

4. 資料

- ① 平成 26 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果公開シンポジウム・プログラム
- ② 平成 27 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果公開シンポジウム・プログラム
- ③ 平成 28 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果公開シンポジウム・プログラム
- ④ 平成 29 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果公開シンポジウム・プログラム
- ⑤ 平成 30 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果公開シンポジウム・プログラム

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

(研究拠点を形成する研究)

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

平成 26 年度 研究成果公開シンポジウム

日時:平成 27 年 1 月 31 日(土) 9:00～14:00

場所:日本大学医学部リサーチセンター 4Fホール

プログラム

9:00～9:30 基調講演

司会: 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野 榎島 誠

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 松本 太郎

9:30～12:00 成果発表

司会: 日本大学大学院総合科学研究科生命科学 福田 昇

日本大学生産工学部応用分子化学科 野呂 知加子

①「ヒト脱分化脂肪細胞および間葉系幹細胞における骨分化・再生能の比較検討」

日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野 澤田 浩克

②「ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞と副甲状腺ホルモン投与による治療効果」

日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野 木下 豪紀

③「ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞移植による椎間板再生」

日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野 中山 洸志

④「吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析」

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 風間 智彦

⑤「外傷性脊髄損傷モデルマウスの運動機能回復に及ぼす脱分化脂肪細胞移植の影響」

日本大学生物資源科学部総合臨床獣医学研究室 山田 宏美

⑥「腎症に対する DFAT 細胞移植の効果と機序の検討」

日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野 丸山 高史

⑦「脱分化脂肪細胞を用いた iPS 細胞への誘導検討」

日本大学医学部外科学系小児外科学分野 橋本 真

⑧「ビタミン D シグナルによる成熟脂肪細胞の脱分化抑制」

日本大学医学部生体機能医学系生化学分野 石澤 通康

⑨「脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)応用した歯周組織再生の臨床応用に向けて」

日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座 秋田 大輔

⑩「脱分化脂肪細胞(DFAT)における血管新生効果の検討」

日本大学医学部小児科学系小児科学分野 渡辺 拓史

⑪「新規持続性腹圧性尿失禁モデルと脱分化脂肪細胞移植による排尿機能改善の効果」

日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野 村田 保貴

————— 昼食・休憩 (12:00～13:00) —————

13:00～14:00 教育講演

司会: 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 松本 太郎

「成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞 DFAT の発明と展望」

日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室 加野 浩一郎

脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究

松本 太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

両生類や魚類では、切断肢の再生に成熟体細胞の脱分化現象が寄与することが知られている。近年、細胞の運命を生体内で追跡できる遺伝子改変技術が開発されたことにより、マウスなどの哺乳類においても、組織障害に伴い脱分化した成熟体細胞が傷害組織の修復や再生に寄与することが明らかになっている。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体外培養することにより得られる細胞群(脱分化脂肪細胞, Dedifferentiated fat cell:DFAT)が、高い増殖能と骨髄間葉系幹細胞(MSCs)と同等の多分化能を獲得することを明らかにした(Matsumoto T, Kano K et al. J Cell Physiol. 215:210, 2008)。DFATはiPS細胞に比べ分化度が高い細胞であるため、増殖能は有限で万能性はないが、高い効率で調製が可能であり、がん化する可能性も低い。またMSCに比べ均質性が高く、ドナー年齢や基礎疾患を問わず調製できることから、実用性の高い治療用ドナー細胞となりうると考えている。DFATはMSCと同様に種々の液性因子の分泌を介して、組織修復作用、血管新生作用、免疫制御作用などを示す。このような多能性を利用して、難治性末梢動脈疾患(PAD)に対する血管新生細胞治療や難治性潰瘍に対する組織修復を期待した細胞治療などへの臨床応用を目指している。平成26年度より採択された私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」では、我々が今まで蓄積してきた研究成果を発展させ、DFATを用いた細胞治療のFirst in Man臨床研究実施を目標としている。具体的には、①治療用細胞としてのDFATの特性解析、②臨床応用に適合した細胞調整法の確立と移植安全性の検証、③DFATを用いた細胞治療の開発および前臨床試験を3本の柱として、研究を行っている。本研究プロジェクトにより、DFATの治療用細胞としての適性や多能性の分子メカニズムが明らかになると共に、DFAT細胞治療の臨床研究開始に向けた多くの知見が得られる予定である。また、重度熱傷、難治性腹圧性尿失禁、難治性骨折など種々の難治性疾患に対する細胞治療や、臍帯血造血幹細胞移植時の生着率向上・急性GVHD予防を目的とした細胞治療など、DFATを用いた新たな細胞治療の実現性が明確になることが期待される。本講演では、本プロジェクトの概要と現在までの進捗状況、期待される研究成果につき概説する。

ヒト脱分化脂肪細胞および間葉系幹細胞における骨分化・再生能の比較検討

○澤田 浩克¹⁾、風間 智彦²⁾、新井 嘉則³⁾、本田 雅規³⁾、加野 浩一郎⁴⁾、徳橋 泰明¹⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾日本大学歯学部解剖学教室Ⅱ講座、⁴⁾日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

【目的】脂肪細胞から調製される脱分化脂肪細胞 dedifferentiated fat cell (DFAT)は、MSC、ASCに類似した多分化能を有する細胞であり、骨再生能や骨密度増加作用を有することが報告されている。また骨髄中にも脂肪細胞が存在し、皮下脂肪組織と同様にDFATを調製することが可能である。しかしDFATがBM-MSCやASCと同等の骨分化能・再生能を有するか明らかになっていない。また皮下脂肪由来DFAT(SC-DFAT)と骨髄脂肪由来DFAT(BM-DFAT)の骨分化能に差異があるか明確ではない。同一ヒト由来のBM-DFAT、SC-DFAT、BM-MSC、ASCを調製し、これらの細胞の骨分化能をin vitroで明らかにすること。さらに免疫不全(SCID)マウス大腿骨骨折モデルの骨折部位にこれらの細胞を移植し、骨再生能の差異をin vivoで明らかにすること。

【方法】人工膝関節置換術を受ける患者より事前の同意を得た上で、ヒトBM-DFAT、SC-DFAT、BM-MSC、ASCを調製した。これらの細胞を骨分化誘導培地にて3週間培養した後、Alizarin Red S染色を行い、カルシウムの沈着を顕微鏡で観察した。

またSCIDマウスに大腿骨横骨折を作成し、同一ドナーから調製したBM-DFAT、SC-DFAT、ASC、BM-MSC(各 1×10^5 /個)をペプチドハイドロゲル50 μ lと混合後、骨折部に移植した(各群n=10)。ペプチドハイドロゲルのみを移植した群をControl群とした(n=10)。移植4週間後に大腿骨を摘出し、MicroCTによる骨構造解析を行い、各群の骨密度や仮骨量を評価した。

【結果】骨分化誘導実験では、BM-DFAT、BM-MSCはSC-DFAT、ASCに比べ高い骨分化能を示した。SCIDマウス大腿骨骨折モデルに対する移植実験では、骨密度はControl群に比べ、BM-MSC群、BM-DFAT群で有意($p < 0.05$)に高値であり、仮骨内と皮質骨CT値もこれらの群で高い傾向を認めた。骨折部の仮骨量は細胞移植群で少ない傾向を示し、BM-MSC群はControl群より有意($p < 0.05$)に低値を示した。

【考察】BM-MSC群、BM-DFAT群は骨折後、早期に骨リモデリングが起こり、骨折治癒が促進されることが示唆された。BM-DFATはBM-MSCと同等の高い骨再生能を有することが明らかとなり、骨折治癒促進を目的とした細胞治療のセルソースとして有望である可能性が示唆された。

成果発表②

ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞と

副甲状腺ホルモン投与による治療効果

○木下 豪紀¹⁾、風間 智彦²⁾、新井 嘉則³⁾、長岡 正宏¹⁾、徳橋 泰明¹⁾、加野 浩一郎⁴⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

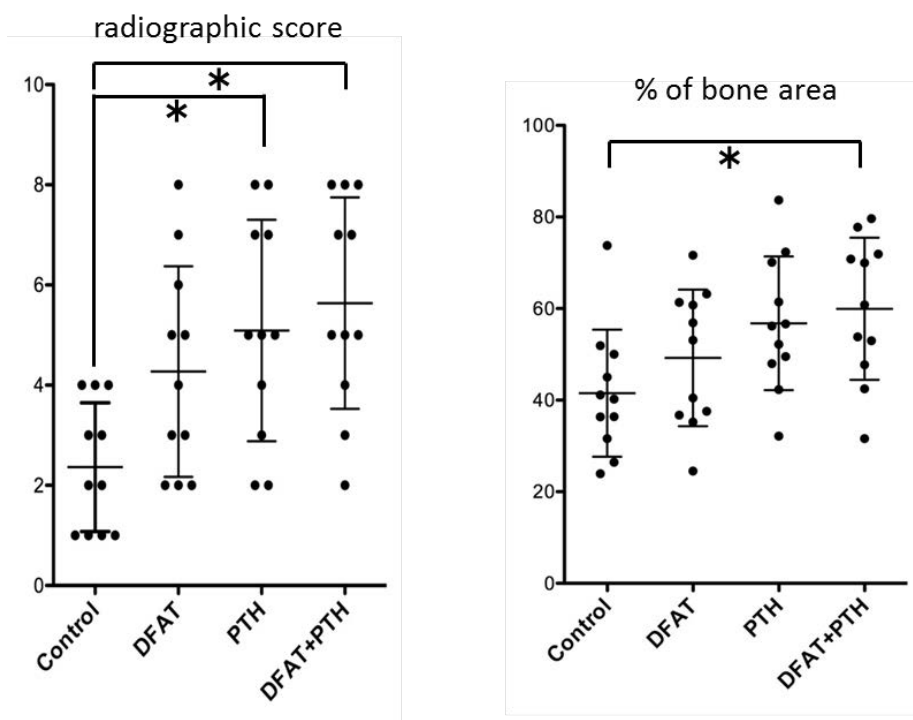
³⁾日本大学歯学部、⁴⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科

【目的】ラット骨欠損型偽関節モデルを作成し、人工骨基質(β -TCP/collagen 複合体)に播種した脱分化脂肪細胞(DFAT)を骨欠損部に移植し、さらに副甲状腺ホルモン(PTH)全身投与を併用することにより、骨折治癒が促進されるかについて検討した。

【方法】SD ラットに脛骨骨幹部に 4mm の骨欠損を作製し、①人工骨基質のみ移植する群(Control 群)、② GFP-DFAT (1×10^6)を播種した人工骨基質を移植する群(DFAT 群)、③人工骨基質を移植後、rhPTH 30 mg/kg を週 3 回、8 週間皮下注射する群(PTH 群)、④ GFP-DFAT を播種した人工骨基質を移植後、③と同様に PTH を注射する群(DFAT+PTH 群)に分け検討した(各群 n=11)。8 週間後、脛骨を摘出し、 μ CT を用いた骨構造解析や組織学的検討を行った。

【結果】Control 群に比べ、DFAT 群、PTH 群はいずれも骨癒合や皮質骨新生を促進する傾向があり、特に DFAT+PTH 群は高い治癒効果が認められた。欠損部の%Bone area および radiographic score は、Control 群に比べ DFAT+PTH 群は有意($P < 0.05$)に高値を示した。組織学的に骨欠損部における DFAT の生着が確認できた。

【結論】ラット偽関節モデルに対して、DFAT 移植と PTH 間歇投与を併用した結果、高い偽関節治癒効果が認められた。難治性骨折に対して DFAT 細胞治療と PTH 間歇投与の併用は、新たな治療戦略になりうる可能性がある。



ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞移植による椎間板再生

○中山 潤志¹⁾、風間 智彦²⁾、加野 浩一郎³⁾、徳橋 泰明¹⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

【目的】Matsumoto らは脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) が高い増殖能と間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) に類似した多分化能を有していることを明らかにした。今回、人工的に椎間板変性を生じさせたラットの椎間板に DFAT を移植し、椎間板高の定量及び変性した椎間板組織の再生能が促進されるかについて検討を行った。

【方法】体重約 300g の雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットに対し、X 線透視装置を用いて椎間板高を測定した後、椎間板組織 Co11/Co12 及び Co13/Co14 を 21G 針にて透視装置下に経皮的椎間板穿刺を行い、椎間板変性モデルを作製した。穿刺 1 週間後に Co11/Co12 及び Co13/Co14 に DFAT (5×10^4 / 50 μ l Phosphate buffered saline (PBS), DFAT 群, n=13) または同量の PBS (Control 群, n=13) を注射した。移植後、経時的に X 線撮影を行い、椎間板傷害前に対する傷害後の椎間板高の比率 (%DHI) を算出し、両群を比較した。また、移植 4 週間後、8 週間後に尾椎の切片標本を作成し、Hematoxylin & Eosin (HE) 染色、髄核細胞の特異的表面マーカーである CD24 に対する免疫染色にて組織学的評価を行った。また移植した DFAT の局在、髄核細胞への分化の有無を検討するため、SD ラット Co11/12 および Co13/14 に対し椎間板穿刺処理を行い、1 週間後に Green fluorescent protein (GFP) ラベルした DFAT (5×10^4 / 50 μ l PBS) を傷害椎間板内に注射した。移植 4、8 週後に尾椎を摘出し、凍結切片を作成した。切片は抗 GFP 抗体および抗 CD24 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、組織学的所見により椎間板細胞の再生能や増殖能について評価した。

【結果】PBS 投与群と比較して DFAT 投与群は X 線学的には椎間板高の減少が抑えられた。また、病理組織学的には両群とも髄核構造は消失し、結合組織に置き換わっている所見が認められた。DFAT 投与群の一部では椎間板辺縁に、髄核様細胞集団が認められた。GFP 標識 DFAT を傷害椎間板に移植した結果、移植 4 週間後および 8 週間後の検体において、椎間板辺縁に出現した髄核様組織には、CD24、GFP 二重陽性を示す細胞が多数認められた。

【考察および結論】変性椎間板に対する DFAT を用いた細胞移植治療は、椎間板高の変性が抑制され、DFAT の一部は髄核細胞への形質転換を生じさせることが明らかになった。これらの結果により、DFAT を用いた細胞移植治療は、椎間板再生の有効な治療となる可能性が示唆された。

吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析

○風間 智彦¹⁾、副島 一孝²⁾、加野 浩一郎³⁾、松本 太郎¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、²⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野、

³⁾日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

【目的】我々はヒトを含む哺乳類の脂肪組織から単一画分として採取した成熟脂肪細胞を、天井培養法を用いて脱分化を誘導することによって脱分化脂肪細胞(DFAT)を樹立したことを報告した。本研究では、吸引脂肪組織からDFATの調製を試み、切除脂肪組織を用いた従来の調製法ならびに調整されたそれぞれのDFATの機能を比較解析した。

【方法】当大学病院形成外科にて手術を受ける患者より吸引脂肪(約10 ml)と切除脂肪(約1 g)の提供を受け、走査電子顕微鏡にてそれぞれの組織構造を比較した。吸引脂肪から酵素処理を行わずに成熟脂肪細胞を単離し、天井培養にてDFATの調製を試みた。そして、切除脂肪から酵素処理により成熟脂肪細胞を単離する従来法とDFATの調製効率を比較した。それぞれの組織から調製したDFATは、FACSを用いて細胞表面抗原解析を行うとともに、脂肪、骨、軟骨への分化特性を比較した。

【結果】吸引脂肪組織は切除脂肪組織と比較して血管や結合組織が少なく、脂肪細胞間の接着が疎であった。吸引脂肪では酵素処理を行わずにフィルトレーションのみで成熟脂肪細胞の単離が可能であり、切除脂肪を酵素処理する従来法と同等の効率でDFATを調製することが可能であった。吸引脂肪組織由来DFATは、切除脂肪組織由来DFATと同様に間葉系幹細胞(MSC)のminimal criteriaに一致した細胞表面抗原発現プロファイルを示し、脂肪、骨、軟骨系列への多分化能を有することを明らかにした。

【結論】少量の吸引脂肪から酵素処理を行わずDFATを調製できることが明らかになった。今後、吸引脂肪組織を細胞源とするより簡便で安全性の高いDFAT調製方法の確立への進展が期待される。

外傷性脊髄損傷モデルマウスの運動機能回復に及ぼす脱分化脂肪細胞移植の影響

○山田 宏美¹⁾、伊藤 大介¹⁾、沖 嘉尚²⁾、北川 勝人¹⁾、松本 太郎³⁾、亘 敏広⁴⁾、加野 浩一郎²⁾

¹⁾日本大学生物資源科学部総合臨床獣医学研究室、²⁾日本大学生物資源科学部生体機構学研究室、

³⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、⁴⁾日本大学生物資源科学部獣医内科学研究室

【目的】我々は、成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪(dedifferentiated fat; DFAT)細胞を脊髄損傷モデルラットに移植すると、運動機能が回復することを報告した。しかし、DFAT 細胞の移植が脊髄損傷モデルにおける運動機能の回復を促進するメカニズムについては不明である。本研究では、脊髄損傷モデルマウスに移植した DFAT 細胞が運動機能回復に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、移植後における再髄鞘化とグリア瘢痕の縮小に着目して検討した。

【方法】成体雌マウス(n=22)の第 10 胸髄を椎弓切除により露出した後に、Infinite Horizon インパクト(60-kilodyne)を用いて脊髄を圧迫挫滅し脊髄損傷モデルとした。脊髄損傷モデルマウスを損傷 8 日後に無作為に DFAT 細胞区と対照区に分類し、DFAT 細胞区には Green Fluorescent Protein (GFP)トランスジェニックマウス由来の DFAT-GFP 細胞(1×10^5 cells/ 2μ l)を損傷中心部に注入した。対照区には同様に培養液(2μ l)のみを注入した。後肢の運動機能の評価は、損傷 8、9、11、14、17、22、29 および 36 日後に行った。損傷 36 日後に脊髄を採取し組織標本作製し、ルクソールファスト青(LFB)染色、免疫組織化学、ならびに HE 染色による組織学的分析を行った。組織学的分析において、再髄鞘化のため、LFB 染色、および免疫組織化学による抗ミエリン塩基性タンパク質(MBP)抗体陽性の髄鞘面積比(髄鞘面積/脊髄面積)をそれぞれ定量化した。また、グリア瘢痕の縮小の評価のため、HE 染色によるグリア瘢痕面積比(グリア瘢痕面積/脊髄面積)を定量化した。定量化した各面積比は DFAT 細胞区と対照区で比較検討した後に、運動機能回復との相関性を分析した。

【結果】DFAT 細胞区の脊髄損傷モデルマウスは、対照区と比較して後肢の運動機能が有意に改善した。損傷 36 日後における LFB および MBP 陽性の髄鞘面積比は、いずれも対照区に比べて DFAT 細胞区で有意に高かった。運動機能と LFB および MBP 陽性の髄鞘面積比における相関性を調べると、いずれも有意な正の相関を示し、それぞれの相関係数は 0.8106 および 0.7937 とほぼ一致した。また、損傷 36 日後におけるグリア瘢痕面積比は、対照区に比べて DFAT 細胞区で有意に低かった。運動機能とグリア瘢痕面積比における相関を調べると、有意な負の相関を示し、相関係数は -0.6414 であった。損傷 36 日後の運動機能と髄鞘面積比およびグリア瘢痕面積比の各相関係数を比較すると、再髄鞘化の指標である LFB および MBP の髄鞘面積比の相関係数はグリア瘢痕の縮小の指標であるグリア瘢痕面積比に比べていずれも高い値を示した。さらに、損傷 36 日後の脊髄損傷部位において、移植した DFAT 細胞が観察された。損傷した脊髄内の DFAT 細胞は、神経幹前駆細胞と成熟オリゴデンドロサイトのマーカーを発現していた。さらに、DFAT 細胞はリング状の形態で MBP を発現するとともに、ニューロンマーカー陽性の細胞を被鞘する形態を示した。また、損傷脊髄内の DFAT 細胞はニューロン、アストロサイト、および神経栄養因子のマーカーを発現することも示された。

【結論】脊髄損傷モデルマウスに移植された成熟脂肪細胞由来の DFAT 細胞は、脊髄損傷部位におけるグリア瘢痕の縮小とともに、主に再髄鞘化に寄与することにより運動機能の回復を促進することが明らかとなった。また、脊髄損傷モデルマウスに移植した DFAT 細胞は、神経系細胞へ分化転換する直接作用と、神経栄養因子を放出する間接作用の両方の作用をもつことが示唆された。

