた後、脂肪分化誘導培地（IMDM / 10% FBS / 0.1 μM Dexamethasone / 2 mg/mL Insulin / 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine / 0.1mM Indomethacine）に切り替えた。培地は 3 日ごとに全量交換し、分化誘導後 30、45 日目に 10% ホルマリン液 / PBS で細胞を固定し、Oil red O 染色液で染色した。

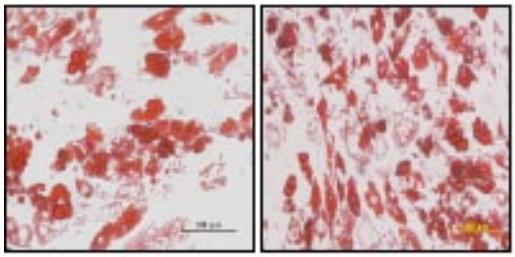
脂溶性のアゾ色素である Oil red O 染色液により細胞質中に蓄積された脂肪滴を可視化することで、脂肪細胞への分化能を評価した。さらに、4% IGEPALCA-630/ 2-propanol を加え、分光光度計を用いて波長 492 nm での吸光度を測定した。

４）MSC を $5x10^4$ 個/35 mm 培養皿の濃度で播種し、7 日目に細胞を単離した。mRNA を精製し、RT-PCR キットを用いて cDNA を作成した後、PCR 反応を行った。

４．研究成果

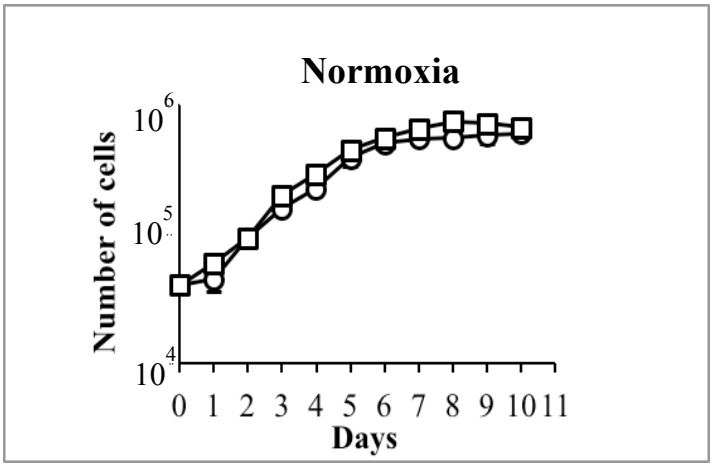
１）脂肪分化（Oil red O 染色）

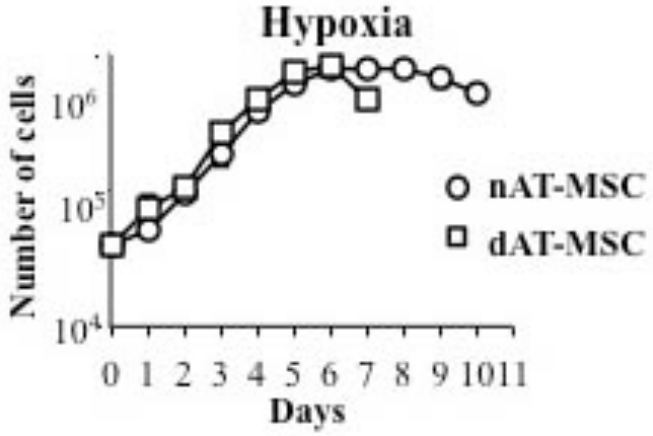
nAT-MSC　　dAT-MSC



共に脂肪への分化を認め、分化能に対する有意差は認められなかった。

２）増殖能





$5x10^4$ 個／dish の密度で細胞播種し、正常酸素条件下(20%)ならびに低酸素条件下(5%)で培養を行い、毎日 Trypsin/EDTA を用いて細胞を単離し、トリパンブルー染色を行い、

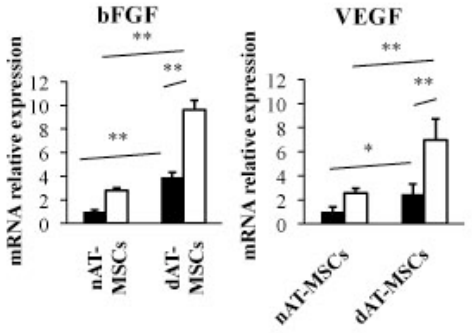
生細胞数の計測を行った。

増殖能において両者間で差は認めなかった。しかし、細胞播種後７日目において、低酸酸素下(5% O_2)で培養を行っていた dAT-MSC において、細胞間同士の接着性が高く、細胞数計測が不可能であった。

３）他の系列への分化能解析
MSC であることを証明する際に、脂肪のみならず、骨及び軟骨への分化能を有することを明らかにする必要がある。
各分化誘導後に、骨分化能（アリザリンレッド染色)、ならびに軟骨形成能（トルイジンブルー染色）により解析を行った。
両 MSC は、共に分化能を有し、差は見られなかった。

３）細胞表面マーカーの解析
間葉系幹細胞表面マーカーの発現解析を FACS を用いて行った。
nAT-MSC 及び dAT-MSC 間の比較解析により、CD90, CD13, CD166, CD105, CD73, HLA-ABC:陽性；CD31, CD14, CD45, CD34, HLA-DR:陰性であることが明らかとなり、両者間において有意差は認められなかった。