腎症に対する DFAT 細胞移植の効果と機序の検討

○丸山 高史¹⁾、福田 昇¹⁾³⁾、渡辺 めぐみ¹⁾、阿部 雅紀¹⁾、上野 高浩¹⁾、松本 太郎²⁾、遠藤 守人⁵⁾、
岡田 一義¹⁾、松本 紘一¹⁾、相馬 正義¹⁾³⁾、河内 裕⁶⁾

¹⁾ 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、²⁾ 日本大学医学部機能形態学系 細胞再生・移植医学分野

³⁾ 日本大学大学院総合科学研究科生命科学、⁴⁾ 日本大学医学部内科学系総合内科学分野

⁵⁾ 八戸大学人間健康学部人間健康学科、⁶⁾ 新潟大学医歯学総合研究科附属 腎研究施設 分子病態学分野

【目的】皮下脂肪を脱分化させたDFATは本学で開発され、間葉系幹細胞(MSC)と同等の多分化能を有し細胞移植治療の移植細胞源として期待されている。最近 MSC 移植に GVHD 等への免疫抑制作用が知られている。今回、DFAT 移植の免疫性腎炎モデルである MoAb1-22-3 誘発腎炎と非免疫性腎症であるアドリアマイシン腎症ラットに DFAT 移植を行い、腎障害に対する効果を検討した。【方法】雌性 Wistar ラットに蛍光ラベル DFAT を移植して 1 週間後に体内分布を検討した。MoAb1-22-3 誘発腎炎及びアドリアマイシン腎症ラットに腎動脈と尾静脈から 10^6 個/頭の DFAT を投与しその効果を検討した。【結果】DFAT 移植 1 週間後に腎動脈投与では DFAT は糸球体に、尾静脈投与では肺に存在していた。DFAT 移植 1 ヶ月後に MoAb1-22-3 抗体による尿蛋白量、血清 BUN、Cr 値、GIS、TIS が有意に改善、特に DFAT 全身投与する尾静脈移植でより改善していた。DFAT 移植後脾臓内の T_{reg} の割合は有意な変化を観なかった。DFAT 全身移植にて腎内 TSG-6 および TNF- α mRNA 発現は有意に上昇していた。また MoAb1-22-3 誘発腎炎において腎内の増加した IL-6 と IL-12 β を有意に抑制した。DFAT 全身投与群において移植 1 日後の血清中 TSG-6 濃度はコントロール群より有意に上昇していた。in vitro では DFAT に TNF- α を添付 1 日後、培養上清中 TSG-6 濃度は有意に上昇した。線維芽細胞でも上昇したが、添付前後共に DFAT が有意に高値であった。DFAT と SHR-SP のメサングウム細胞をトランスウエルで両者を培養した場合、TSG-6 の細胞内発現は単独培養よりも有意に亢進していた。一方アドリアマイシン腎症において移植による効果は認められなかった。【結論】MoAb1-22-3 誘発腎炎への DFAT 細胞移植治療は特に全身投与群で有効であり、移植群で体内の TSG-6 の発現が亢進していたこと、一方アドリアマイシン腎症では移植効果がなかったことや前述の in vitro の結果より間葉系幹細胞の性質を有する DFAT の TSG-6 を中心とした全身の免疫調整作用が腎不全改善の機序として考えられた。

脱分化脂肪細胞を用いた iPS 細胞への誘導検討

○橋本 真¹⁾、小沼 憲祥¹⁾、後藤 俊平¹⁾、益子 貴行¹⁾、大橋 研介¹⁾、越永 従道¹⁾、加野 浩一郎²⁾、松本 太郎³⁾

¹⁾日本大学医学部外科学系小児外科学分野、²⁾日本大学生物資源学部応用生物科学科、

³⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【背景】iPS細胞の樹立は、ヒトES細胞の研究を急速に進めるだけでなく、体細胞からの脱分化が可能であることを示した。我々は手術で破棄される成熟脂肪細胞を用いて脱分化脂肪細胞(DFAT: dedifferentiated fat cell)を開発した。DFAT は間葉系幹細胞の表面マーカーとほぼ一致したプロファイルを持ち、多分化能を持つことから前駆脂肪細胞として研究を行っている。そこで、今回はヒト DFAT から iPS 細胞への誘導を試みた。

【目的】ヒト DFAT に KLF4, c-Myc, Oct3/4, Sox2 を遺伝子導入することで iPS 細胞への誘導を行い、体細胞(線維芽細胞)と誘導効率を比較し、DFAT の有用性を検討する。

【方法】ヒト DFAT は、手術で破棄された脂肪から作製し、線維芽細胞である HDF 株、BJ 株を対照とした。初期化因子の導入は、Dynavec 社のセンダイウイルスを用いた。誘導効率は、ALP 染色で比較検討し、樹立した iPS 細胞に対して未分化マーカーの確認を行った。

【結果】ヒト DFAT を用いて iPS 細胞を誘導することが可能であった。さらに ALP 染色より、ヒト DFAT では遺伝子導入後 11 日目からコロニーが出現し、17 日目の平均コロニー数は、ヒト DFAT で 211 個(誘導効率 $211/3 \times 10^4 \doteq 0.7\%$)、HDF で 93 個(誘導効率 $93/3 \times 10^4 \doteq 0.3\%$)であった。また、ヒト DFAT から誘導した iPS 細胞は未分化マーカーである Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60 が強陽性であった。

【結論】ヒト DFAT では、HDF 株や BJ 株と比較し、iPS 細胞樹立までの期間が短かく、誘導効率が高いことが示唆された。

ビタミン D シグナルによる成熟脂肪細胞の脱分化抑制

○石澤 通康¹⁾、水島 優介^{1,2)}、風間 智彦³⁾、松本 太郎³⁾、池田 和正²⁾、槇島 誠¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野、²⁾ 日本大学生物資源科学部生命科学専攻、

³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】 リガンド依存性転写因子であるビタミン D 受容体(Vitamin D receptor ; VDR)は、生体内カルシウム恒常性維持に重要な活性型ビタミン D の受容体であり、核内受容体スーパーファミリーの一種である。核内受容体の中には iPS 細胞へのリプログラミングにおいて、山中因子の代わりにはたらく分子も報告されている。近年、活性型ビタミン D が前駆脂肪細胞の分化を促進することや、VDR 欠損マウスでは脂肪蓄積が少ないという特徴が見られるなど、ビタミン D-VDR シグナルの脂肪細胞分化への影響が示唆されている。脂肪組織より成熟脂肪細胞(mature adipocyte; MA)を単離、天井培養することで多分化能を有する脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell ; DFAT)が作製できる。しかし、胚性幹細胞や iPS 細胞に比べ、DFAT の脱分化メカニズムには不明な点が多い。本研究では、DFAT の脱分化過程におけるビタミン D-VDR シグナルの影響を検討した。

【方法】 C57BL/6J 野生型マウスの皮下脂肪より MA を単離し、天井培養することで DFAT を作製した。天井培養の際に 100nM になるように活性型ビタミン D₃(1,25D₃)を添加し、7 日後の脱分化過程の細胞数の測定と、RNA 抽出を行った。脱分化後の DFAT にも同様に活性型ビタミン D を処理し、生細胞数測定(MTT assay)、RNA 抽出を行った。次に、野生型マウス及び VDR 欠損マウスの MA を単離し、DFAT を作製した。天井培養一週間後の細胞より RNA を抽出した。抽出した RNA より RT-PCR 法にて脂肪分化マーカー、山中因子、未分化マーカーの発現評価を行った。

【結果】 1,25D₃ 添加培地では、DFAT に脱分化する細胞数が少なかった。天井培養一週間後の細胞において、脂肪細胞のマーカー分子である peroxisome proliferator activated receptor γ 2 (Ppar γ 2)、CCAAT-enhancer-binding protein α (C/ebp α)、C/ebp β の mRNA レベルは、MA に比べて減少が認められた。1,25D₃ 添加培地ではこれら脂肪細胞マーカー分子の発現減少が軽微であった。VDR 欠損マウスにおいても、天井培養一週間後で、野生型マウスと同様に脂肪分化マーカーの発現レベルが減少したが、播種する成熟脂肪細胞における脂肪分化マーカーの発現レベルは野生型よりも低かった。山中因子及び Nanog は、脱分化過程で発現減少し、活性型ビタミン D によってその減少が軽減した。VDR 欠損マウスでは、各遺伝子の発現変動がそれぞれ異なった。培養から 2 週間が過ぎると、DFAT はフラスコを反転して通常培養が可能な DFAT になる。DFAT に対して 100nM 1,25D₃ を処理し、生細胞数への影響を検討したところ、細胞増殖の抑制が示唆された。また、脂肪分化マーカー分子は、1,25D₃ 処理によって軽微な発現増加が認められた。

【結論】 本研究より、VDR は MA の DFAT への脱分化過程を抑制すること、山中因子は脱分化に必要な因子ではないことが示唆された。本研究成果は DFAT を応用した再生医療や、細胞の脱分化メカニズム解明において有用な情報となりうる。

脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)応用した歯周組織再生の臨床応用に向けて

○秋田 大輔¹⁾、加野 浩一郎²⁾、田村 瑛子³⁾、真下 貴之⁴⁾、鶴町 仁奈³⁾、新井 嘉則⁴⁾、山中 克之⁵⁾、金子 正⁵⁾、塩野目 桃子⁶⁾、月村 直樹¹⁾、松本 太郎⁷⁾、磯川 桂太郎⁸⁾、石上 友彦¹⁾、本田 雅規⁸⁾

¹⁾日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座、²⁾日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室、

³⁾日本大学歯学部歯科矯正学講座、⁴⁾日本大学歯学部、⁵⁾株式会社ジーシー研究所・生体材料開発グループ、

⁶⁾日本大学歯学部小児歯科講座、⁷⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

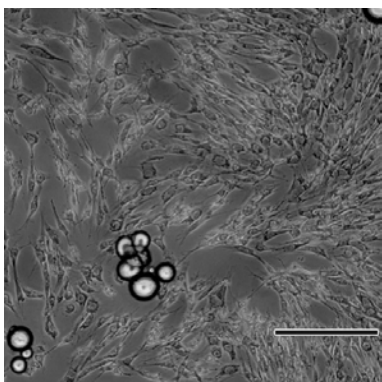
⁸⁾日本大学歯学部解剖学第Ⅱ講座

【目的】近年、歯周炎や外傷など種々の原因で破壊された歯周組織の再生に生体材料と組み合わせた間葉系幹細胞移植治療が有望視されている。歯周組織再生の移植細胞源として有用と考えられている骨髄や歯根膜由来の幹細胞は細胞の採取に制限が伴うため、口腔領域から低侵襲に採取可能で、in vitro で必要な細胞数が調整可能な細胞源が模索されている。脂肪組織中の成熟脂肪細胞分画から調整される脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)は、高い増殖能と多分化能を示すことから、ラットに作製した歯周組織欠損を応用し、DFAT 細胞の歯周組織再生能を検討した。

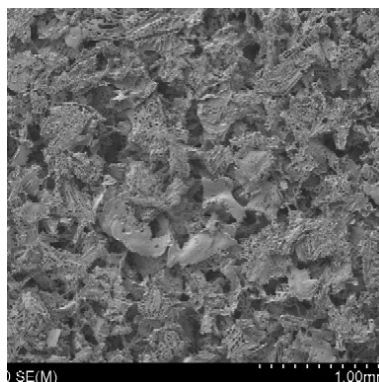
【方法】F344 ラット皮下脂肪組織を酵素処理した後に成熟脂肪細胞分画を採取し、天井培養することで DFAT 細胞を調整した。ラット左側下顎臼歯部頰側に歯周組織欠損(縦 2 mm × 横 3 mm × 深さ 1 mm)を外科的に作製し、DFAT 細胞を PLGA に播種した実験群と PLGA のみを移植した対照群に対して、micro-CT 撮影による欠損部の硬組織再生過程を検討した。また移植 5 週後の下顎骨を摘出し、第 1 臼歯中央根および遠心根部の歯周組織再生能を組織学的に評価した。さらに、蛍光標識させた DFAT 細胞を乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)ブロックに播種して歯周組織欠損部に移植し、移植 5 週間における再生組織中の細胞局在部位を解析した。

【結果】micro-CT による経日的観察から、移植を行った両群には、歯根吸収や骨性癒着することなく、欠損部の硬組織形成が認められた。定量解析の結果、移植 5 週後の実験群の硬組織再生量は対照群よりも有意に高い傾向を示した。組織学的解析から、両群において担体基質の残存と新生骨組織およびセメント質様組織の形成に加えて、再生した硬組織へのコラーゲン線維の埋入が認められた。実験群における第 1 臼歯中央根および遠心根の新生セメント質様組織上には、対照群よりも太く発達した線維束が観察された。また蛍光標識された DFAT 細胞は歯根膜組織中に多数散在しているほか、一部の細胞は新生セメント質と新生骨中に認められた。

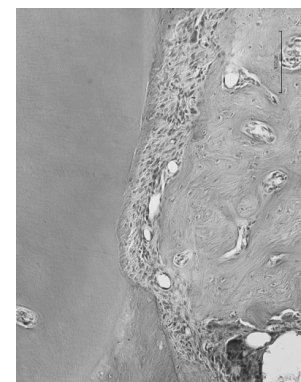
【結論】DFAT 細胞と PLGA ブロックの複合体は、歯槽骨、セメント質様組織および歯根膜様組織の再生を促進することから歯周組織再生に有用であることが示唆された。



ラット皮下脂肪由来 DFAT 細胞



PLGA ブロック SEM 像



DFAT 細胞移植後の歯周組織像

脱分化脂肪細胞(DFAT)における血管新生効果の検討

渡邊 拓史¹⁾、萩倉一博²⁾、高橋昌里¹⁾、松本太郎²⁾

¹⁾ 日本大学医学部小児科学系小児科学分野

²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

治療的血管新生において、現在は骨髄単核球細胞や間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)などの移植による細胞治療の可能性が期待され、臨床研究も開始されている。一方で、MSC とほぼ同じ細胞プロファイルを持つ脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)の血管新生メカニズムにおいて、血管内皮細胞にどのような作用を与えるかについては十分に解明されていない。本研究では、green fluorescent protein(GFP)標識 DFAT または GFP 標識脂肪組織由来幹細胞(adipose-derived stem cell: ASC)を血管内皮細胞と共培養する事により、細胞間相互作用による血管内皮細胞の遊走能や増殖能、管腔形成能の変化を比較検討した。さらに血管内皮細胞との共培養により、DFAT が血管構成細胞の1つであるペリサイトへ分化する可能性について ASC と比較して検討した。その結果、DFAT は血管内皮細胞に作用し、その細胞増殖能、遊走能、管腔形成能を促進する事が明らかになった。また、血管内皮細胞との直接および間接的共培養によりペリサイトへ分化する可能性が示唆された。一方、ASC は血管内皮細胞に対し DFAT と同等の細胞増殖能・管腔形成能を示すが、細胞遊走能は低い事が明らかになった。また、ASC のペリサイトへの分化能は、DFAT に比べ高くない事が示唆された。この結果より DFAT は治療的血管新生における有用な治療用細胞ソースとなりうる可能性があることが示された。今後、ASC と DFAT の in vivo における血管新生効果を直接比較する前臨床試験を行い、両者の治療用細胞としての有用性を評価する必要がある。

新規持続性腹圧性尿失禁モデルと脱分化脂肪細胞移植による排尿機能改善の効果

○村田 保貴¹⁾、大日方 大亮¹⁾、井門 祐一郎¹⁾、高橋 悟¹⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】ラット膀胱拡張(VD)モデルは腹圧性尿失禁の一般的なモデルであるが、可逆的であり短期間で回復するため、長期的な評価は困難である。近年両側卵巣摘除(OVX)によるラット閉経モデルを作製すると、長期的な腹圧性尿失禁が発症することが報告されている。今回 VD に OVX を併用することで、早期から評価可能な、長期的評価の出来る腹圧性尿失禁動物モデルを作成し、それを用いて括約筋障害に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)の移植効果を検討した。

【方法】実験動物は 200g 雌 SD ラットを用いた。VD は 10Fr 尿道カテーテルを腔内に挿入し、3ml 固定で 3 時間留置した。OVX は下腹正中切開し、両側卵巣を摘出した。VD、OVX 併用群(VD+OVX 群, n=12)、VD 単独施行群(VD 群, n=12)、OVX 単独施行群(OVX 群, n=12)、非処置群(Control 群, n=12)を作成した。傷害 2, 4, 6 週間後に各群 4 匹ずつ、膀胱内圧カテーテルにて Leak point pressure (LPP)を測定した後、膀胱尿道を摘出し組織学的に評価した。また、その動物モデルを用いて、DFAT 移植群(n=7)、細胞 Control として Fibroblast 群(n=7)に分け、VD+OVX 処置後尿道に各細胞を移植し、6 週間後に LPP を測定した後、膀胱尿道を摘出し組織学的に評価した。

【結果】VD 群は、Control 群に比べ 2 週目に LPP 低下を示したが、4, 6 週目には改善した。VD+OVX 群は 2 週目より低下を認め、4, 6 週目においても他群に比べ有意に低値を示した。また、6 週間後における尿道周囲組織の菲薄化は VD+OVX 群で最も顕著であった。DFAT 移植群は Fibroblast 群に比し、LPP で有意な改善を認め、同様に尿道周囲組織の菲薄化が改善された。

【結論】VD+OVX モデルは早期より傷害を認め、6 週間の LPP の低下と組織傷害が維持された。早期より評価可能な、より長期的評価ができる腹圧性尿失禁モデルであることが示唆された。この動物モデルに対し DFAT 移植より、LPP と尿道組織修復の改善効果を示した。

成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞DFATの発明と展望

加野 浩一郎

日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

イモリなどの有尾両生類では、四肢や尾を失うと損傷を受けた部位の分化細胞が脱分化し、分化転換することによって組織(器官)を再生することが知られている。一方、哺乳類では、有尾両生類のように終末分化した細胞が脱分化し、分化転換することはないと考えられている。したがって、哺乳類では損傷部位の幹細胞や前駆細胞が組織を修復すると考えられている。哺乳類における損傷部位の修復は「治癒」であり、損傷前と同一の組織を再生することはない。有尾両生類のように完全に再生する組織は、肝臓や骨格筋などに限定されており、有尾両生類のような再生機構はもたないと考えられている。この再生能力の違いは明らかではないが、多能性をもつ幹細胞および前駆細胞の量的な違いに起因すると推察されている。哺乳類の幹細胞は、組織を構成する細胞の新陳代謝を担っている。成体では、細胞の新陳代謝がゆっくりと起こるので、組織中に含まれる幹細胞の数は少なく、また幹細胞の増殖速度は前駆細胞に比べると著しく遅いことが知られている。したがって、哺乳類では組織が大きく損傷すると再生に必要な幹細胞および前駆細胞が不足することになる。一方、有尾両生類では損傷部位の分化細胞が脱分化して、増殖および多能性をもつ再生芽細胞となって集まり、再生芽を形成する。これは付加形成と呼ばれ、有尾両生類では分化細胞が脱分化することによって幹細胞や前駆細胞を大量に供給する仕組みをもつ。もし、哺乳類の終末分化した細胞においても、有尾両生類のように脱分化を誘導し、多能性細胞へと分化転換させることができれば革新的な医療技術になると考えられる。

我々は、終末分化した成熟脂肪細胞を体外培養し、自発的に脱分化させることによって、種々の分化細胞に分化転換する脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated Fat cell; DFAT)を樹立した。このことは、哺乳類の終末分化した細胞においても自発的に脱分化し、種々の細胞に分化転換する能力をもつことを強く示唆している。間葉系幹細胞を用いた再生医療は、成体の組織に僅かに存在する幹細胞を採取し、それらの幹細胞を培養して増やして移植するのが基本構想である。それに対して、我々は分化細胞を自発的に脱分化誘導し、間葉系幹細胞に類似した多能性細胞を簡便かつ大量に作製し、損傷部位に移植しようとする独自の構想に基づいた研究開発が本プロジェクトにおいて推進されている。本講演では、DFAT細胞の発明における着想から樹立に至るまでを紹介することによって、DFAT細胞の独自性の基盤となっている「脱分化と分化転換」について理解を深めてもらうとともに、今後の展望について概説し、議論したいと考えている。

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

(研究拠点を形成する研究)

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

平成 27 年度 研究成果公開シンポジウム

日時：平成 28 年 3 月 5 日(土) 10:00～15:00

場所：日本大学医学部リサーチセンター 4Fホール

プログラム

1. 開会の挨拶 (10:00~10:05)

2. 成果発表 午前の部 (10:05~12:00) 発表 12分・討論 5分

①受動喫煙ラットにおける脱分化脂肪細胞(DFAT)の静脈内投与による椎間板変性抑制効果の検討

宮方啓行、小山公行、風間智彦、徳橋泰明、松本太郎

②幹細胞移植治療のための細胞キャリアの開発

三浦大輝、松本太郎、野呂知加子

③成熟脂肪細胞の大きさの違いによる DFAT 細胞の特性の検討

鶴町仁奈、秋田大輔、松本太郎、加野浩一郎、外木守雄、磯川桂太郎、清水典佳、本田雅規

④心膜脂肪由来脱分化脂肪細胞の心筋分化能の検討

遠山一人、風間智彦、加野浩一郎、平山篤志、松本太郎

⑤脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用細胞製造と細胞治療への応用

山元智衣、風間智彦、谷口浩章、長岡悠紀、菊田晋祐、徳橋泰明、松本太郎

⑥脱分化脂肪細胞を細胞源とした iPS 細胞誘導の検討

橋本真、小沼憲祥、後藤俊平、風間智彦、加野浩一郎、益子貴行、大橋研介、越永従道、松本太郎

3. 休憩 (12:00~13:00)

4. 成果発表 午後の部 (13:00~14:00) 発表 12分・討論 5分

⑦免疫性腎炎に対する DFAT 細胞移植によつ TSG-6 を介した免疫抑制作用

丸山高史、福田昇、松本太郎、渡辺めぐみ、阿部雅紀、上野高浩、遠藤守人、岡田一義、松本紘一、相馬正義、河内裕

⑧脱分化脂肪細胞(DFAT)の血管壁細胞分化

萩倉一博、渡邊拓史、後藤俊平、小沼憲祥、松本太郎

⑨終末分化した体細胞の自発的な脱分化および多能性獲得機構の解明

～ブタ卵胞顆粒層細胞の脱分化および多能性獲得～

沖嘉尚、加野浩一郎

5. 特別講演 (14:00~15:00)

脂肪細胞の増殖と分化、およびメタボリック・シンドロームと脂肪細胞

国際医療福祉大学・病理学 杉原 甫 先生

6. 閉会の挨拶 (15:00~15:05)

受動喫煙ラットにおける脱分化脂肪細胞(DFAT)の静脈内投与による

椎間板変性抑制効果の検討

宮方 啓行¹⁾、小山 公行¹⁾、○風間 智彦²⁾、徳橋 泰明¹⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【背景】我々は成熟脂肪細胞を天井培養することにより得られる脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cell: DFAT)が高い増殖能と間葉系細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)と同等の多分化能を示すことを報告してきた。最近では腎障害ラットモデルに DFAT を静脈内投与することで TSG-6 を介した抗炎症作用を示すことが報告されている。さらに、当整形外科教室では受動喫煙ラットモデルを用いて喫煙によって椎間板変性が惹起されることを報告している。これらを踏まえ、今回我々は自動喫煙装置により椎間板変性を誘導したラットに対し DFAT を静脈内投与することで椎間板変性を抑制する可能性について検討した。

【方法】計 12 頭の SD ラット(8 週齢)を 2 群(DFAT 群または PBS 群、各群 n=6)に分け、自動喫煙装置でタバコを受動喫煙させた。DFAT 群はラット DFAT (1 × 10⁶ 個/500 μl PBS)を、PBS 群は 500 μl PBS を喫煙開始時より静脈内投与した。受動喫煙 8 週間後に両群の腰椎椎間板髓核を摘出し、プロテオグリカン量の測定と、腰椎椎間板髓核を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法にて各種グリコサミノグリカン、コラーゲン、炎症関連サイトカインの遺伝子発現を検討した。

【結果】椎間板髓核中のプロテオグリカン量は健常ラット(Control 群)に比べ喫煙ラット(PBS 群)で減少していた。DFAT 群は PBS 群に比較して髓核中のプロテオグリカン量の増加が認められた。遺伝子発現解析では、DFAT 群は PBS 群に比べ髓核の SOX9、アグリカンの有意な発現増加が認められた。

【結論】受動喫煙ラットに DFAT を静脈内投与することにより椎間板変性の進行が抑制されることが示唆された。DFAT を用いた細胞治療は、椎間板変性症に対する治療戦略となりうる可能性がある。

幹細胞移植治療のための細胞キャリアの開発

三浦 大輝¹⁾、松本 太郎²⁾、○野呂 知加子²⁾

¹⁾日本大学大学院生産工学研究科、²⁾日本大学生産工学部応用分子化学科、

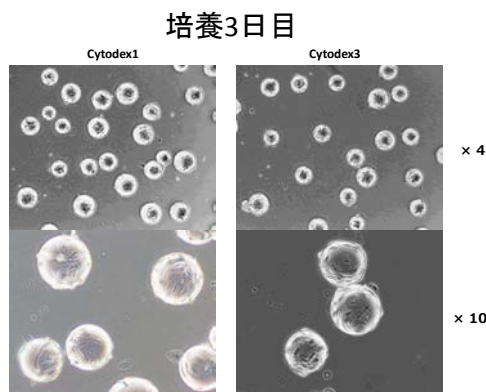
³⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell :MSC) は、自身が骨・軟骨・平滑筋・脂肪等に分化するだけでなく、組織の再生力を高める効果のあるタンパク質等を分泌することから、細胞再生移植医療の材料として注目されている。MSC を損傷部位付近に導入移植し、細胞から分泌される増殖因子等により損傷組織の再生力を高める手法はすでに検討されているが、細胞を散逸させずに導入局所に長時間留めることが重要となるため、何らかの担体に細胞を結合させて移植の方が効率的である。哺乳類の脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養法で脱分化させることによって得られる DFAT (dedifferentiated fat cell) は、MSC の持つ高い増殖能と多分化性および増殖因子等の分泌活性が備わっている。本研究では、DFAT による細胞移植治療のために、細胞培養担体(マイクロキャリア)材料の検討とその評価を行った。

Cytodex 1 および 3 (GE ヘルスケアサイエンス) 培養担体ビーズを用いた。Cytodex 1 は、表面に N-N-diethyl amino ethyl group の試薬が用いられ、軽度の正電荷を有する。Cytodex 3 は、Cytodex 1 の表面にコラーゲンがコーティングされている。Cytodex は PBS で膨潤後、PBS で洗浄し培養に使用した。DFAT 懸濁液 (2×10^5 cells/ml) 中に膨潤した Cytodex を加えて接着させた後、20~60rpm の攪拌、インキュベータ内 (37°C、CO₂ 濃度 5%) で 7 日間培養 (DMEM + 10% 牛血清 FBS + 1% PS) し、Cytodex 1 および Cytodex 3 の細胞保持能力 (核染色 Hoechst 33342)、細胞の増殖活性 (Ki67)、アポトーシスの有無 (Tunel 法) について検討した。

位相差顕微鏡観察および核染色により、Cytodex 1 および 3 上に細胞が接着していることが確認された。培養 4 日目では、増殖中の細胞に発現する Ki67 はどちらの Cytodex の場合も陽性であり Tunel は陰性であったことから、細胞が Cytodex 上で増殖していること、アポトーシスは起こっていないことが明らかになった。培養 7 日目になると、担体上の細胞数が減少しており、細胞の担体からの離脱が示唆された。この現象は Cytodex 3 よりも 1 で顕著であった。

以上の結果より、Cytodex 1 および 3 は DFAT の細胞移植治療時の担体になり得ることがわかった。担体に結合させる細胞数、担体からの細胞の離脱等について、今後さらに検討を行う。また他の担体についても同様に検討を行う。



成熟脂肪細胞の大きさの違いによるヒト DFAT 細胞の特性の検討

鶴町 仁奈¹⁾、○秋田 大輔²⁾、松本 太郎³⁾、加野 浩一郎⁴⁾、外木 守雄⁶⁾、磯川 桂太郎⁵⁾⁶⁾、清水 典佳¹⁾⁶⁾、本田 雅規⁷⁾

¹⁾日本大学歯学部歯科矯正学講座、²⁾日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座、

³⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、⁴⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科

⁵⁾日本大学歯学部解剖学第Ⅱ講座、⁶⁾日本大学歯学部総合歯学研究所、⁷⁾愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座

【目的】脂肪組織から単離できる成熟脂肪細胞を天井培養することで非対称分裂にて現われる脱分化脂肪細胞は高い増殖能と多分化能を有することが報告されている。従来、成熟脂肪細胞の大きさは約 60～100 μm と示されていたが、近年、40 μm 未満の大きさの脂肪細胞の存在も確認された。しかしながら、成熟脂肪細胞の大きさと脱分化脂肪細胞への脱分化について検討した報告はこれまでにない。そこで、本研究では、脂肪細胞の大きさに着目した脱分化脂肪細胞の特性を検討することを目的に以下の研究を計画した。

【材料および方法】ヒト頬脂肪体をコラゲナーゼ溶液で酵素処理後、遠沈管上部に浮遊した細胞画分を回収後、セルストレーナーにて 40 μm 未満と 40～100 μm の大きさの細胞画分に分取し、Adipored/Hoechst 染色にて、脂肪細胞以外の細胞が含まれていないことを確認した。次に、両大きさに分取した細胞画分を天井培養すると、線維芽細胞様細胞が観察できたので、その特性を解析するために遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞周期、骨芽細胞および脂肪細胞への分化能について検討した。

【結果および考察】40 μm 未満の成熟脂肪細胞画分から出現した脱分化脂肪細胞は、40～100 μm の成熟脂肪細胞画分から出現した脱分化脂肪細胞に比較して、CD146 陽性細胞の割合は約 2 倍高かった。また、同細胞は骨芽細胞誘導において誘導 3 および 5 日目に 40～100 μm の成熟脂肪細胞画分から出現した脱分化脂肪細胞に比較して、有意に高いアルカリフォスファターゼ活性を示し、7 日目において有意に多いカルシウム沈着量を認めた。

【結論】本研究より、40 μm 未満の成熟脂肪細胞画分からも脱分化脂肪細胞が獲得できる事が確認された。また、成熟脂肪細胞の大きさを分取し、40 μm 未満の成熟脂肪細胞画分から脱分化脂肪細胞を獲得する事で、従来よりも有意に早く骨芽細胞へ分化する脱分化脂肪細胞を獲得できる事が明らかとなった。

心膜脂肪由来脱分化脂肪細胞の心筋分化能の検討

遠山 一人¹⁾、○風間 智彦²⁾、加野 浩一郎³⁾、平山 篤志¹⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部内科学系循環器内科学分野、²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科

【目的】ブタの心膜脂肪組織、及び皮下脂肪組織から脂肪細胞を単離し、脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)を調製した。心膜脂肪由来 DFAT(Pericardial DFAT: PC-DFAT)、および皮下脂肪由来 DFAT(Subcutaneous DFAT : SC-DFAT)の分化指向性を in vitro で比較検討した。【方法】調整した PC-DFAT、及び SC-DFAT より、1. 脂肪、骨、軟骨、平滑筋への分化誘導実験、2. 新生児ラット心筋細胞との直接的、間接的共培養を行いリアルタイム RT-PCR 法での評価、3. 新生児ラット心筋細胞との直接的共培養を行い、心筋分化マーカーの免疫蛍光染色での評価、を行った。【結果】1. PC-DFAT、SC-DFAT はいずれも脂肪、骨、軟骨、平滑筋への分化誘導を認めた。2. PC-DFAT は SC-DFAT より、GATA4 の発現が有意に高かった($P < 0.01$)。SOX9、PPAR γ では SC-DFAT は PC-DFAT より高発現を認めた($p < 0.05$)。3. 心筋特異的蛋白質は PC-DFAT でより発現が強かった。また、PC-DFAT では自律的拍動が多く観察された。【考察】心膜脂肪に由来する DFAT が心筋細胞へ分化指向性があることが明らかとなった。DFAT は MSC に共通の多分化能を有するとともに採取部位に特異的な分化指向性を示すことが示唆された。

脱分化脂肪細胞 (DFAT) の臨床用細胞製造と細胞治療への応用

○山元 智衣¹⁾、風間 智彦¹⁾、谷口 浩章¹⁾、長岡 悠紀¹⁾、菊田 晋祐²⁾、徳橋 泰明²⁾、松本 太郎¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、²⁾ 日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野

我々は、JST 大学発新産業創出プログラム START 事業の一環として、ヒト脂肪細胞から脱分化脂肪細胞 DFAT の Good Manufacturing Practice (GMP) 製造方法を開発した。DFAT は MSC (間葉系幹細胞) 同様、組織を構成する細胞の活性に必要な分泌物質を効果的に分泌することで壊れた組織の自己治癒 (抗炎症) を促すと同時に体を構成する様々な組織に分化する細胞で、再生医療用の細胞技術として注目されている。現在までに、日本大学医学部リサーチセンターにあるセルプロセッシングセンターの GMP 製造施設適応への整備を行い、基礎研究で確立した方法を再生医療新法・薬事法改正成立にともなう規制・ガイドライン等に準拠したものに改良段階である。特にコストダウン、GMP 製造工程の簡略化と品質管理のしやすさを目的に、最適培養条件を整えるとともに、GMP 製造技術・品質管理技術、SOP の開発と確立、そして前臨床試験用の DFAT の GMP 製造を行っている。また、品質管理のためのマーカー開発、患者の皮下脂肪組織より低侵襲的、無菌的に脂肪組織を簡便に採取することができる DFAT 採取用キットや一貫した細胞調製システムの開発も同時に行っている。こうした安価で安全な標準化された細胞製剤の製造供給方法を開発することで、クリニック規模の病院でも特別な設備投資等をおこなうことなく、付加価値の高い細胞治療製品が提供できる可能性が考えられる。近年、国内外において再生医療等製品の臨床応用化が活発に進んでいるが、我々は日本固有の優れた再生細胞治療技術を用いた新しい細胞医薬品・サービスを提案し、ベンチャー企業の設立を目指して現在準備中である。本研究発表会においては、上記 GMP 製造技術だけではなく DFAT の細胞治療への応用のポテンシャルについて議論させていただきたい。

脱分化脂肪細胞を細胞源とした iPS 細胞誘導の検討

橋本 真¹⁾、小沼 憲祥¹⁾、後藤 俊平¹⁾、風間 智彦²⁾、加野 浩一郎³⁾、益子 貴行¹⁾、大橋 研介¹⁾、
越永 従道¹⁾、○松本 太郎²⁾

¹⁾ 日本大学医学部外科学系小児外科学分野、²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾ 日本大学生物資源学部応用生物科学科、

【目的】我々は成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞(DFAT)が MSC に類似した形質と多分化能を有することを明らかにし、細胞治療用ソースとして研究開発を行ってきた。今回、ヒト DFAT から初期化因子導入により iPS 細胞の誘導を試みた。そしてその誘導効率や形質を線維芽細胞と比較検討した。**【方法】**ヒト皮下脂肪由来 DFAT、ヒト皮膚線維芽細胞(HDF、BJ)にセンダイウイルスを用いて KLF4, c-Myc, Oct3/4, Sox2 を導入し、ALP 陽性コロニー数を経時的に計測した。また形成されたコロニーを MEF フィーダー上で継代培養し、未分化 ES 細胞マーカーの発現を免疫染色および RT-PCR 法にて検討した。**【結果】**DFAT では HDF、BJ に比べ初期化因子導入後早期より ALP 陽性コロニーの出現が認められる傾向にあった。遺伝子導入 17 日後の ALP 陽性平均コロニー数は、DFAT 211.0 (誘導効率 0.7%) であり、HDF 93.0 (0.3%)、BJ 82.8 (0.3%) に比べ 2 倍以上高値を示した。DFAT 由来 iPS コロニーは免疫染色では Nanog, Oct3/4, SSEA-3, TRA-1-60 強陽性を示し、RT-PCR 法にて検討した未分化 ES 細胞マーカー 25 因子中 19 因子の発現が認められた。**【考察】**DFAT は線維芽細胞に比べ、より効率よく iPS 細胞を調製できる細胞ソースである可能性が示唆された。

免疫性腎炎に対する DFAT 細胞移植による TSG-6 を介した免疫抑制作用

○丸山 高史¹⁾、福田 昇¹⁾³⁾、松本 太郎²⁾、渡辺 めぐみ²⁾、阿部 雅紀¹⁾、上野 高浩¹⁾、遠藤 守人⁵⁾、
岡田 一義¹⁾、松本 紘一¹⁾、相馬 正義¹⁾⁴⁾、河内 裕⁶⁾

¹⁾日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

³⁾日本大学大学院総合科学研究科生命科学、⁴⁾日本大学医学部内科学系総合内科学分野

⁵⁾八戸大学人間健康学部人間健康学科、⁶⁾新潟大学医歯学総合研究科附属腎研究施設分子病態学分野

【目的】本学で開発され間葉系幹細胞と同等の多分化能を持つ DFAT を慢性腎障害モデルラットに移植して効果を検討した。**【方法】**mAb1-22-3 誘発腎炎およびアドリアマイシン腎症に DFAT を移植、1 カ月後に効果を評価した。移植は他家移植で、その経路は腎動脈又は尾静脈から行った。**【結果】**DFAT を腎動脈から腎に直接移植した場合、移植 1 週間後の DFAT は腎糸球体の中に存在を確認したが、尾静脈から全身投与した場合、DFAT は腎臓には到達せず、殆どが肺にトラップされていて他臓器には存在を確認出来なかった。mAb1-22-3 誘発腎炎は DFAT を腎へ直接移植するより尾静脈から移植した方がより改善した。その際血清中 TSG-6 濃度は有意に上昇し、腎内 TSG-6 および TNF- α の mRNA 発現は有意に上昇、IL-6 と IL-12 β は抑制されていた。脾臓内の T_{reg} の割合は有意な変化を観なかった。in vitro で DFAT に TNF- α を添付した場合培養上清中 TSG-6 濃度は有意に上昇した。DFAT と SHR-SP のメサンギウム細胞をトランスウエルで共培養した場合、TSG-6 の細胞内発現は単独培養より亢進して培養上清中濃度も上昇していた。DFAT の TSG-6 の発現を siRNA でノックダウンした場合、腎炎改善効果が観られなくなった。また MoAb1-22-3 誘発腎炎に DFAT の細胞移植を自家移植で尾静脈から行った場合、改善効果は他家移植と同等であった。アドリアマイシン腎症では、移植効果は観られなかった。**【結論】**DFAT 移植による腎炎改善の機序の一つに TSG-6 を中心とした全身の免疫調整作用が考えられ、ANCA 関連腎炎やループス腎炎など予後不良の疾患を始め、自己免疫異常が関係することが多い種々の腎炎に臨床応用出来る可能性が示された。

脱分化脂肪細胞(DFAT)の血管壁細胞分化

○萩倉 一博¹⁾、渡邊 拓史²⁾、後藤 俊平³⁾、小沼 憲祥³⁾、松本 太郎¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、²⁾日本大学医学部小児科学系小児科学分野、

³⁾日本大学医学部外科学系小児外科学分野

【目的】Vascular sprouting から始まる血管新生過程において、壁細胞(pericyte)や血管平滑筋(vascular smooth muscle cell)などの周皮細胞(mural cell)は、血管腔の安定化や微小血管網の構築に重要な役割をしている。成熟脂肪細胞の脱分化によって得られる細胞 DFAT(Dedifferentiated Fat Cell)は、MSC、ASCと同等の多分化能を有する。マウス虚血肢への DFAT 移植では、DFAT から血管新生因子が分泌され血管新生が促進すると共に、移植した DFAT が新生血管の血管壁に接着し、 α -smooth muscle cell actin(ASMA)を発現していることを確認した。そこで今回、DFAT の血管内皮細胞への遊走能及び血管壁細胞への分化能について in vitro で検討した。【方法】1. transwell と 3D gel assay による DFAT 及び血管内皮細胞の遊走能の検討 2. 免疫染色と qPCR による NG2(壁細胞特異的マーカー)及び ASMA の発現解析 3. TGF- β 刺激および SMAD2/3 阻害における DFAT の NG2 発現解析 【結果】1. DFAT の血管内皮細胞への遊走が transwell 及び 3D gel assay で確認された。2. 血管内皮細胞と共培養した DFAT は、NG2 の発現亢進が確認された。3. DFAT の NG2 発現は TGF- β 刺激で促進し SMAD2/3 阻害で抑制された。【結論】脱分化脂肪細胞(DFAT)は血管内皮細胞へ遊走し、TGF- β によって血管周皮細胞へ分化し、新生血管の成熟化に関与する可能性が示唆された。