４）遺伝子発現解析（黒いバー：正常酸素条件下、白いバー：低酸素条件下）
①増殖因子

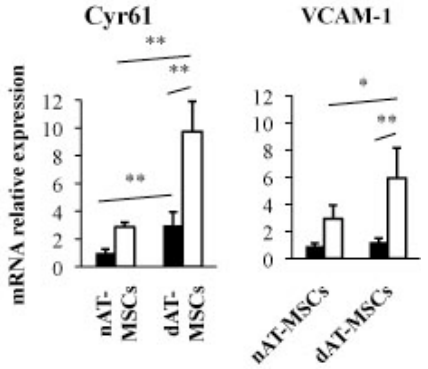


dAT-MSC において、特に低酸素条件下において、増殖因子の発現が高いことが明らかとなった。

②接着因子
先の増殖能解析により、細胞播種後７日目において、低酸素条件下培養において、dAT-MSC の細胞間接着が強固であり、Trypsin/EDTA の濃度増加ならびに処理時間延長を実施したが、細胞凝集のままで細胞数計測は不可能であった。
正常酸素条件下での dAT-MSC の細胞数計測は、細胞単離も正常通り行うことが可能であり、異常は認められなかった。

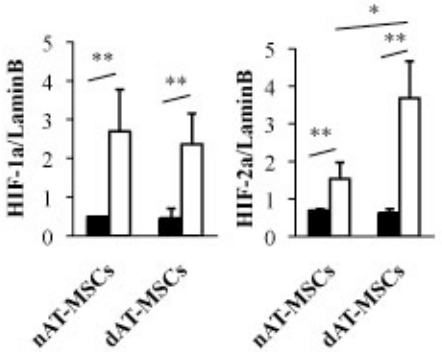
以上の結果は、低酸素刺激において、dAT-MSC 特異的に、細胞接着に関わる因子の発現誘導が行われたことを示唆している。

そこで、細胞接着に関する因子の mRNA 発現について、正常酸素条件下（白いバー）および低酸素条件下（黒いバー）での比較解析を行った。



dAT-MSC において、特に低酸素条件下において、接着因子(CyR61 および VCAM-1)の発現が高いことが明らかとなった。

５）タンパク発現解析
③低酸素応答転写因子 HIF



正常酸素条件下（黒いバー）及び低酸素条件下（5%　酸素濃度、白いバー）にて、それぞれ７日間培養し、低酸素応答転写因子（HIF-1a 及び HIF-2a）のタンパク発現解析を行った。
dAT-MSC を低酸素条件下において培養した際に、HIF-2a の発現が、nAT-MSC と比較して有意に高いことが明らかとなった。

以上のことから、dAT-MSC において、低酸素応答転写因子 HIF-2a の発現上昇により、増殖因子、接着因子の正方向への活性化が誘導されることにより、組織における創傷治癒

過程の遅延を引き起こすことが推測された。

６）動物創傷モデルの開発
　マウス背部に皮弁を作成することにより、皮弁先端（尾部に近接している箇所）が、壊死を起こすことが既に報告されている。
申請者は、マウス皮弁モデルを用い、尾部より、血管内皮前駆細胞（EPC）を注入することにより、壊死範囲を計測することにより、機能性 EPC の評価システムを確立した（Nagano, M at al. 2007 Blood）.

同様の方法を用いて（尾注）により、機能性 MSC を解析した。当該方法により、その MSC の多くは、皮弁先端部位に遊走することが不可能であることが明らかとなった。
　そこで、マウス皮弁モデル作成後、皮弁周囲に直接皮下に MSC を注入（６箇所／マウス）することにより、創傷治癒に関係する機能性 MSC の評価を行うことが明らかとなった。

　今後、どのようなメカニズムにより、HIF-2a の発現上昇が引き起こされるのかについて解析を進め、糖尿病患者さんの組織修復治療の発展につなげることを目指す。

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）
① Akimoto K, Kimura K, Nagano M, Takano S, Salazar G, Yamashita T, and Ohneda O. Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit, But Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote, Glioblastoma Multiforme Proliferation. *Stem Cells Dev.* 2013; **22**: 1-17. 査読有

②Kimura K, Nagano M, Salazar G, Yamashita T, Tsuboi I, Mishima H, Matsushita S, Sato F, Yamagata K, and Ohneda O. The role of CCL5 in the ability of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to support repair of ischemic regions. *Stem Cells Dev.* 2014; **23**: 488-501. 査読有

〔学会発表〕（計２件）
①加藤俊貴，木村健一，長野真澄，山下年晴，秋本恵子，三島初，大根田修.
「ステロイド薬投与による脂肪組織由来間葉系幹細胞への影響」、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 22 日、横浜

②秋本恵子，木村健一，長野真澄，高野晋吾，山下年晴，大根田修.「ヒト間葉系幹細胞のグリオブラストーマ増殖抑制に対する作用機構解明」、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 22 日、横浜

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）
○取得状況（計０件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.md.tsukuba.ac.jp/stemcell/paperpres.html

６．研究組織
(1)研究代表者
　大根田　修（OHNEDA,OSAMU）
筑波大学・医学医療系・教授
　研究者番号：30311872

(2)研究分担者
　山下　年晴（YAMASHITA,TOSHIHARU）
筑波大学・医学医療系・助教
　研究者番号：50400677