終末分化した体細胞の自発的な脱分化および多能性獲得機構の解明

～ブタ卵胞顆粒層細胞の脱分化および多能性獲得～

○沖 嘉尚、加野 浩一郎

日本大学生物資源科学部応用生物科学科

我々は、皮下脂肪組織から単離した脂肪細胞に外来遺伝子を導入することなく、自発的に脱分化誘導することによって、均一な増殖および多分化能力をもつ脱分化脂肪細胞(DFAT)を取得する方法を開発した。また、卵巣から単離した卵胞顆粒層細胞から DFAT と類似した特性をもつ卵胞顆粒層細胞由来の多能性前駆細胞(DFOG)の作出にも成功している。しかし、それらの終末分化した体細胞が自発的に脱分化し、多能性獲得するのかについては明らかではない。本研究では、脂肪細胞および卵胞顆粒層細胞の脱分化および多能性獲得機構の一端を明らかにする目的で行なった。

我々は脱分化前後におけるブタ脂肪細胞(AC)およびブタ卵胞顆粒層細胞(GC)をマイクロアレイ解析し、それらのデータを NCBI Gene Expression Omnibus に公開している(GSE18854)。実験Ⅰでは、異なる機能をもつ AC および GC が脱分化前後において、それぞれ特徴的な遺伝子発現プロファイルをもつのかを明らかにする目的で行なった。AC、GC、DFAT および DFOG の遺伝子発現データを階層的クラスタリングおよび主成分分析を用いて包括的に解析した結果、AC および GC は異なる遺伝子発現プロファイルを示したが、DFAT および DFOG は類似した。ついで、脱分化前後において有意に発現変動する遺伝子群を False Discovery Rate を用いて抽出し、DAVID によって機能解析を行なった。その結果、AC は脂肪酸代謝、GC は卵胞刺激ホルモンの分泌など細胞機能に特異的な遺伝子群の発現が減少し、細胞増殖、細胞接着および創傷治癒などに関連する遺伝子群が共通して増加することが明らかとなった。以上の結果から、AC および GC は体外培養することによって類似した遺伝子発現プロファイルをもつ脱分化細胞になることが明らかとなった。実験Ⅱでは、GC が体外培養過程のどのタイミングで脱分化し、多能性獲得するかを明らかにする目的でマイクロアレイ解析を行なった。階層的クラスタリングおよび主成分分析の結果、遺伝子発現プロファイルは卵胞顆粒層細胞層および単離直後の GC の間では殆ど違いがみられなかったが、単離直後から培養 1 日後に著しく変化し、その後、徐々に培養 7 日後の遺伝子発現プロファイルへと変化した。単離直後および培養 1 日後の GC 間において有意に発現変動する遺伝子群を抽出し、機能解析した結果、細胞接着または細胞形態に関連する遺伝子群が増加し、細胞周期と生殖腺発達に関連する遺伝子群が減少した。以上の結果から、GC は培養皿底面の接着が起こる培養 1 日後に脱分化することが明らかとなった。体細胞が培養皿の底面に接着すると、その刺激によってアクチンファイバーが形成され、それによって細胞形態が変化することが知られている。また、我々はアクチンファイバーの形成が細胞の遺伝子発現を直接的に制御することを明らかにしている。実験Ⅲでは、アクチンファイバーの形成が GC の脱分化を惹起するかを明らかにする目的で行なった。GC は培養 1 日後において培養皿へ接着し、一部の細胞では細胞の伸長が観察され、それに伴って、アクチンファイバーが観察された。また、アクチンファイバーは培養時間の経過に伴って増加した。GC 特異的機能であるアロマトーゼの発現を免疫蛍光染色法を用いて調べた結果、培養 1 日後に大きく減少し、2 日後には消失した。一方、アクチン重合阻害剤である Latrunculin A を添加すると、多くの GC が球状の細胞形態を示し、それらの細胞にアクチンストレスファイバーの形成は観察されなかった。また、アロマトーゼの発現は維持された。以上の結果から、GC の脱分化は培養 1 日後の細胞接着に伴うアクチンファイバーの形成によって惹起されることが示唆された。

脂肪細胞の増殖と分化、および、メタボリック・シンドロームと脂肪細胞

杉原 甫 先生

国際医療福祉大学・病理学

高邦会高木病院・病理部

ヒトで最大量をしめる白色脂肪細胞は脳以外の種々の組織に存在し、主役の細胞の増殖と分化に影響を及ぼしている。この細胞の増殖と分化を培養条件下で検討した。脂肪組織を消化すると、成熟脂肪細胞を単離できるが、液中では浮遊するので培養できない。そこで、我々は、フラスコに100%、培養液を入れて、そこに成熟脂肪細胞を入れて、フラスコの天井面に接着させて培養し得た。脂肪細胞は脱分化して紡錘形になり、活発に増殖し、再び分化した。また、コラーゲンゲルという生理的な基質内で三次元培養をした所、同様の増殖と分化を示した。これらの培養脂肪細胞は培養条件下で、表皮の増殖と分化を促進し、また、腎尿細管上皮など多くの上皮にも影響を与えた。さらに、癌細胞に対しては、多くの場合、増殖を促進させた。培養脂肪細胞の研究を日大の松本太郎先生グループは大きく発展させて、多種細胞への分化を見出された

次に、人体病理学の面から、脂肪細胞を眺めると、メタボリック・シンドロームへの関与となる。ヒトのメタボリック・シンドロームでは、低アディポネクチン血症による動脈硬化症が起こる。アディポネクチンは、動脈にアテロームができる過程を防ぐのであるが、このアディポネクチンが、太ると減るのである。何故、そのようなことが起こるのか、という機序を、メタボリック・シンドロームの際の、過度に肥大した脂肪細胞の形態から説明したい。メタボリック・シンドロームの脂肪細胞は、最密充填形という非常に密に接した形を採るために、脂肪細胞の間を走行する小血管が圧迫され、脂肪細胞を虚血に陥れるのである。虚血に陥った脂肪細胞ではアディポネクチン産生低下が起こる。これがメタボリック・シンドロームの基礎病因ではないかと考えている。また、肥満者で、小血管が圧迫されると高血圧症も引き起すことも示したい。

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
(研究拠点を形成する研究)

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

平成 28 年度 研究成果公開シンポジウム

日時:平成 29 年 3 月 11 日 (土) 10:00～15:00

場所:日本大学医学部図書館 3F 大学院ゼミナール室 1

プログラム

1. 開会の挨拶 (10:00~10:05)

2. 成果発表 午前の部 (10:05~12:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 榎嶋 誠 (日本大学医学部生体機能医学系生化学分野)

①ヒト吸引脂肪組織からの脱分化脂肪細胞の調製

風間智彦、山元智衣、風間美奈子、長岡悠紀、谷口浩章、萩倉一博、加野浩一郎、相川佳之、松本太郎

②脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用製造と細胞治療への応用

山元智衣、風間智彦、風間美奈子、長岡悠紀、大野聡子、萩倉一博、李 予昕、松本太郎

③同一ドナー由来 DFAT および ASC における血管新生因子の比較検討

長岡悠紀、風間智彦、中村隆広、松本太郎

座長: 野呂 知加子 (日本大学生産工学部応用分子化学科)

④DFAT 細胞による移植治療のための細胞キャリアの開発

三浦大輝、風間智彦、萩倉一博、松本太郎、野呂知加子

⑤ヒト頬脂肪体由来脱分化脂肪細胞調整時の酵素濃度の検討

鶴町仁奈、秋田大輔、加野浩一郎、松本太郎、鳥海 拓、風間智彦、外木守雄、沖 嘉尚、齊藤瑛子、清水典佳、本田雅規

⑥脱分化脂肪細胞(DFAT)移植による免疫性腎炎の改善効果

丸山高史、福田 昇、松本太郎、東 龍英、深澤みゆき、遠藤守人、岡田一義、河内 裕、阿部雅紀

3. 休憩 (12:00~13:00)

4. 成果発表 午後の部 (13:00~14:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 加野 浩一郎 (日本大学生物資源科学部応用生物科学科)

⑦成熟脂肪細胞の脱分化による性質変化に対するビタミン D シグナルの影響

石澤通康、風間智彦、松本太郎、榎嶋 誠

⑧培養表皮移植時の脱分化脂肪細胞(DFAT)投与による基底膜構築促進

副島一孝、樫村 勉、風間智彦、松本太郎、仲沢弘明

⑨下肢虚血モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)自家移植の有効性の検討

河野通成、河内秀臣、前田英明、田中正史、山元智衣、松本太郎

⑩脱分化脂肪細胞(DFAT)に由来するエクソソームの解析と椎間板髄核細胞に対する作用

冨塚孔明、風間智彦、徳橋泰明、松本太郎

5. 特別講演 (14:00~15:00)

座長: 松本 太郎 (日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野)

細胞ファイバ技術が拓く3次元組織形成と細胞治療への展開

東京大学生産技術研究所 教授 竹内 昌治 先生

6. 閉会の挨拶 (15:00~15:05)

ヒト吸引脂肪組織からの脱分化脂肪細胞の調製

○風間智彦¹⁾、山元智衣¹⁾、風間美奈子¹⁾、長岡悠紀¹⁾、谷口浩章¹⁾、萩倉一博¹⁾、加野浩一郎²⁾、相川佳之³⁾、松本太郎¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学、²⁾日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

³⁾湘南美容外科クリニック

【目的】我々は成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞(DFAT)が脂肪組織由来幹細胞(ASC)に類似した多能性を示すことを報告してきた。今回、ヒト吸引脂肪サンプルを用いて DFAT を調製し、調製に必要な至適組織量、細胞純度、造腫瘍性の有無などについて検討を行った。**【方法および結果】**美容目的に採取された吸引脂肪組織(約 50 ml)から、適量を分注し DFAT 調製を試みた。その結果、2ml の脂肪組織から平均 5×10^5 個の成熟脂肪細胞が単離され、培養4週間で 1×10^8 の DFAT が調製できることが明らかになった。調製された DFAT の FACS 解析では、P0~P3 まで ASC 陽性マーカー(CD73, CD90, CD105)の陽性率は 90%以上である一方、陰性マーカー(CD31, CD45, HLA-DR)の陽性率は 0.1%未満であった。これら陰性マーカーの陽性率は、同一サンプルから調製した ASC に比べて有意に低かった。In vitro 分化誘導実験にて、調製された DFAT は、脂肪、骨、軟骨への多分化能を示すことを確認した。また軟寒天コロニー形成試験や NOG マウス造腫瘍試験を行った結果、DFAT は造腫瘍性を認めなかった。**【結論】**約 2ml の吸引脂肪組織から高純度の DFAT を大量調製できることが明らかになった。調製された DFAT は造腫瘍性を認めず、ASC 同様安全に移植できることが示唆された。DFAT は低侵襲性で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞ソースとして期待できる。

脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用製造と細胞治療への応用

○山元智衣、風間智彦、風間美奈子、長岡悠紀、李 予昕、萩倉一博、大野聡子、松本太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

DFAT は間葉系幹細胞(MSC)同様、組織を構成する細胞の活性に必要な液性因子を効果的に分泌することで、組織修復作用、血管新生作用、免疫制御作用を有する細胞である。また高い増殖能を有し MSC と比べ均一性が高く、わずかな脂肪組織から大量の細胞を調整できることから、実用性の高い再生医療用細胞になり得ると期待できる。特に血管新生に関しては様々な確証が得られており、各種動物モデルを用いた実験では DFAT 移植により、虚血肢に成熟した血管の増加が確認されている。これらのことより DFAT を用いた重症下肢虚血に対する血管新生細胞治療への臨床応用を目指し、基礎研究によって確立した方法を臨床用に改良および品質管理方法を検討している。

再生医療に関しては、平成 26 年 11 月より施行された「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(再生医療等安全性確保法)により、提供計画の段階から国への届出が義務付けられている。再生医療に用いる細胞を培養する場合、特定細胞加工物の製造許可申請を行い、細胞培養加工施設ごとに厚生労働省の許可を受けなければならない。

我々は、再生医療安全性確保法に基づく培養施設として、Cell Processing Facility(CPF)の整備および CPF 内に設置されたセルプロセッシング・アイソレーターを用いた離床用ヒト DFAT 作成方法の開発を行い、施設に関しては今年度、「日本大学医学部リサーチセンター CPF」として厚生労働省より再生医療用細胞の特定細胞培養加工施設の許可認定を受け、施設番号を付与された。また、セルプロセッシング・アイソレーターを用いてヒト DFAT の大量培養が可能であることを確認した。

今後、上記 CPF においてセルプロセッシング・アイソレーターを利用した、再生医療安全性確保法下での臨床用 DFAT の製造技術の確立、標準化を行い、早期の臨床応用を目指したい。

同一ドナー由来 DFAT および ASC における血管新生因子の比較検討

○長岡悠紀¹⁾、風間智彦¹⁾、中村隆広²⁾、松本太郎¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態医学系細胞再生・移植医学分野、²⁾日本大学医学部小児科学系小児科学分野

【目的】脂肪組織から調製される脱分化細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) は、高い増殖能と間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) や脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ASC) と同等の多分化能を示すことが報告されている。また、血管新生サイトカインを分泌するため、血管新生治療の有望な細胞源として考えられている。今回は同一ヒト由来の DFAT、ASC を調製し、これらの細胞の血管新生サイトカインについて比較を行った。そしてこれらの細胞の継代数およびドナー年齢が影響するかについて検討した。

【方法】1、種々のドナー年齢 (6 ヶ月～74 歳) のヒト皮下脂肪組織 (n=5) から DFAT, ASC を調製し、その培養上清を継代 2、4、6、8 代目に採取した。各培養上清における vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), hepatocyte growth factor (HGF), stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), leptin の濃度を ELISA 法を用いて測定した。2、免疫不全 (SCID) マウス下肢虚血モデルに同一ドナー由来 DFAT, ASC を移植し、血流改善効果をレーザードップラー血流計にて測定した。

【結果】1、HGF の分泌量が ASC に比べ DFAT で高い傾向が認められ、そのほかのサイトカインについても ASC と同等の分泌量が確認された。Leptin の分泌量は高齢者で高い傾向が認められた。また、サイトカイン分泌量は継代 8 代目まで低下しないことが確認された。2、DFAT は ASC と同等の血流改善効果が認められた。

【結論】DFAT は ASC と同様の血管新生療法の効果を持ち、高齢者においても自家移植による治療効果が期待できることが示唆された。

DFAT 細胞による移植治療のための細胞キャリアの開発

○三浦大輝^{1), 2)}、 風間智彦²⁾、 萩倉一博²⁾、 松本太郎²⁾、 野呂知加子^{1), 2), 3)}

¹⁾ 日本大学大学院生産工学研究科、 ³⁾ 日本大学生産工学部応用分子化学科、

²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell :MSC) は、自身が骨・軟骨・平滑筋・脂肪等に分化するだけでなく、組織の再生力を高める効果のあるタンパク質等を分泌することから、細胞再生移植医療の材料として注目されている。MSC を損傷部位付近に導入移植し、細胞から分泌される増殖因子等により損傷組織の再生力を高める手法はすでに検討されているが、細胞を散逸させずに導入局所に長時間留めることが重要となるため、何らかの担体に細胞を結合させて移植の方が効率的である。哺乳類の脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養法で脱分化させることによって得られる DFAT (dedifferentiated fat cell) は、MSC の持つ高い増殖能と多分化性および増殖因子等の分泌活性が備わっている。本研究では、DFAT による細胞移植治療のために、細胞キャリア材料の検討とその評価を行った。

Cytodex 1 および 3 (GE ヘルスケアサイエンス) 培養担体デキストランビーズを用いた。Cytodex 1 は、表面に N-N-diethyl amino ethyl group の試薬が用いられ、軽度の正電荷を有する。Cytodex 3 は、Cytodex 1 の表面にコーゲンがコーティングされている。Cytodex は PBS で膨潤後、PBS で洗浄し培養に使用した。DFAT 懸濁液 (2×10^5 cells/ml) 中に膨潤した Cytodex を加えて接着させた後、20~60rpm の攪拌、インキュベータ内 (37°C、CO₂ 濃度 5%) で 7 日間培養 (DMEM + 10% 牛血清 FBS + 1% PS) し、Cytodex 1 および Cytodex 3 の細胞保持能力 (核染色 Hoechst 33342)、細胞の増殖活性 (Ki67)、アポトーシスの有無 (Tunel 法) について検討した。

位相差顕微鏡観察および核染色により、Cytodex 1 および 3 上に細胞が接着していることが確認された。培養 5 日目では、増殖中の細胞に発現する Ki67 はどちらの Cytodex の場合も陽性であり Tunel は陰性であったことから、細胞が Cytodex 上で増殖していること、アポトーシスは起こっていないことが明らかになった。培養 7 日目になると、担体上の細胞数が減少しており、細胞の担体からの離脱が示唆された。この現象は Cytodex 3 よりも 1 で顕著であった。以上の結果より、Cytodex 1 および 3 は DFAT の細胞移植治療時の担体になり得ることがわかった。

次に、Cytodex 上の細胞のサイトカイン遺伝子発現について、検討を行った。2 時間、1 日、2 日、4 日間培養したキャリア接着培養細胞をキャリアごと回収し、RNA を抽出した。この RNA を鋳型に cDNA を合成し、qPCR にて 5 種類の血管新生因子 (HGF, VEGF, PDGF-B, TGF- β , hbFGF) 遺伝子発現を測定した。その結果 4 種類 (VEGF, HGF, hbFGF, TGF- β) の遺伝子発現が認められたが、PDGF-B は本実験における培養環境と PCR のサイクル数では観測されなかった。これらの結果は、通常培養時における Hunam-DFAT の結果と同様の傾向であった。移植下組織中など低酸素下では、これらのサイトカインの産生が増強することが知られているので、低酸素培養下での検討がさらに必要である。

一方、生体適合性と生分解性があり、GMP グレードで製造されている PLGA (DL-乳酸-グリコール酸共重合体) ポリマープレート上で、DFAT 細胞が接着、増殖することを確認した。蛍光核染色色素 (NucRed® Live 647 ReadyProbes® Reagent, ThermoFisher) で処理し蛍光顕微鏡画像からセルカウントをしたところ、培養日数増加により細胞数が増加した。さらに、プレートをゼラチンやポリリジンでコーティング処理すると、より細胞が接着しやすくなることが分かった。

ヒト頬脂肪体由来脱分化脂肪細胞調整時の酵素濃度の検討

鶴町仁奈¹⁾、○秋田大輔²⁾、加野浩一郎³⁾、松本太郎⁴⁾、鳥海拓⁵⁾、風間智彦⁴⁾、外木守雄⁶⁾、
沖嘉尚³⁾、齊藤瑛子¹⁾、清水典佳¹⁾、本田雅規⁷⁾

¹⁾日本大学歯学部歯科矯正学講座、²⁾日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座、

³⁾日本大学生物資源科学部動物資源科学科、⁴⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

⁵⁾日本大学歯学部解剖学第Ⅱ講座、⁶⁾日本大学歯学部口腔外科講座、⁷⁾愛知学院大学歯学部口腔解剖学講

【目的】脂肪組織から単離できる成熟脂肪細胞を天井培養することで非対称分裂にて現われる脱分化脂肪(DFAT)細胞は、高い増殖能と多分化能を有することが報告されている。従来、成熟脂肪細胞の大きさは約 100 μ m 前後と定義づけられていたが、我々は頬脂肪体由来の 40 μ m 未満の成熟脂肪細胞画分から DFAT 細胞を調整する事で、従来よりも有意に早く骨芽細胞へ分化する事を報告した。しかしながら、この小さな成熟脂肪細胞を調整する際の適切な酵素条件に関する報告はこれまでにない。そこで、本研究では、コラゲナーゼ濃度による差異が脱分化脂肪細胞の調整に及ぼす影響について検討することを目的に以下の研究を計画した。

【材料および方法】日本大学歯学部付属歯科病院口腔外科を受診した健常な男女 10 名からヒト頬脂肪体を摘出し、0.01%、0.02%、0.1%、0.5%コラゲナーゼ溶液に分けて酵素処理後、遠沈管上部に浮遊した脂肪細胞数と直径を測定した。その後、単離された成熟脂肪細胞を天井培養し、DFAT 細胞を調整した。1週間後フラスコを反転し、その 3 日後に継代した際の細胞数を測定した。さらに 0.1%と 0.02%で酵素処理して調整したDFAT細胞の遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞周期、骨芽細胞および脂肪細胞への分化能について検討し、特性を比較した。

【結果および考察】0.02%コラゲナーゼ濃度で酵素処理したグループが他のグループと比較して 2.5 倍以上の脂肪細胞数が計測され、その多くは直径 30 μ m 以下であった。また、第一継代の DFAT 細胞数は 0.02%で酵素処理したグループが最も多かった。さらに、0.02%と 0.1%の濃度で調整したDFAT細胞の遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞周期および脂肪細胞への分化能に有意な差はみられなかったが、骨芽細胞誘導におけるアルカリホスファターゼ活性は 0.02%で調整したグループが高い傾向を示した。

【結論】本研究より、0.02%の酵素処理したグループが小さな成熟脂肪細胞を多く獲得できるだけでなく、0.1%で調整した DFAT細胞と差異がなかったことから、至適酵素濃度は 0.02%であることが示唆された。一連の結果からDFAT細胞を口腔領域に臨床応用する際の具体的な酵素処理条件が確立された。

脱分化脂肪細胞(DFAT)移植による免疫性腎炎の改善効果

○丸山高史¹⁾、福田 昇¹⁾³⁾、松本太郎²⁾、東 龍英¹⁾、深澤みゆき¹⁾、遠藤守人⁴⁾、岡田一義¹⁾、河内 裕⁵⁾、阿部雅紀¹⁾

¹⁾日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾日本大学大学院総合科学研究科生命科学、⁴⁾八戸大学人間健康学部人間健康学科、

⁵⁾新潟大学医歯学総合研究科附属腎研究施設分子病態学分野

【目的】本学で開発され間葉系幹細胞と同等の多分化能を持つ DFAT を 3 種類の腎障害モデル動物に移植してその効果を検討した。

【方法】各腎障害モデルに DFAT を移植、1 ヶ月後に腎障害の改善効果を評価した。移植は他家移植で行い、移植経路は DFAT を腎動脈から腎に直接移植する群と、尾静脈から全身投与する 2 群を設けた。

【結果】①抗体を用いて腎症を発症させる MoAb1-22-3 誘発腎炎では、腎動脈群より尾静脈投与群の方がより腎症が改善した。移植により血清中 TSG-6 濃度は有意に上昇し、腎内 TSG-6、TNF- α の mRNA 発現は有意に上昇、IL-6 と IL-12 β は抑制されていた。脾臓内の T_{reg} は有意な変化は無かった。さらに以下の追加実験を行った。in vitro で DFAT に TNF- α を添付すると培養上清中 TSG-6 濃度は有意に上昇した。DFAT と SHR-SP のメサンギウム細胞をトランスウエルで共培養した場合、TSG-6 の細胞内発現は亢進していた。そこで TSG-6 の発現を siRNA でノックダウンした DFAT を腎炎ラットに細胞移植したが、前述した腎炎の改善効果が消失した。また MoAb1-22-3 誘発腎炎に DFAT の細胞移植を自家移植で尾静脈から行った場合、効果は他家移植と同等であった。②免疫反応を腎症の本態としない抗癌剤によるアドリアマイシン腎症では DFAT 細胞移植による腎症改善効果は観られなかった。③ANCA 関連腎炎モデルである SCG マウスに DFAT 細胞移植した場合、血中の TSG-6 の上昇、生存率の改善、尿蛋白改善効果が認められた。

【結論】DFAT の細胞移植は TSG-6 を中心とした免疫調整作用で ANCA 関連腎炎など自己免疫性腎炎に臨床応用出来る可能性がある。

成熟脂肪細胞の脱分化による性質変化に対するビタミンDシグナルの影響

○石澤通康¹⁾、風間智彦²⁾、松本太郎²⁾、槇島 誠¹⁾

¹⁾日本大学医学部生体機能医学系生化学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

[背景]

リガンド依存性転写因子であるビタミンD受容体(Vitamin D receptor; VDR)は、血中カルシウム濃度の維持や骨代謝活性化など、生体内カルシウム恒常性維持に重要な活性型ビタミンDの受容体であり、核内受容体スーパーファミリーの一種である。近年、活性型ビタミンDが前駆脂肪細胞の分化を促進することや、VDR欠損マウスでは脂肪蓄積が少ないという特徴が見られるなど、ビタミンD-VDRシグナルの脂肪細胞分化への影響が示唆されていたことから、本研究では成熟脂肪細胞が脱分化過程において性質変化する際のビタミンDシグナルの影響を検討した。

[方法と結果]

天井培養1週間後の成熟脂肪細胞において、脂肪細胞のマーカー分子である peroxisome proliferator activated receptor $\gamma 2$ (Ppar $\gamma 2$)、CCAAT-enhancer-binding protein α (C/ebp α)、C/ebp β の mRNA レベルが減少した。活性型ビタミンD添加培地ではこれら脂肪細胞マーカー分子の発現減少が軽減された。VDR欠損マウスにおいても、天井培養1週間後で、野生型マウスと同様に脂肪分化マーカーの発現レベルが減少したが、脂肪分化マーカーの発現レベルは野生型よりも低かった。

ブタの成熟脂肪細胞の脱分化過程で発現増加する Fibronectin 1 (Fn1), Platelet-derived growth factor α (Pdgf α), Pdgf β , Integrin $\alpha 5$ (Itg $\alpha 5$) は、マウス成熟脂肪細胞の脱分化過程でも発現増加するが、活性型ビタミンD添加により、更に発現が増加した。

[結語と展望]

ビタミンDシグナルは脱分化過程において発現低下する分子の発現を軽減するだけでなく、発現増加する分子の発現を促進した。ビタミンDシグナルは脱分化脂肪細胞の性質に影響することが予想されるため、今後は脱分化脂肪細胞の再分化能への検討を加えていく。

培養表皮移植時の脱分化脂肪細胞(DFAT)投与による基底膜構築促進

○副島一孝¹⁾、櫻村 勉¹⁾、風間智彦²⁾、松本太郎²⁾、仲沢弘明¹⁾

¹⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】自家培養表皮(JACE®, J-TEC 社製)は本邦ではじめて認可された再生医療製品であり、広範囲重傷熱傷の治療に対して保険適応となっている。全層皮膚欠損創であるⅢ度熱傷創への自家培養表皮移植に際しては予め凍結保存同種真皮あるいは人工真皮による真皮再構築が前提となるが、現状では再建真皮上への自家培養表皮の長期生着率不良が課題である。そこで、全層皮膚欠損創の再建真皮上への自家培養表皮移植生着へのDFATの効果について検討を行った。

【方法】LWD系SPFブタより全層皮膚、皮下脂肪を採取してGreen型培養表皮およびDFAT細胞を調整した。同一個体ブタの背部にⅢ度熱傷創を模して脂肪露出全層皮膚欠損創を作成し、予め凍結保存した同種皮膚あるいは人工真皮(Pelnac、グンゼ)により真皮再建を行い、対照群(未治療)とDFAT治療群(0.5×10⁵cell/cm²)を作成した。その10日後に再建真皮上に自家培養表皮を移植した。培養表皮移植後14日目に開創して評価を行った。

【結果】肉眼的所見、顕微鏡所見では2群間に明らかな差は無かった。表皮真皮接着層のTEM像で、DFAT群で基底膜(BM)構築とanchoring fibril(AF)形成が促進されていた。免疫染色像ではcollagen IVは全群陽性、lamininは対照群で弱発現DFAT群で強発現であった。

【結論】DFAT群では、培養表皮移植後の表皮真皮接着層にlamininの発現促進が見られ、BM、AFの形成促進が認められた。DFATが培養表皮生着促進に有用であることが示唆された。

下肢虚血モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)自家移植の有効性の検討

○河野通成¹⁾、河内秀臣¹⁾、前田英明¹⁾、田中正史¹⁾、山元智衣²⁾、松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部外科学系心臓血管外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【背景】脱分化脂肪細胞 DFAT は成熟脂肪細胞を脱分化させて得られる細胞で、高い自己増殖能と間葉系幹細胞様の高い分化能を有することが報告されている。本研究では下肢虚血モデルに対する DFAT 自家移植での虚血改善および血管再生能を検討し、さらに凍結・解凍後の DFAT 自家移植での有効性を検討した。

【方法】1. ブタ下肢虚血モデルに対する DFAT 自家移植での虚血改善および血管再生能を TcPO₂、血管密度測定で評価。2. ウサギ下肢虚血モデルに対する DFAT 自家移植、凍結・解凍後 DFAT 自家移植での虚血改善および血管再生能を TcPO₂ で評価。

【結果】1. DFAT 肢は Control 肢と比較し、移植 1、2 週後で有意に TcPO₂ が回復した。虚血筋組織の免疫組織学的検討では平滑筋 α アクチン陽性を示す成熟度の高い微小血管が DFAT 肢で有意に増加した。2. DFAT 肢は Control 肢と比較し有意に TcPO₂ が回復した。また凍結・解凍後 DFAT 自家移植も Control 肢と比較し有意に TcPO₂ が回復した。

【結論】DFAT の自家移植は移植後早期の虚血改善の効果を示す傾向が明らかになり、凍結・解凍後 DFAT 自家移植も同様の傾向が明らかとなった。DFAT は高齢者や骨髄炎合併症例からも低侵襲性に調製できるため、難治性末梢血管病に対する細胞治療の細胞源として期待できる。DFAT の臨床応用によって下肢切断を余儀なくされたような患者に対して DFAT 移植により救肢できる可能性が示された。

脱分化脂肪細胞(DFAT)に由来するエクソソームの解析と 椎間板髄核細胞に対する作用

○富塚孔明¹⁾²⁾ 風間智彦²⁾ 徳橋泰明¹⁾ 松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】われわれは成熟脂肪細胞を天井培養することによって得られる脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)が間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)と同等の多能性を有することを報告してきた。近年、細胞が分泌する細胞外小胞であるエクソソームが細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たすことが報告されている。今回われわれはDFATの培養上清からエクソソームを抽出し、エクソソームが内包するmiRNAの網羅的解析と、エクソソームが椎間板髄核細胞に及ぼす作用について検討した。

【方法】同一ドナーに由来するヒト皮下脂肪組織からDFATとASCを調製した。それぞれ2日間培養後、培養上清を回収し、濃縮試薬を用いてエクソソームを分離・濃縮した。分離したエクソソームからtotal RNAを抽出し、miRNAマイクロアレイ法を用いて網羅的なmiRNA遺伝子発現解析を行った。またDFAT及びASC由来エクソソームをPKH67で蛍光標識後、培養ウサギNP cellへ添加し、細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡にて観察した。DFAT及びASC由来エクソソームを培養NP cellへ添加し、NP cellの細胞増殖能に及ぼす影響を経時的に評価した。さらにエクソソーム添加によるNP cellの軟骨関連遺伝子の発現変化をリアルタイムRT-PCR法にて評価した。

【結果】miRNAマイクロアレイによる網羅的解析の結果、DFAT由来エクソソームとASC由来エクソソームは近似したmiRNA発現プロファイルを示した。NP cellに対し作用を及ぼすことが報告されているmiRNAが7つ検出され、この中で細胞外基質産生促進作用が報告されているmiR-93-5pが抽出された。DFAT、ASC由来エクソソームはどちらもNP cellへの取り込みが認められた。細胞増殖アッセイの結果、DFAT由来エクソソーム群では培養液を添加したコントロール群と比較し、NP cellの増殖能が有意に増加した。リアルタイムRT-PCR法による遺伝子発現解析では、DFATおよびASC由来のエクソソームを添加することによりNP cellにおけるVersican、Collagen type I、Sox9の遺伝子発現が有意に増加した。

【結論】DFAT由来エクソソームにはASCと類似した多くのmiRNAが内包され、椎間板髄核細胞に取り込まれ、細胞増殖能を促進させ軟骨関連遺伝子の発現を増加させることが明らかになった。DFAT由来エクソソームは椎間板変性症に対する治療効果が期待できる。

細胞ファイバ技術が拓く3次元組織形成と細胞治療への展開

竹内 昌治 先生

東京大学生産技術研究所

微小な流路を用いて作製したハイドロゲルのファイバ内に、細胞を3次元的に培養する方法について紹介する。ファイバはコアシェル型の形態を所持しており、コアは細胞や細胞外マトリックス、シェルはアルギン酸カルシウムから構成される。コア直径は100ミクロン程度であり、内部の3次元組織に養分を拡散によって供給できるため、中心壊死することなく、長期間の培養することができる。これにより、血管、神経、筋肉などのファイバ状の組織を細長く形成できたり、それら異種組織が結合された構造体もできるようになってきた。また、ファイバを編んだり巻いたりすることにより高次の組織を形成できることが分かった。さらに、膵島細胞などをファイバに内包すれば、糖尿病治療に有効な低侵襲の移植片として使えることも分かってきた。講演では、これら細胞ファイバの最近の成果について概説するとともにその応用可能性を議論する。

References:

1. Nobuhito Mori et al.: Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip, **Biomaterials**, vol. 116, pp. 48–56, 2017
2. Hiroaki Onoe et al.: Differentiation Induction of Mouse Neural Stem Cells in Hydrogel Tubular Microenvironments with Controlled Tube Dimensions, **Advanced Healthcare Materials**, vol. 5(9), pp. 1104–1111, 2016
3. Amy Y. Hsiao et al.: 3D Tissue Formation of Unilocular Adipocytes in Hydrogel Microfibers, **Advanced Healthcare Materials**, vol. 5(5), pp. 548–556, 2016
4. Keiko Sugai et al.: Neural Stem/Progenitor Cell-Laden Microfibers Promote Transplant Survival in a Mouse Transected Spinal Cord Injury Model, **Journal of Neuroscience Research**, vol. 93(12), pp. 1826–1838, 2015
5. Shigenori Miura et al.: Fluid shear triggers microvilli formation via mechanosensitive activation of TRPV6, **Nature Communications**, vol. 6, 8871, 2015
6. Amy Hsiao et al.: Smooth Muscle-like Tissue Constructs with Circumferentially Oriented Cells Formed by the Cell Fiber Technology, **Plos ONE**, doi: 10.1371/journal.pone.0119010, 2015
7. M. Negishi-Kato et al.: Millimeter-sized neural building blockssho for 3D heterogeneous neural network assembly, **Advanced Healthcare Materials**, vol. 2(12), pp. 1564–1570, 2013
8. Yuya Morimoto et al.: Three-Dimensional Neuron-Muscle Constructs with Neuromuscular Junctions, **Biomaterials**, vo. 34(37), pp. 9413–9419, 2013
9. Hiroaki Onoe et al.: Metre-long Cellular Microfibres Exhibit Tissue Morphologies and Functions, **Nature Materials**, vol.12, pp. 584–590, 2013

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

(研究拠点を形成する研究)

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

平成 29 年度 研究成果公開シンポジウム

日時:平成 30 年 3 月 3 日 (土) 10:00~15:00

場所:日本大学医学部リサーチセンター4 階ホール

プログラム

1. 開会の挨拶 (10:00~10:05)

2. 成果発表 午前の部 (10:05~12:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 野呂 知加子 (日本大学生産工学部応用分子化学科)

①椎間板変性症に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植の治療効果

中山遡志、宮方啓行、小山公行、風間智彦、徳橋泰明、松本太郎

②DFAT(dedifferentiated fat cell) derived exosome の免疫抑制能

小野賀功、小沼憲祥、金澤剛二、土方浩平、日高綾乃、後藤俊平、越永従道、松本太郎

③免疫異常に起因する進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発

丸山高史、宇都宮慧、深澤みゆき、常見明子、遠藤守人、松本太郎、福田昇、阿部雅紀

座長: 榎島 誠 (日本大学医学部生体機能医学系生化学分野)

④脱分化脂肪細胞 DFAT における造腫瘍性に関する安全性評価

風間智彦、長岡悠紀、山元智衣、萩倉一博、加野浩一郎、相川佳之、松本太郎

⑤DFAT の血管新生効果と壁細胞分化についての検討

萩倉一博、渡邊拓史、後藤俊平、石川三友紀、長岡悠紀、山元智衣、風間智彦、松本太郎

⑥脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用製造と細胞治療への応用

山元智衣、李予昕、風間智彦、長岡悠紀、萩倉一博、大野聡子、松本太郎

3. 休憩 (12:00~13:00)

4. 成果発表 午後の部 (13:00~14:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 福田 昇 (日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野)

⑦胎児付属物由来幹細胞から分泌する Exosome の免疫抑制能の検討

金澤剛二、小野賀功、谷川俊太郎、大熊啓嗣、下澤克宜、平井麻衣子、小沼憲祥、谷ヶ崎博、松本太郎、高橋 昌里

⑧脱分化脂肪細胞(DFAT)の自家培養表皮生着促進効果に関する検討

副島一孝、櫻村 勉、風間智彦、松本太郎、仲沢弘明

⑨脱分化脂肪細胞を用いた変形性膝関節症に対する細胞治療

遠藤則行、風間智彦、徳橋泰明、松本太郎

⑩脱分化脂肪細胞による血流不全組織の救済効果に関する検討

櫻村勉、副島一孝、風間智彦、仲沢弘明、松本太郎

5. 特別講演 (14:00~15:00)

座長: 松本 太郎 (日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野)

臍帯由来間葉系細胞の特長と臨床応用

東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部
准教授 長村(井上) 登紀子 先生

6. 閉会の挨拶

椎間板変性症に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植の治療効果

○中山渕志¹⁾、宮方啓行¹⁾、小山公行¹⁾、風間智彦²⁾、徳橋泰明¹⁾、松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部外科学系整形外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】我々は皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞から調整される脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cell: DFAT)が高い増殖能と間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; MSC)と同等の多分化能を示すことを報告している。今回、人工的に椎間板変性を生じさせたラットの椎間板に DFAT を移植し、椎間板高の定量及び変性した椎間板の再生効果を示すかについての検討を行った。

【方法】体重約 300g、約 12 週齢の雄性 Sprague-Dawley(SD)ラットに対して、急性炎症モデルとして、尾椎椎間板を 21G 針にて経皮的椎間板穿刺を行い、慢性炎症モデルとして、受動喫煙ボックス内で 1 日 20 本のタバコを 8 週間吸わせることで、椎間板変性モデルを作製した。椎間板穿刺モデルに対しては穿刺 1 週間後に DFAT (5×10^4 / 50 μ l Phosphate buffered saline (PBS), DFAT 群)または同量の PBS (50 μ l, PBS 群)を移植した。移植後、X 線透視装置下に椎間板高の測定を行い、椎間板高の変化% Disc height index (%DHI)を算出した。また、移植 4 週および 8 週間後に尾椎の切片標本作製し、collagenase 染色、HE 染色、CD24 染色及び Green fluorescent protein (GFP)トランスジェニックラットを用いた GFP と CD24 に対する蛍光二重免疫染色を行い椎間板細胞の再生能や増殖能について評価した。

受動喫煙モデルに対しては、DFAT 群には DFAT 1×10^6 / 0.5ml PBS を二週間おきに計 4 回尾静脈より投与し、PBS 群には同量の PBS を投与し、Control 群は PBS と DFAT の投与は行わなかった。移植後、DMMB 法によるプロテオグリカン定量を行った。また、移植 8 週間後に尾椎の切片標本作製し、HE 染色、Alcian blue 染色、Elastica von Gieson (EVG)染色を行い、椎間板変性症に対する再生効果について評価した。

【結果】椎間板穿刺モデルにおいて PBS 移植群と比較して DFAT 移植群は%DHI が有意に高値となり、椎間板高の狭小化が抑制され、椎間板間隙の高さが保持される傾向が認められた。受動喫煙モデルにおいてプロテオグリカン量を比較したところ、DFAT 群は PBS 群に比べプロテオグリカン量の減少が抑制される傾向にあることが示された。病理組織学的検討では、椎間板穿刺モデルでは DFAT 移植群の一部に、椎間板辺縁に不定形の腔胞をもつ分葉状の髄核様細胞集団が認められ、GFP と CD24 に対して二重陽性を示す細胞が多数認められた。受動喫煙モデルにおいては、DFAT 群は PBS 群に比較し髄核構造が保たれる傾向であった。

【結論】DFAT は椎間板変性症に対する新たな細胞治療用細胞ソースとして有望であり、椎間板再生の有効な治療となる可能性が示唆された。また、今後そのメカニズムの解明が椎間板再生治療への新たな可能性を示唆するものと思われる。

DFAT(dedifferentiated fat cell) derived exosome の免疫抑制能

○小野賀功^{1,2)}、小沼憲祥²⁾、金澤剛二³⁾、土方浩平²⁾、日高綾乃²⁾、後藤俊平²⁾、越永従道²⁾、松本太郎¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生移植医学分野、²⁾ 日本大学医学部小児外科、

³⁾ 日本大学医学部小児科

【背景】細胞間情報伝達に細胞外小胞(extracellular vesicles : exosome)が間葉系幹細胞(MSC)から放出され、内部の miRNA を標的細胞に運搬することで、組織障害の修復や免疫抑制能を発揮し治療効果をもたらす報告がされている。例えば、MSC exosome が末梢血の T リンパ球に対して Th1 から Th2 への変換を起こし、Th17 を抑制し、制御性 T 細胞(Treg)を誘導する報告がされている。Th17 優位のリンパ球分画が病因とされる炎症性腸疾患(特に Crohn 病)において間葉系幹細胞由来の exosome の治療応用が期待されている。我々は成熟脂肪細胞を脱分化培養することで得られる細胞(脱分化脂肪細胞 : DFAT)が MSC に酷似した機能を持つことを示してきた。DFAT は MSC に比較して侵襲性が低く採取でき、細胞の均一性が高いために用いやすい。今回 DFAT から放出される exosome の持つ免疫制御能について検討したので報告する。

【方法】まずは DFAT 及び ASC から分泌される exosome の存在を電子顕微鏡、Western blot で証明した。DFAT、ASC derived exosome に内包する miRNA の網羅的解析を行い T リンパ球分化に関わる miRNA の存在を確認した。次に exosome のヒト末梢血リンパ球への取り込み、共培養において DFAT、ASC derived exosome にリンパ球増殖抑制能があることをフローサイトメトリーで示した。さらに臍帯血 naïve T 細胞に T リンパ球サブセットの分化誘導をかけ DFAT、ASC derived exosome が、リンパ球の Treg への分化誘導を促進し、Th17 への分化誘導を抑制することを示した。

【結論】DFAT、ASC derived exosome が炎症性腸疾患に対し治療効果を示す可能性を示唆するものである。

成果発表③

免疫異常に起因する進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発

○丸山高史¹⁾、宇都宮慧¹⁾、深澤みゆき¹⁾、常見明子¹⁾、遠藤守人²⁾、松本太郎³⁾、福田昇¹⁾、阿部雅紀¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、²⁾ 八戸学院大学健康医療学部人間健康学科、

³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】本学で開発された成熟脂肪細胞の脱分化によって得られる脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated Fat Cell ; DFAT)は間葉系幹細胞と同等の多分化能を有する。我々は免疫異常に起因した進行性腎障害モデルである単クローン抗体 1-22-3 誘発腎炎ラットに対する DFAT 細胞移植の治療効果について報告してきた。この疾患モデルはラット特有のモデルである。この技術を臨床応用化するにあたり今回我々はヒトにも存在して免疫異常を病因とする、また進行性腎障害を呈し予後不良疾患である ANCA 関連腎炎のモデル動物に対して DFAT の細胞移植を行い、効果およびその機序について検証した。【方法】SCG/ThpNkc マウスは急性進行性糸球体腎炎である ANCA 関連腎炎を発症する事が報告されている。8週齢の SCG/ThpNkc マウスに DFAT を静脈投与、細胞移植を施行して 1 ヶ月後に移植の効果判定および作用機序解明のため、尿や血液および腎臓・脾臓・肝臓・心臓・肺・腫大リンパ節の各種臓器を採取し、尿蛋白量や血清尿素窒素、血清クレアチニン値や ANCA 抗体値の測定、また腎の組織評価や腎臓・肺の real-time PCR を行い TSG-6 や IL-1、IL-6、TNF- α の測定、また FACS 解析を行い Treg と Th-17 を測定した。【結果】DFAT 移植群は無治療群と比較して、生存率が上昇した。DFAT 移植群では無治療群と比較して、尿蛋白量と血清 ANCA 値が減少し、血液中の TSG-6 濃度の有意な上昇を認めた。【結論】DFA 細胞移植はモデルマウスにおいて ANCA 関連腎炎を改善させた。その機序の一つに TSG-6 の発現増加による免疫調整作用が考えられた。DFAT 細胞移植を ANCA 関連腎炎の治療法として臨床応用出来る可能性が示唆された。

脱分化脂肪細胞 DFAT における造腫瘍性に関する安全性評価

○風間智彦¹⁾、長岡悠紀¹⁾、山元智衣¹⁾、萩倉一博¹⁾、加野浩一郎²⁾、相川佳之³⁾、松本太郎¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

²⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科動物生体機構学研究室、

³⁾湘南美容クリニック

【背景】再生医療・幹細胞技術の産業化においては、臨床応用に向けて効果・安全性をともに担保した有用な幹細胞の供給が待たれている。ヒト細胞加工製品の安全性指標としては、特に腫瘍原性に関する安全性評価が重要であり、造腫瘍性否定試験の実施が求められている。我々は成熟脂肪細胞を天井培養することにより得られる脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) が高い増殖能と間葉系細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) と同等の多分化能を示すことを報告してきた。DFAT は臨床応用における低コストかつ高品質な多分化性をもった細胞として利用でき、MSC 同様、様々な疾患に適応拡大可能である。本研究の目的として、DFAT の臨床応用に向けた重要課題である造腫瘍性について評価した。**【方法】**3例のドナーより調製したヒト DFAT の染色体核型解析およびテロメラーゼ活性測定を行なった。また、成熟脂肪細胞から DFAT への脱分化過程におけるゲノムコピー数の変化を CGH マイクロアレイにて解析するとともに、既知の癌関連遺伝子 (計 92 遺伝子) のプロモーター領域 CpG アイランドにおける DNA メチル化修飾を MassARRAY 法にて解析した。また、DFAT の造腫瘍性試験を行うにあたり、足場非依存性増殖能をみるため、軟寒天コロニー形成試験と NOG マウス皮下移植試験を実施した。**【結果】**検討したすべての細胞で、正常ヒト染色体数の 46 であり、明らかな染色体構造の異常はなく、テロメラーゼ活性の亢進がないことを明らかにした。CGH マイクロアレイ解析の結果、DFAT のゲノムコピー数のプロファイルは成熟脂肪細胞とほぼ一致していた。DNA メチル化解析の結果、脱分化に伴う特徴的なメチル化変動は、検討した癌関連遺伝子群の中では全く確認されなかった。また、軟寒天コロニー形成試験結果において、足場非依存性増殖能を有さないことを示し、NOG マウス皮下移植試験においても腫瘍性変化は認めなかった。**【結論】**脱分化培養による明らかな染色体異常やゲノムコピー数の変化、テロメラーゼ活性亢進、癌関連遺伝子の DNA メチル化変化は認められなかった。また、軟寒天コロニー試験ならびに NOG マウス皮下移植試験より造腫瘍性を認めず、安全に移植できることが示唆された。DFAT は低侵襲性で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞源として期待できると考える。

DFAT の血管新生効果と壁細胞分化についての検討

○萩倉一博、渡邊拓史、後藤俊平、石川三友紀、長岡悠紀、山元智衣、風間智彦、松本太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【背景】我々は、コラゲナーゼ処理した脂肪組織を天井培養することにより得られる細胞を DFAT (Dedifferentiated fat cells)と呼び、これらの細胞は MSC (Mesenchymal stem cell)と同様に多分化能を有することを報告した。また DFAT をマウス下肢虚血モデルへ移植すると、虚血部位の血流が改善することを報告した。DFAT の血管新生効果について、DFAT を低酸素培養すると VEGF, HGF などの血管新生因子を分泌することは報告しているが、DFAT と血管内皮細胞の相互作用については不明な部分が多い。今回我々は、DFAT と血管内皮細胞を共培養することで、DFAT の血管新生能および血管構成細胞への分化能について検討した。

【方法】1.マウス成熟脂肪細胞の天井培養を行い、DFAT を作成する。2.血管内皮細胞と DFAT との共培養により血管内皮細胞の遊走能・増殖能・管腔形成能の変化を評価する。3.血管内皮細胞と DFAT との共培養により DFAT における壁細胞マーカーの発現を qPCR、免疫染色で評価する。4.TGF- β 刺激および SMAD2/3 阻害における DFAT の血管壁細胞マーカーの発現を qPCR、免疫染色で評価する。

【結果】血管内皮細胞はマウス DFAT の存在下で遊走能・増殖能が亢進した。またコラーゲンゲル内で血管内皮細胞と DFAT を3次元培養すると、DFAT は血管内皮細胞の管腔形成能を亢進させ、管腔周囲に遊走・接着した。また内皮細胞との共培養により DFAT の壁細胞マーカー NG2 の発現が亢進した。DFAT の NG2 発現は TGF- β 刺激で促進し SMAD2/3 阻害薬で抑制された。

【結論】DFAT は血管内皮細胞の遊走能・増殖能・管腔形成能を促進した。また DFAT は血管構成細胞である壁細胞へ分化する可能性が示唆された。

脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用製造と細胞治療への応用

○山元智衣、李予昕、風間智彦、長岡悠紀、萩倉一博、大野聡子、松本太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

脱分化脂肪細胞(DFAT)は間葉系幹細胞(MSC)同様、組織を構成する細胞の活性に必要な液性因子を効果的に分泌することで、組織修復作用、血管新生作用、免疫制御作用を有する細胞である。また高い増殖能を有し MSC と比べ均一性が高く、わずかな脂肪組織から大量の細胞を調整できることから、実用性の高い再生医療用細胞になり得ると期待できる。特に血管新生に関しては様々な確証が得られており、各種動物モデルを用いた実験では DFAT 移植により、虚血肢に成熟した血管の増加が確認されている。これらのことより DFAT を用いた重症下肢虚血に対する血管新生細胞治療への臨床応用を目指し、基礎研究によって確立した方法を臨床用に改良および品質管理方法を検討している。

再生医療に関しては、平成 26 年 11 月より施行された「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(再生医療等安全性確保法)により、臨床に用いる場合は厚生労働省へ再生医療等提供計画書の届出が義務付けられている。さらに再生医療に用いる細胞を培養する場合、特定細胞加工物の製造許可申請を行い、細胞培養加工施設ごとに厚生労働省の許可を受ける必要があり、2017 年に「日本大学医学部リサーチセンター CPF」として厚生労働省より再生医療用細胞の特定細胞培養加工施設の許可認定を受け、施設番号を付与された。

我々は、再生医療安全性確保法に基づく培養施設として、日本大学医学部リサーチセンター CPF 内に設置されたセルプロセッシング・アイソレーターを用いた臨床用ヒト DFAT 作成方法の開発を行い、ボランティアから採取した脂肪組織を用いたヒト DFAT の大量培養が可能であることを確認した。

今後、上記 CPF においてセルプロセッシング・アイソレーターを利用した、再生医療安全性確保法下での臨床用 DFAT の製造技術の確立、標準化を行い、再生医療等提供計画の届出を経て早期の臨床応用を目指したい。

胎児付属物由来幹細胞から分泌する Exosome の免疫抑制能の検討

○金澤剛二¹⁾、小野賀功²⁾、谷川俊太郎¹⁾、大熊啓嗣¹⁾、下澤克宜¹⁾、平井麻衣子¹⁾、小沼憲祥²⁾、
谷ヶ崎博¹⁾、松本太郎³⁾、高橋昌里¹⁾

¹⁾日本大学医学部小児科学系小児科学分野、²⁾日本大学医学部外科学系小児外科学分野、

³⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】間葉系幹細胞(MSC)が細胞外小胞(Exosome)を分泌し、含有するマイクロRNA(miRNA)を標的細胞へ運搬することで、組織修復や免疫抑制能をもたらすことが明らかにされているが、胎児付属物由来 MSC から分泌される Exosome が免疫抑制能をもつかは明らかでない。本研究では胎児付属物より羊膜間質由来 MSC(AM-MSc) および臍帯 Wharton's Jelly 由来 MSC(WJ-MSc)から分泌された Exosome を抽出して、それらの T 細胞増殖抑制能や制御性 T 細胞(Treg)の分化に関わる効果を検討した。**【方法】**AM-MSc、WJ-MSc から Exosome を抽出し、透過電子顕微鏡による形態観察とウェスタンブロット法による Exosome 特異的マーカー(CD63)の検出を行った。また、それぞれの Exosome(AM-MSc Exo、WJ-MSc Exo)から RNA を抽出し、含有する miRNA の発現を miRNA マイクロアレイにて解析した。AM-MSc Exo、WJ-MSc Exo を CFSE 標識したヒト末梢血単核球に添加し、抗 CD3/28 抗体と IL-2 含有培地にて 4 日間培養後、T 細胞増殖能をフローサイトメーターで評価した。次に AM-MSc Exo、WJ-MSc Exo をヒト臍帯血 CD4 陽性 T 細胞に添加し、抗 CD3/28 抗体と IL-2 含有培地にて 4 日間培養後、ナイーブ T 細胞から Treg 細胞へ分化した割合を定量評価した。**【結果】**AM-MSc、WJ-MSc 培養上清の抽出液中には、高純度の Exosome の存在を確認することができた。また AM-MSc、WJ-MSc 由来 Exosome 中には多くの miRNA が存在し、T リンパ球の増殖抑制や Treg 細胞の分化に関わると報告される複数の miRNA の発現が認められた。AM-MSc Exo、WJ-MSc Exo は、濃度依存性にヒト T リンパ球の増殖を抑制した。AM-MSc、WJ-MSc との共培養、または AM-MSc-Exo、WJ-MSc-Exo 添加は、ヒト臍帯血ナイーブ T 細胞から Treg 細胞への分化を促進した。**【結論】**AM-MSc や WJ-MSc から分泌された Exosome には免疫制御に関わる複数の miRNA を含有し、T 細胞に効率良く取り込まれ、T 細胞増殖抑制作用やナイーブ T 細胞から Treg 細胞の分化促進作用を示すことが明らかとなった。

脱分化脂肪細胞(DFAT)の自家培養表皮生着促進効果に関する検討

○副島一孝¹⁾、 櫻村 勉¹⁾、 風間智彦²⁾、 松本太郎²⁾、 仲沢弘明¹⁾

¹⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野、 ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】自家培養表皮(JACE®, J-TEC 社製)は本邦ではじめて認可された再生医療製品であり、体表面積の 30%以上を占める広範囲重傷熱傷の治療に対して保険適応となっている。熱傷創への自家培養表皮移植に際しては予め凍結保存同種真皮あるいは人工真皮による真皮再構築が前提となるが、現状では再建真皮上への自家培養表皮の長期生着率不良が課題である。そこで、全層皮膚欠損創の再建真皮上への自家培養表皮移植生着への DFAT の効果について検討を行った。

【方法】LWD 系 SPF ブタより全層皮膚、皮下脂肪を採取して Green 型培養表皮および DFAT 細胞を調整した。同一個体ブタの背部に III 度熱傷創を模して脂肪露出全層皮膚欠損創を作成し、人工真皮(Pelnac、グンゼ)により真皮再建を行い、対照群(未治療)と DFAT 治療群($0.5 \times 10^5 \text{ cell/cm}^2$)を作成した。その 10 日後に再建真皮上に自家培養表皮を移植した。培養表皮移植後 14 日目に開創して評価を行った。

【結果】肉眼的所見、顕微鏡所見では 2 群間に明らかな差は無かった。表皮真皮接着層の TEM 像で、DFAT 治療群で基底膜(BM)構築と anchoring fibril(AF)形成が促進されていた。免疫染色像では collagen IV は全群陽性、laminin は対照群で弱発現 DFAT 群で強発現を認めた。

【結論】DFAT 治療群では、培養表皮移植後の表皮真皮接着層に laminin の発現促進が見られ、BM、AF の形成促進が認められた。DFAT が培養表皮生着促進に有用であることが示唆された。

脱分化脂肪細胞による血流不全組織の救済効果に関する検討

○樫村勉¹⁾、副島一孝¹⁾、風間智彦²⁾、仲沢弘明¹⁾、松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】近年、骨髄や脂肪を細胞ソースとした多分化能を有する間葉系幹細胞が同定され、血流不全に起因する病態への治療が模索されている。その中で、幹細胞の血管新生作用による皮弁の生着域拡大に関する研究が行われており、一定の効果が得られることが報告されている。われわれはブタの皮下脂肪組織を体外で脱分化させることにより、高い増殖能と間葉系幹細胞と類似した性質を示す細胞群(脱分化脂肪細胞 dedifferentiated fat cells, DFAT)を調製する培養法を確立した。今回、DFAT をラット背部の乱走型皮弁に投与し皮弁生着域を拡大しうるか検討したため報告する。

【対象・方法】ラットの皮下脂肪を天井培養することで各実験群の DFAT を単離培養した。ラットの背部に乱走型皮弁(2×9cm)を挙上し以下の実験を行った。1)自家 DFAT 投与実験:対照群(未治療)(n=10)と DFAT 投与群:(DFAT(1×10⁶cells/0.1ml)を作製した。自家 DFAT 投与群は SD 系ラットより調整した DFAT を SD 系ラットの皮弁に移植した。皮弁基部より 2cm に投与する基部自家 DFAT 投与群(n=10)と皮弁中央に投与する中央自家 DFAT 投与群(n=10)の 2 群を作製した。2)他家 DFAT 投与実験:Wistar 系ラットより調整した DFAT を SD 系ラットの皮弁に移植した。他家 DFAT 投与群も同様に、基部他家投与群(n=10)と中央他家投与群(n=10)の 2 群を作製した。3)糖尿病ラット(SDT Fatty ラット)の皮弁の実験:SDT Fatty ラットの背部に同様に皮弁を作成し、DM 対照群(n=10)と SD 系ラットより調整した DFAT を投与する DM 基部投与群(n=10)を作成した。術後 14 日目に生着域を測定し組織を採取し、組織学的検討を行った。

【結果】術後 14 日目に皮弁の生着域と壊死部分の境界は明瞭であった。皮弁の平均生着率は対照群:53.8±6.4%、中央自家投与群:50.6±6.4%、基部自家投与群:65.8±2.4%、中央他家投与群:53.5±4.9%、基部他家投与群:62.8±5.9%、DM 対照群 34.5±9.2%、DM 基部投与群 48.9±10.8%、であった。皮弁基部投与群で皮弁生着域は、対照群と比較して有意に拡大した。組織学的検討では、DFAT 投与群で皮弁内の血管の増加を認めた。

【考察】いずれの実験群でも、皮弁基部への DFAT の投与により一定の生着域の拡大効果が得られた。これらの生着域拡大効果は、DFAT の血管新生作用によるものと考えられた。自家 DFAT の投与では待機的な皮弁手術や難治性潰瘍治療、他家 DFAT の投与では外傷や緊急手術、糖尿病ラットへの DFAT 投与では糖尿病性潰瘍など幅広い領域での臨床応用の有用性が示唆された。

臍帯由来間葉系細胞の特長と臨床応用

長村(井上) 登紀子 先生

東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部

間葉系細胞(Mesenchymal stromal cells: MSC)のソースとして、臍帯血、臍帯、胎盤や羊膜等の周産期付属物はドナーへの身体的負担なく採取でき、同種ソースとして期待されている。臍帯由来MSCは、母児の安全性を確認できるまで臍帯組織ごと凍結でき、初期培養コストを抑えられること、胎児組織由来であることから増殖率が高く、短期間で多くのMSCが回収できること、骨髄や脂肪由来MSCと異なり炎症性サイトカイン(インターフェロン γ)存在下でもHLA-Class IIが殆ど誘導されないことから抗原性が低いと考えられることなど種々の特長がある。また、臍帯由来MSCの同種抗原刺激による活性化T細胞の抑制作用や組織修復能を利用して、造血幹細胞移植後の重症急性移植片対宿主病(GVHD)や新生児脳症等を対象として、アカデミア発の再生医療等製品化に取り組んできた。重症急性GVHDは、造血幹細胞移植後のドナーリンパ球による同種免疫反応とそれらによる組織障害である。既に、テムセルHS注®など、骨髄由来MSC製品が市販されているが、国内ドナーの製品として高品質・安全かつより安価に、提供できるかが鍵となる。一方、新生児脳症は、脳性麻痺に進展する可能性が高い疾患であり、頭蓋内出血、低酸素性虚血性脳症などが原因となり、発症初期にはサイトカインストームを含む炎症が生じ、さらに脳神経細胞障害の拡大、グリア細胞の増加へとつながる。これまでの基礎的検討において、脳障害時の反応性グリオシスの抑制、局所ニューロンの修復に対して、臍帯由来MSCが効果を発揮することを見出している。

First-in-Humanとして、Phase I 医師主導治験を実施する予定である。

細胞調製においては、臍帯組織の凍結、無血清培地(ロート製薬株式会社製造)での培養や回収細胞の凍結に至る全工程での無血清化を初めて達成した。その過程での細胞調製工程の改良や今後の産業化に向けた取り組みについても紹介したい。

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
(研究拠点を形成する研究)

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

平成 30 年度 研究成果公開シンポジウム

日時:平成 31 年 3 月 16 日 (土) 10:00～15:00

場所:日本大学医学部リサーチセンター4 階

プログラム

1. 開会の挨拶 (10:00~10:05)

2. 成果発表 午前の部 (10:05~12:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 福田昇 (日本大学総合科学研究所)

①脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究

松本太郎

②脱分化脂肪細胞 (DFAT) の口腔領域における有用性の検討

秋田大輔、風間智彦、月村直樹、新井嘉則、岩崎仁奈、加野浩一郎、松本太郎

③マウス皮膚欠損治癒過程における成熟脂肪細胞の形質変換に関する検討

石川三友紀、萩倉一博、風間智彦、李予昕、松本太郎

④乳癌微小環境における脂肪細胞の形質変換についての検討

土方浩平、植草省太、加藤礼保納、日高綾乃、小沼憲祥、越永従道、松本太郎

座長: 松本太郎 (日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野)

⑤Thy1-22-3 抗体腎炎に対する DFAT 細胞療法の効果

丸山高史、福田昇、宇都宮慧、阿部雅紀、松本太郎

⑥Induction kidney organoid from disease-specific iPS cells

Lan Chen、Noboru Fukuda、Akiko Tsunemi、Sho Tanaka、Asako Oguni、Kosuke Saito、Kyoko Fujiwara、Masanori Abe、Taro Matsumoto

⑦補体 C3 は腎尿管上皮間葉化 (EMT) により腎内 RAS を活性化し塩分感受性高血圧を起こす。

ゲノム編集技術による C3 ノックアウト SHR での検討

根岸英理子、福田昇、片川まゆみ、阿部雅紀

3. 休憩 (12:00~13:00)

4. 成果発表 午後の部 (13:00~14:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 加野浩一郎 (日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室)

⑧DFAT の血管新生効果および壁細胞分化

渡邊拓史、石川三友紀、長岡悠紀、山元智衣、風間智彦、萩倉一博、松本太郎

⑨ビタミン D シグナルの脂肪細胞脱分化過程における部分的関与の可能性と細胞治療法への応用

石澤通康、風間智彦、萩倉一博、松本太郎、槇島誠

⑩脱分化脂肪細胞に由来する肝細胞は中心静脈周辺領域の肝細胞の特性をもつ

萩原玲子、沖嘉尚、加野浩一郎

⑪皮膚再生医療における脱分化脂肪細胞 (DFAT) の効果に関する検討

副島一孝、樫村勉、風間智彦、仲沢弘明、松本太郎

5. 特別講演 (14:00~15:00)

座長: 野呂知加子 (日本大学大学院生産工学研究科)

細胞認識性バイオマテリアルによる医療の革新

—カドヘリンマトリックス工学・糖鎖マトリックス工学の再生医療への応用—

国際科学振興財団・再生医工学バイオマテリアル研究所 (東京工業大学名誉教授)

赤池 敏宏 先生

6. 閉会の挨拶 (15:00~15:05)

脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究

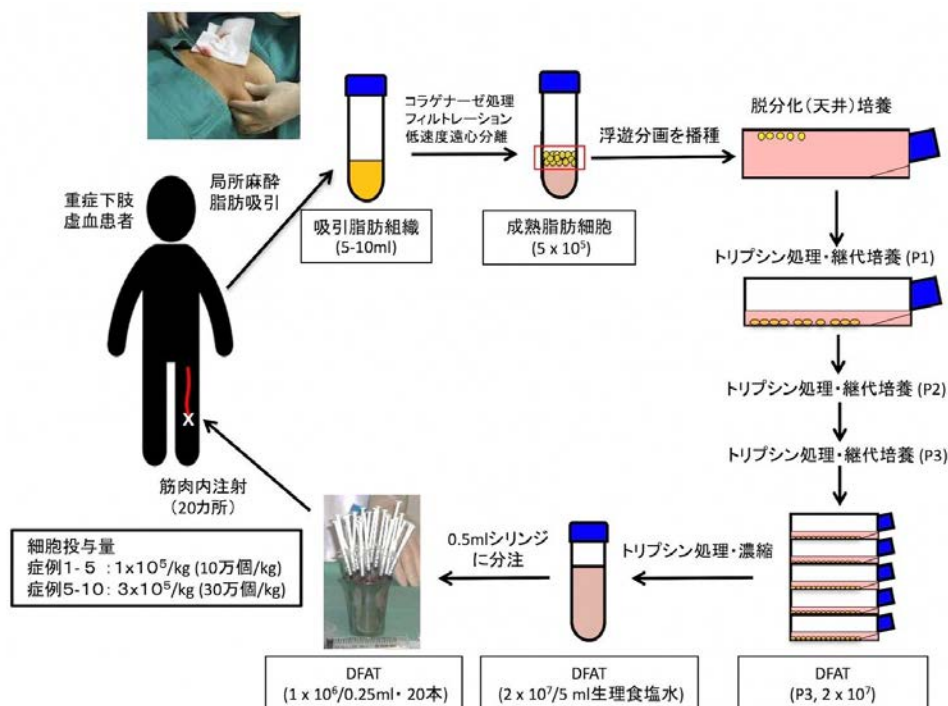
松本太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

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体外培養することにより得られる細胞群(脱分化脂肪細胞, Dedifferentiated fat cell:DFAT)が、高い増殖能と骨髄間葉系幹細胞(MSCs)と同等の多分化能を獲得することを明らかにした。DFATはMSCに比べ均質性が高く、ドナー年齢や基礎疾患を問わず調製できることから、実用性の高い治療用ドナー細胞となりうると考えている。DFATは虚血組織において種々の血管新生因子をバランスよく分泌すると共に、ペリサイトなどの血管構成細胞への分化能を有することから、血管新生を目的とした治療用細胞としての実用化が期待できる。

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」では、我々が今まで蓄積してきた研究成果を発展させ、DFATを用いた細胞治療のFirst-in-Human臨床研究実施を目標としている。具体的には、①治療用細胞としてのDFATの特性解析、②臨床応用に適合した細胞調製法の確立と移植安全性の検証、③DFATを用いた細胞治療の開発および前臨床試験を3本の柱として研究を行ってきた。これまでに臨床グレードのDFATを調製するために必要な細胞加工施設(日本大学医学部リサーチセンターCPF)の整備を行い、生物由来原料基準に適合した調製培地や、脂肪細胞を容易に効率良く脱分化させる脱分化培養フラスコを設計・開発を行ってきた(PCT出願済)。また軟寒天コロニー形成試験や免疫不全(NOG)マウス皮下移植による造腫瘍性試験を実施し、DFATの移植安全性を確認した。さらに健常ボランティアなどからヒト吸引脂肪組織の提供を受け、臨床グレードのDFATを調製し、品質をチェックする実験を繰り返し、細胞製造および品質管理に関するプロトコルおよび作業手順書を作成した。現在、重症下肢虚血(CLI)患者を対象に自家DFATを用いた血管再生細胞治療の臨床研究実施に向け、PMDAレギュラトリーサイエンス戦略相談を実施し、臨床研究に用いるDFATの品質や安全性を治験水準に高める作業を行っている。そして再生医療等提供計画書を作成し、特定再生医療等委員会への承認および厚生労働省への届け出を行う予定である。

本講演では、DFATを用いた細胞治療開発に関するこれまでの取り組みについて紹介する。



「重症下肢虚血に対する自家DFATによる血管再生細胞治療」FIH臨床研究の概要

脱分化脂肪細胞 (DFAT) の口腔領域における有用性の検討

○秋田大輔¹⁾、風間智彦²⁾、月村直樹¹⁾、新井嘉則³⁾、岩崎仁奈⁴⁾、加野浩一郎⁵⁾、松本太郎²⁾

¹⁾日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾日本大学歯学部歯科放射線学講座、⁴⁾日本大学歯学部歯科矯正学講座、⁵⁾日本大学生物資源科学部動物資源科学科

【目的】歯科領域では、口腔内器官に生じた欠損に対して人工材料を補填することで機能の回復を図る治療が古来よりおこなわれてきた。しかしながら近年、疾病などで損傷を受けた器官・組織に対して機能回復を目指す再生医療が飛躍的に発展し、歯科領域においても口腔機能の向上に対してその有用性が着目されているが、どの組織も採取に制限があるため、口腔内における現実的な細胞源は明らかになっていない。成熟脂肪細胞を天井培養することによって得られる脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)は、頬脂肪体からも調整可能なため、歯科領域においても組織再生に有用な細胞源であると考えられる。そのため我々は DFAT の口腔領域における有用性を検討した。

【方法】

- ①F344 ラット左側下顎臼歯部頰側に歯周組織欠損(縦 2 mm × 横 3 mm × 深さ 1 mm)を外科的に作製後、DFAT を PLGA(乳酸・グリコール酸共重合体)に播種した複合体を欠損部に移植し、第 1 臼歯中央根および遠心根部の歯周組織再生能を組織学的に評価した。
- ②F344 ラット下顎骨下縁に作製した骨欠損に対して、何もせず縫合したコントロール群、DFAT・RCP(リコンビナントペプチド)複合体を移植した細胞移植群を継時的にマイクロ CT 撮影し、硬組織再生能を比較検討した。
- ③日本大学歯学部付属歯科病院口腔外科を受診した健常な男女 10 名からヒト頬脂肪体を摘出して調整した DFAT 細胞の骨芽細胞への分化能について検討し、特性を解析した。

【結果】

- ①micro-CT による定量解析の結果、移植 5 週後の細胞移植群の硬組織再生量は対照群よりも有意に高い傾向を示した。組織学的解析から、両群において担体基質の残存と新生骨組織およびセメント質様組織の形成に加えて、再生した硬組織へのコラーゲン線維の埋入が認められた。また蛍光標識された DFAT 細胞は歯根膜組織中に多数散在しているほか、一部の細胞は新生セメント質と新生骨中に認められた。
- ②micro-CT による定量解析の結果、細胞移植群はコントロール群と比べて高い硬組織増加量を認めた。組織学的解析から、欠損内に骨様硬組織と血管様構造物の再生が認められた。
- ③ヒト頬脂肪体由来の脂肪細胞には 40 μm 未満の成熟脂肪細胞が多量に存在し、DFAT を調整した際に骨芽細胞分化誘導後 7 日後にはカルシウムの沈着を認めた。

【結論】一連の結果から DFAT 細胞が口腔領域における再生医療に有用な細胞源であることが示唆された。

マウス皮膚欠損治癒過程における成熟脂肪細胞の形質変換に関する検討

○石川三友紀、萩倉一博、風間智彦、李予昕、松本太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【背景】近年、Genetic-lineage tracingにより、生体内の一部の成熟細胞が脱分化し組織再生に関わることが示されている。一方、成熟脂肪細胞が組織再生に関与しているかは明らかになっていない。今回、成熟脂肪細胞の運命追跡が可能な遺伝子改変マウスに皮膚全層欠損を作製し、治癒過程における成熟脂肪細胞の形質変換および組織再生への関与を検討した。

【方法】tamoxifen 投与により adiponectin 発現細胞特異的に tdTomato (tdT) を発現するマウス (Adipoq-CreERT2/tdT マウス) を実験に用いた。このマウスに tamoxifen を投与後、後背部に皮膚全層欠損創を作製した。経時的に欠損部の組織標本を作製し、免疫組織学的に tdT⁺細胞の解析を行った。また肉芽組織中の細胞を酵素処理により単離し、同様に tdT⁺細胞の形質解析を行った。

【結果】皮膚欠損1週間後には、欠損部の脂肪組織周囲に perilipin⁻ で線維芽細胞様形態を示す tdT⁺ fibroblast-like cell (FLC) の出現を認め、欠損2週間後をピークに肉芽組織内でも確認された。tdT⁺FLCの一部は脂肪前駆細胞マーカー-Dlk1 や MSC マーカー-PDGFRa、Sca-1 を発現しており、また、ペリサイトマーカー-NG2、細胞増殖マーカー-Ki-67 発現細胞も確認された。

【結論】皮膚欠損後の治癒過程で成熟脂肪細胞に由来する線維芽細胞様細胞が出現し、その一部は肉芽組織内で間葉系幹細胞、前駆脂肪細胞、ペリサイトなどの形質を獲得していることが示唆された。

乳癌微小環境における脂肪細胞の形質変換についての検討

○土方浩平^{1),2)}、植草省太²⁾、加藤礼保納^{1),2)}、日高綾乃^{1),2)}、小沼憲祥²⁾、越永従道²⁾、松本太郎¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、²⁾ 日本大学医学部外科学系小児外科学分野

【目的】癌組織の周囲には線維芽細胞やマクロファージなどの間質細胞が存在し、癌細胞との相互作用により癌微小環境を形成し、癌の浸潤や転移に影響を与えていることが明らかにされている。乳癌組織周囲には脂肪細胞が豊富に存在していることから、乳癌により形成される癌微小環境において脂肪細胞の関与が示唆される。一方、乳癌組織周囲の脂肪細胞の挙動や形質変化についてはこれまでに明らかにされていない。本研究では脂肪細胞の運命追跡ができる遺伝子改変マウスを用いて、脂肪組織近傍に乳癌細胞を移植し、その増殖過程における脂肪細胞の挙動や形質変化の有無について検討する。

【方法】タモキシフェン投与によりアディポネクチン発現細胞特異的に赤色蛍光(tdTomato)を発現するマウス(Adipoq-CreERT2/tdT マウス、雌性)を成熟脂肪細胞特異的レポーターマウスとして実験に用いた。タモキシフェン(1mg)を5日間連続で腹腔内投与し、成熟脂肪細胞に tdTomato を発現させた。その後、マウス乳癌細胞株 E0771 を背部皮下(細胞数 1×10^6 個)や乳腺周囲脂肪体(細胞数 1×10^5 個)に移植し、2週間後に腫瘍組織を摘出し、凍結切片標本作製した。蛍光光学顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を用いて腫瘍組織内の tdTomato 陽性細胞の局在を検討するとともに、前駆脂肪細胞、ペリサイト、血管内皮細胞、間葉系幹細胞、癌関連線維芽細胞(CAF)などに対する蛍光免疫染色を行い、観察および定量し、腫瘍組織内における tdTomato 陽性細胞との関連を検討した。

【結果】移植2週間後の乳癌組織内に成熟脂肪細胞マーカーの Perilipin A 陰性で tdTomato 陽性を示す線維芽細胞様細胞(Adipocyte-derived fibroblast-like cells: AFC)の存在が認められた。AFCの一部は体性幹細胞マーカーの Sca-1(背部皮下腫瘍 21%、乳腺周囲脂肪体腫瘍 15%)、PDGFR α (背部皮下腫瘍 0%、乳腺周囲脂肪体腫瘍 5%)、ペリサイトマーカーの NG2(背部皮下腫瘍 0%、乳腺組織腫瘍 18%)を発現していた。一方、CAFマーカーの α -SMA、Fibronectin、FSP-1、血管内皮マーカーの CD31 を発現する AFC は検出されなかった。

【考察】乳癌細胞移植により形成された乳癌組織内には成熟脂肪細胞に由来する線維芽細胞様細胞(AFC)が出現することが明らかになった。AFCの一部は体性幹細胞やペリサイトの形質を発現することが示唆された。乳癌進展過程において周囲の成熟脂肪細胞が形質変換して、体性幹細胞やペリサイトの形質を獲得し、腫瘍内の血管新生などに関与することが示唆された。

Thy1-22-3 抗体腎炎に対する DFAT 細胞療法の効果

○丸山高史¹⁾、福田昇^{1), 2), 3)}、宇都宮慧¹⁾、阿部雅紀¹⁾、松本太郎³⁾

¹⁾ 日本大学医学部腎臓高血圧内分泌内科学、²⁾ 日本大学総合科学研究所、

³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】本学で開発された脱分化脂肪細胞(DFAT)は高い増殖能と間葉系幹細胞と同等の多分化能を有し、調整法も簡便で細胞移植治療の移植細胞源として期待出来る。今回、進行性腎障害モデルである単クローン抗体(mAb)1-22-3 誘発腎炎およびアドリアマイシン腎症ラットへの DFAT 細胞移植効果を検討した。【方法】蛍光ラベルした DFAT を 7 週齢雌性の Wistar ラットに移植して 1 週間後に体内分布を検討した。次に同種ラットで mAb1-22-3 誘発腎炎を事前に作成、腎炎作成 1 カ月後に DFAT を他家移植、移植 1 カ月後に効果を評価した。アドリアマイシン腎症についても同様に効果を検討した。移植細胞数は 10^6 個/頭で、経路は腎動脈又は尾静脈からの 2 種類を設定した。【成績】移植 1 週間後には腎動脈から移植された DFAT は糸球体に、尾静脈から移植された DFAT は肺に存在していた。アドリアマイシン腎症では尿蛋白排泄量、血清 BUN、Cre 値、腎組織において DFAT 細胞移植の効果は認められなかった。mAb1-22-3 誘発腎炎では移植の効果が確認され、特に尾静脈から全身投与した群でより大きな効果が見られた。腎組織内での TSG-6 および TNF- α mRNA 発現は、腎炎群より移植群が有意に上昇して IL-6 と IL-12 β は抑制されていた。血清 TSG-6 濃度は移植群の方が有意に上昇していた。一方 TSG-6 siRNA により DFAT の TSG-6 の発現をノックダウンして移植を行った場合、移植による尿蛋白抑制効果や組織改善効果が消失した。DFAT の自家移植では腎症改善効果は同等だった。他の結果として FACS 解析において脾臓内の T reg の割合を測定したが各群とも有意差は得られなかった。in vitro では培養 DFAT に TNF- α を添付すると線維芽細胞より培養上清中 TSG-6 濃度は上昇した。又 DFAT と SHR-SP のメサングウム細胞をトランスウエルで培養した場合、単独培養よりも TSG-6 の細胞内発現や培養上清中濃度は上昇していた。【結論】以上の結果から DFAT の細胞移植の腎症改善の機序として、間葉系幹細胞の性質を有する DFAT の TSG-6 を中心とした全身の免疫調整作用が考えられた。今後 ANCA 関連腎炎やループス腎炎など予後不良の免疫性腎炎に臨床応用出来る可能性が示唆された。

Induction kidney organoid from disease-specific iPS cells

OLan Chen¹⁾、 Noboru Fukuda^{1), 2)}、 Akiko Tsunemi²⁾、 Sho Tanaka²⁾、 Asako Oguni³⁾、 Kosuke Saito³⁾、
Kyoko Fujiwara³⁾、 Masanori Abe²⁾、 Taro Matsumoto¹⁾

¹⁾Division of Cell Transplantation and Regeneration, Department of Functional Morphology, Nihon University School of Medicine,

²⁾Division of Nephrology Hypertension Endocrinology, Department of Medicine, Nihon University School of Medicine,

³⁾Department of General Medicine, Nihon University School of Medicine,

Objective: Kidney organoids generated from human iPS cells contain nephrons with a collecting duct network, renal interstitial and endothelial cells. They showed highest congruence with human fetal kidney. Nephrogenic diabetes insipidus (NDI) is characterized by defective urine concentration mechanisms in the kidney, which are mainly caused by loss-of-function mutations in the vasopressin type 2 receptor in collecting duct. In polycystic kidney disease (PKD), increased renal GSK3 β expression corresponds with the rise in cAMP levels is associated with abnormal response of collecting duct cells to AVP, mediating fluid secretion and cyst expansion. To analyze functions of collecting duct cells differentiated from the disease-specific iPS cells derived from NDI and PKD patients. To develop in vitro vasopressin stimulating test, we will establish the disease-specific iPS cells from peripheral blood mononuclear and differentiate the disease-specific iPS cells to collecting duct cells on which we will perform the vasopressin stimulating test.

Methods: iPSC was adapted into matrigel and differentiated in MEF-conditioned KSR medium, containing bFGF. To make kidney organoids, duration of CHIR99021 determines the ratio of collecting duct/nephron in the organoid. Cells were cultured with refreshing the FGF9 medium. To eliminate undifferentiated iPS contamination, cells were incubated with rBC2LCN-PE23.

Results: We succeed in making kidney organoid from iPS cells, confirmed collecting duct cells exist by marker confirmation of E-cadherin, Vasopressin type 2 receptor and aquaporin 2 for collecting duct cells. But there were undifferentiated iPS cells exist in the kidney organoid by marker confirmation of Nanog, OCT4, rBC2LCN-FITC for iPS cells.

Conclusion: We succeed in inducing kidney organoid and acquiring collecting duct cells from iPS cells, but there were undifferentiated iPS cells contamination, next step we will try to eliminate these undifferentiated iPS cells by rBC2LCN-PE23 which is designed for undifferentiated iPS cells elimination.

成果発表⑦

補体 C3 は腎尿細管上皮間葉化(EMT)により腎内 RAS を活性化し塩分感受性高血圧を起こす。

ゲノム編集技術による C3 ノックアウト SHR での検討

根岸英理子¹⁾、○福田昇^{1), 2), 3)}、片川まゆみ³⁾、阿部雅紀¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部腎臓高血圧内分泌内科学、²⁾ 日本大学総合科学研究所、

³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】最近、補体 C3 に間葉系幹細胞、間葉系細胞の脱分化性を保つ作用が認められている。我々は SHR の間葉組織では補体 C3 が高発現している事、また補体 C3 は EMT により組織 RA 系を活性化し高血圧に関与している事を報告した。今回、SHR よりジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)法により C3 ノックアウト(KO) SHR を確立し、血圧、表現形、血管腎臓の組織、遺伝子発現を *in vivo* および *in vitro* で検討した。【方法】C3 遺伝子に対する ZFN mRNA を SHR/Izm 受精卵にインジェクションし、C3 KO SHR/Izm を系統樹立した。WKY、SHR、C3 KO SHR を正塩および高塩食とし、血圧を Tail cuff 法およびテレメトリー法でモニタリングした。生直後、8、20 週齢の大動脈、心臓、腎臓を取り出し組織学的評価、SMemb、レニン、KLF-5、E-カドヘリン発現を評価した。*In vitro* で WKY、SHR 及び C3 KO SHR 由来腎メサンジウム細胞(MC)の増殖能、合成型形質マーカーオステオポンチン発現を評価した。【成績】C3 KO SHR の SBP は、SHR より約 20 mmHg 低く、Tail cuff 法およびテレメトリー法とも塩分負荷で観られた SHR お血圧の上昇が C3 KO SHR では抑制されていた。生直後の腎髄質 SMemb 発現は SHR で亢進し、C3 KO SHR で抑制されていた。SHR の腎髄質でレニン、KLF-5 発現が亢進し、C3 KO SHR では低下していた。また SHR の腎髄質では E-カドヘリン発現が低下し、EMT が起こっていたが、C3 KO SHR では抑制されていた。SHR 由来メサンジウム細胞の細胞増殖は WKY に比し亢進し、C3 KO SHR の MC では増殖が抑制されていた。*In vitro* では SHR 由来腎メサンジウム細胞では増殖が亢進し、オステオポンチン mRNA 発現は亢進していたが、C3 KO SHR 由来メサンジウム細胞では抑制されていた。【結論】補体 C3 は SHR で間葉系組織を合成型形質に変換し、また EMT により腎内 RA 系を亢進し、塩分感受性高血圧に関与している事が示され、SHR の高血圧の発症、病態の一義的因子であると考えられた。

DFAT の血管新生効果および壁細胞分化

○渡邊拓史¹⁾、石川三友紀²⁾、長岡悠紀²⁾、山元智衣²⁾、風間智彦²⁾、萩倉一博²⁾、松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部小児科学小児科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】成熟脂肪細胞を天井培養することにより得られる細胞を DFAT (Dedifferentiated fat cells) と呼び、MSC (Mesenchymal stem cell) と同様の多分化能を有する可能性があることが知られている。以前の我々の検討において、マウス下肢虚血モデルへの DFAT 移植により局所の血流が改善することが示された。しかし DFAT の血管新生効果については、まだ機序が不明な部分が多い。今回我々は、DFAT の共培養による血管内皮細胞に与える作用と DFAT の前駆脂肪細胞を経た血管構成細胞への分化能について検討した。

【方法】1. マウス成熟脂肪細胞の天井培養を行い、DFAT を調製する。2. 血管内皮細胞と DFAT との共培養により血管内皮細胞の遊走能・増殖能・管腔形成能の変化を評価する。3. 血管内皮細胞と DFAT との共培養により DFAT における壁細胞マーカーの発現を qPCR、免疫染色で評価する。4. TGF β 1 刺激および阻害による DFAT の壁細胞マーカーの発現の変化 qPCR、免疫染色で評価する。

【結果】血管内皮細胞はマウス DFAT の存在下で遊走能・増殖能が亢進した。またコラーゲンゲル内で血管内皮細胞と DFAT を3次元培養すると、DFAT は血管内皮細胞の管腔形成能を亢進させ、管腔周囲に遊走・接着した。また内皮細胞との共培養により DFAT の壁細胞マーカーの発現が亢進した。さらに TGF β 1 刺激により DFAT の壁細胞マーカーの発現は亢進し、阻害により低下した。

【結論】DFAT は血管内皮細胞の遊走能・増殖能・管腔形成能を亢進させ、血管新生を促進することに加え、血管構成細胞である壁細胞へ分化する可能性が示された。さらに壁細胞分化には TGF β 1 を介するシグナルが重要であることが示唆された。

成果発表⑨

ビタミンDシグナルの脂肪細胞脱分化過程における部分的関与の可能性と細胞治療法への応用

○石澤通康¹⁾、風間智彦²⁾、萩倉一博²⁾、松本太郎²⁾、槇島誠¹⁾

¹⁾日本大学医学部生体機能医学系生化学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】リガンド依存性転写因子であるビタミンD受容体(Vitamin D receptor; VDR)は、血中カルシウム濃度の維持や骨代謝活性化、骨細胞の分化誘導など、生体内カルシウム恒常性維持に重要な活性型ビタミンDの受容体であり、核内受容体スーパーファミリーの一種である。また、活性型ビタミンDが前駆脂肪細胞の分化を促進することや、VDR欠損マウスでは脂肪蓄積が少ないという特徴が見られるなど、ビタミンD-VDRシグナルの脂肪細胞分化への影響が報告されている。本研究では成熟脂肪細胞の脱分化過程における遺伝子変化に対してビタミンDシグナルの影響を検討した。更に、ヒト脱分化脂肪細胞(hDFAT)を効率的に再分化誘導可能な組織選択的活性を有する薬剤開発を目的とした。

【方法と結果】①天井培養1週間後の成熟脂肪細胞において、脂肪細胞のマーカー分子である peroxisome proliferator activated receptor γ 2 (Ppar γ 2)、CCAAT-enhancer-binding protein α (C/ebp α)、C/ebp β の mRNA レベルが減少した。活性型ビタミンD添加培地ではこれら脂肪細胞マーカー分子の発現減少が軽減された。VDR欠損マウスにおいても、天井培養1週間後で、野生型マウスと同様に脂肪分化マーカーの発現レベルが減少したが、脂肪分化マーカーの発現レベルは野生型よりも低かった。ブタの成熟脂肪細胞の脱分化過程で発現増加する Fibronectin 1 やその受容体である Integrin α 5 は、マウス成熟脂肪細胞の脱分化過程でも発現増加するが、活性型ビタミンD添加により、更に発現が増加した。②hDFATの骨芽細胞への再分化誘導時に活性型ビタミンD 或いは各種組織由来細胞株において選択的活性を有するビタミンD誘導体を添加したところ、いずれの化合物においても再分化誘導7日後のアルカリフォスファターゼ活性の増強が認められた。

【結論】①活性型ビタミンD及びVDRはマウス脂肪細胞の脱分化過程において発現変化する遺伝子群に部分的に関与した。他の薬剤、培養材料(フラスコのコーティングなど)と組み合わせることで、脱分化効率の制御が期待できる。②活性型ビタミンD及び組織選択的VDRアゴニストであるビタミンD誘導体は、hDFATの骨芽細胞への再分化効率を増強した。損傷部位へのDFATの注入治療法等において、これらVDRアゴニストを細胞と同時に注入することで、損傷部位の治療効果の増強が期待できる。

脱分化脂肪細胞に由来する肝細胞は中心静脈周辺領域の肝細胞の特性をもつ

○萩原玲子、沖嘉尚、加野浩一郎

日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

【目的】我々は、種々の動物の脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を体外培養すると、自発的に脱分化し、線維芽細胞様の脱分化脂肪細胞（DFAT）になることを明らかにしている。平成 29 年度研究成果報告会において、肝幹細胞および肝細胞の遺伝子発現プロファイルの網羅的解析によって抽出した遺伝子を DFAT に導入すると、Alb および Tat 遺伝子を発現する肝細胞様細胞へ分化することを報告した。一方、肝細胞は肝小葉内の領域（門脈周辺 zone1、中心静脈周辺 zone3、それらの中間 zone2）によって異なる機能をもつことが知られているが、DFAT に由来する肝細胞が zone1~3 のいずれの特性をもつのかについては明らかではない。本研究では、DFAT 由来の肝細胞（DFAT-Hep）における zone 特異的な機能を明らかにする目的で行った。

【材料および方法】抽出した遺伝子を導入した DFAT をコラーゲンコートディッシュに播種し、0.1 μ M デキサメタゾン、10 mM ニコチンアミドを含む DMEM/F12 培地で肝分化誘導した。分化誘導前および分化誘導 14 日後に細胞形態を観察したのち、定法にしたがって細胞の全 RNA を抽出した。リアルタイム RT-PCR 法を用いて、肝細胞特異的遺伝子および zone 特異的遺伝子の発現状況を調べた。また、肝細胞特異的機能の発現については、免疫蛍光染色法および PAS 染色法を用いて調べた。

【結果】肝細胞特異的遺伝子および機能の発現を調べた結果、Afp、Tdo2 遺伝子の発現や、アルブミンおよびグリコーゲンの合成が認められた。zone 特異的遺伝子の発現を調べた結果、zone3 特異的遺伝子である Cyp1a2、Cyp2e1、Cyp2a4、Cyp7a1 および Lgr5 の発現が認められた。

【結論】DFAT 由来の肝細胞は zone3 の特性をもつことが示唆された。また、zone3 の肝細胞は高い薬物代謝能をもつことから、DFAT-Hep は創薬研究への応用展開が期待される。

皮膚再生医療における脱分化脂肪細胞 (DFAT) の効果に関する検討

○副島一孝¹⁾、 櫻村勉¹⁾、 風間智彦²⁾、 仲沢弘明¹⁾、 松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】再生医療技術を応用した皮膚再建法として人工真皮と培養表皮がある。人工真皮はブタやウシの皮膚より抽出したコラーゲンをスポンジ状に加工したものを真皮構築の scaffold として利用するものであり、本邦でも市販され臨床に供されている。真皮欠損創に移植すると、宿主よりの細胞・毛細血管が侵入して真皮様組織を構築するものであるが、真皮構築に 2-3 週間を要する点が問題とされている。培養表皮については自家培養表皮(JACE®, J-TEC 社製)が本邦ではじめて認可された再生医療製品である。体表面積の 30%以上を占める広範囲重傷熱傷の治療に対して保険適応となっているが、自家培養表皮移植後の基底膜構築遅延による移植皮膚の長期脆弱性が問題とされている。われわれは、上記の問題点解決のために脱分化脂肪細胞(DFAT)を導入し、その有用性の検討を行ってきたので、今までに得られた知見を報告する。

【方法】①人工真皮に関する検討:DFAT は SD 系ラットの腹腔内脂肪より単離・培養した。同種同系ラット背部に全層皮膚欠損創を作製し、人工真皮(Pelnac 標準タイプ、グンゼ社製)を移植するモデルを作製した。人工真皮移植に際して、以下の 4 群を作成した。I 群:対照群(未治療)、II 群:DFAT(0.5×10^5 cell)治療群、III 群:bFGF 治療群(bFGF 製剤 科研製薬社製 $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)。人工真皮移植後 2, 7 日目に標本作製し組織学的に検討した。②培養表皮に関する検討:LWD 系 SPF ブタより全層皮膚、皮下脂肪を採取して Green 型培養表皮および DFAT 細胞を調整した。同一個体ブタの背部に III 度熱傷創を模して脂肪露出全層皮膚欠損創を作成し、人工真皮(Pelnac、グンゼ)により真皮再建を行い、対照群(未治療)と DFAT 治療群(0.5×10^5 cell/ cm^2)を作成した。その 10 日後に再建真皮上に自家培養表皮を移植した。培養表皮移植後 14 日目に開創して評価を行った。

【結果】①人工真皮に関する検討:移植後 2 日目には IV 群のみで人工真皮下層に新生血管の侵入が観察された。7 日目には II, III, IV 群で真皮様組織構築の促進が観られたが、その効果は IV 群で最も著明であった。②培養表皮に関する検討:表皮真皮接着層の免疫染色像では主要な基底膜構成タンパクである collagen IV、laminin が DFAT 治療群で有意に発現が増強し、TEM 像で、DFAT 治療群で基底膜(BM)構築と anchoring fibril(AF)形成が促進されていた。

【結論】人工真皮移植に際して DFAT および bFGF による治療を行うと真皮様組織の構築促進効果が認められたが、それらを併用することにより促進効果は著明となり、人工真皮内への血管侵入も著明に促進され、真皮構築期間の著明な短縮に寄与することが明らかとなった。培養表皮移植に際しては、DFAT が基底膜構成タンパクの発現促進に寄与し培養表皮生着促進に有用であることが示唆された。

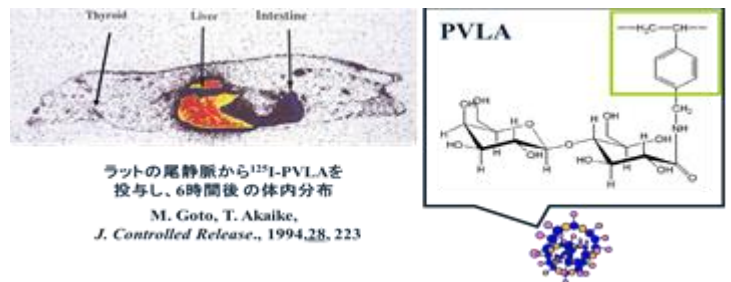
細胞認識性バイオマテリアルによる医療の革新

—カドヘリンマトリックス工学・糖鎖マトリックス工学の再生医療への応用—

赤池 敏宏 先生

国際科学振興財団・再生医工学バイオマテリアル研究所(東京工業大学名誉教授)

我々は 35 年前に肝実質細胞特異的認識機能を有し簡単にポリスチレンなどの疎水性表面に単分子コートできる合成糖鎖高分子 PVLA の設計開発に成功した。(Markromol. Chem., Rapid Commun. 7, 645-650, 1986) 肝実質細胞を選択的に接着しその分化機能を促進維持する新しいマトリックスとしてデビューし、一部は商品化された。PVLA は、肝細胞に特異的に認識される高分子ミセルでありガラクトース残基を有する PVLA のみが、肝臓細胞上のアシアロ糖タンパク質レセプター(AS-R)に特異的に認識された。この特異性は 10⁻⁹ 程度の結合定数を示すなど、アビジン-ビオチン間の相互作用にも匹敵する強固な認識であった。PVLA は肝実質細胞とのみ特異的相互作用を示し、他のどの細胞にもこれほど強い相互作用を示すことはなく、むしろ非常に低い接着力を示すか皆無である場合が多い。PVLA ミセルを尾静脈を介してラット血中に投与すると数時間以内に肝臓の細胞に集積し、興味深いことに一万を超える分子量を持つ高分子でありながら肝臓から体外へ胆汁酸排泄された。(J.Controlled Release.28(1994)223-233) 一方、10年ほど前から上図に示すように同じように疎水性表面に対して安定なコーティングが可能な両親媒性タンパク質として E-カドヘリンの細胞外ドメインをキメラ化した固定型 E-cad-Fc を新しいタイプの細胞認識性バイオマテリアルとして開発し、ES 細胞を筆頭に E カドヘリン発現細胞の新しい培養方法として応用を試みた。(PLoS ONE, 1, e15, 2006 他多数) E-cad-Fc は E-カドヘリン分子の細胞外ドメインと抗体 IgG (Immunoglobulin G) の Fc 領域を融合化したキメラタンパク質である。E-カドヘリン分子を介した細胞—細胞間接着機構を細胞—基質間接着機構に置き換える画期的モデル分子となった。未処理ポリスチレンの表面のような疎水性表面上にはその水溶液から安定かつ容易に固定化ができる。固定化された E-cad-Fc キメラタンパク質マトリックス上でマウス ES 細胞は単一細胞レベルで分散しながら未分化維持増殖できる全く新しい画期的な培養システムである。この単一細胞レベルでの ES/iPS 細胞の新規培養システムは、サイトカインなど液性因子の作用に不均一性を生じないため、すべての細胞においては直接的に均一なシグナルの刺激を与え、それまでのコロニー形成型培養法の決定的欠点を解決できた。E-cad-Fc キメラタンパク質の画期的な利点は一つの人



細胞認識バイオマテリアルとしてのキメラ抗体の開発



工の細胞外ドメインをキメラ化した固定型 E-cad-Fc を新しいタイプの細胞認識性バイオマテリアルとして開発し、ES 細胞を筆頭に E カドヘリン発現細胞の新しい培養方法として応用を試みた。(PLoS ONE, 1, e15, 2006 他多数) E-cad-Fc は E-カドヘリン分子の細胞外ドメインと抗体 IgG (Immunoglobulin G) の Fc 領域を融合化したキメラタンパク質である。E-カドヘリン分子を介した細胞—細胞間接着機構を細胞—基質間接着機構に置き換える画期的モデル分子となった。未処理ポリスチレンの表面のような疎水性表面上にはその水溶液から安定かつ容易に固定化ができる。固定化された E-cad-Fc キメラタンパク質マトリックス上でマウス ES 細胞は単一細胞レベルで分散しながら未分化維持増殖できる全く新しい画期的な培養システムである。この単一細胞レベルでの ES/iPS 細胞の新規培養システムは、サイトカインなど液性因子の作用に不均一性を生じないため、すべての細胞においては直接的に均一なシグナルの刺激を与え、それまでのコロニー形成型培養法の決定的欠点を解決できた。E-cad-Fc キメラタンパク質の画期的な利点は一つの人工タンパク質分子でありながら生き物(細胞)と人工物(シャーレ)に同時に安定に接着できる機能を持ち、E-カドヘリン分子の生理活性発現を達成できることである。これにより今までに不可能であった単一細胞レベルの ES/iPS 細胞の培養システムを実現できることとなった。もちろん、未分化な ES/iPS 細胞から肝細胞や神経細胞への分化誘導に関する研究も精力的に行い報告している。さらに上記の PVLA と E-cad-Fc を組み合わせて共固定すると iPS 細胞を未分化で増殖させ、固定 PVLA 分子が分化初期の AS-R への刺激を加えることで、iPS 細胞から肝細胞への分化が加速促進された。我々は細胞を特異的に認識し固定できる様々なナノバイオマテリアルの設計を通じて安全性の高い標的(臓器・細胞)指向性の治療システムの開発に向けて、共同研究によりマラリアはもちろん、各種臓器の感染症・線維症・ガンへの治療・応用を目指したい。