

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11384

研究課題名(和文) 骨髄間葉系前駆細胞を用いた次世代型血管新生療法の基礎的解析

研究課題名(英文) Basic analysis of next-generation type angiogenesis therapy with Fibrocyte

研究代表者

大西 清 (Onishi, Kiyoshi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：30194228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：組織修復における線維芽細胞の由来は長年不明であったが、近年一部の線維芽細胞は骨髄細胞由来であることが判明しFibrocyteと名付けられた。これまでの研究では、in vivoにて、bFGF投与ラットではFibrocyteが集積しこの細胞が血管新生に関与していることを証明した。本研究では、この事象をin vitroで検証した。in vitroにおいても、bFGFによる管腔様構造の形成、Fibrocyteの出現が定性的かつ定量的に確認された。このことは、in vitroにおいてもbFGF誘導性CD34+Procollagen +Fibrocyteによる血管新生を示唆するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、Fibrocyteによる血管新生メカニズムの一部が解明された。血管新生において血管内皮前駆細胞(Endothelial progenitor cell: EPC) 以外の細胞としてFibrocyte の関与を実証することになった。これは創部修復組織から誘導可能なFibrocyte単独移植による血管新生療法が可能であることを意味する。さらに創部修復組織から誘導しex vivo増幅したFibrocyte 単独移植療法による糖尿病等の難治性皮膚潰瘍の血管新生療法開発が期待でき、今後さらに本研究が発展すれば新たな血管新生療法の創生が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Our previous in vivo studies demonstrated induction of CD34+Procollagen + Fibrocytes by bFGF in wounds, leading to capillary like structure formation. In this study, to identify an capability of bFGF for capillary like structure formation in vitro, we developed 3D collagen gel system seeded with skin granulation tissues treated with bFGF. Collagen gel disc seeded with bFGF treated granulation tissues cells (bFGF group) demonstrated capillary-like structures formation composed of endothelial-like cells. Real time PCR analysis showed a significant increase in CD34 and Procollagen mRNA expression in the bFGF group. Furthermore, double IF staining showed a significant increase in numbers of CD34+Procollagen + Fibrocytes in the bFGF group with capillary like structure formation. Our present analysis confirmed that bFGF can induce capillary-like structures composed of CD34+Procollagen +Fibrocyte in collagen gel three-dimensional culture.

研究分野：創傷治癒

キーワード：Fibrocyte bFGF 血管新生 コラーゲンゲル

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒の組織修復は複雑な細胞間相互作用で実行され、血液由来細胞の役割は未だ不明である。中でも骨髄間葉系細胞 Fibrocyte による修復組織の血管新生メカニズムは全く明らかになっていない。in vitro 実験系から Fibrocyte は線維芽細胞に分化して線維化に寄与することが推定されているが、しかし複雑な細胞成分から成り立つ修復組織では Fibrocyte に多彩な機能が推定される。特に、Fibrocyte は線維化以外の組織修復に関与するのか、Fibrocyte を誘導するサイトカインと特異性は何かなどについては解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

皮膚の創傷治癒過程における骨髄由来の間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の機能を解明するため、血管増殖因子による Fibrocyte 誘導能、bFGF 誘導性 Fibrocyte による血管新生能を細胞可視解析や蛋白 mRNA 発現性から検討し、血管新生の新規メカニズムとして bFGF 誘導性 Fibrocyte の関与を確立する。これにより骨髄血球由来 Fibrocyte の組織修復における統御機構を明確にし、将来的には ex vivo 誘導性 Fibrocyte の移植療法による効率的な傷害臓器の治癒促進法確立を目的とした基礎的実験系を確立する。

3. 研究の方法

本研究は、ラット背部に作成した全層性皮膚潰瘍から採取した組織の解析を行う in vivo 系の実験(フェーズ1)とフェーズ1で採取した組織をコラーゲンゲル培地に移植・培養しその組織の解析を行う in vitro 系の実験(フェーズ2)に大きく分けられる。フェーズ1、フェーズ2のそれぞれの実験系において、組織の免疫染色、構造解析、Real-time PCR による mRNA の発現解析などを施行し、定性的かつ定量的に評価を行った。

<フェーズ1 in vivo 解析>

Sprague-Dawley rats(日本クレア,12週齢,雌)の背部に生検用トレパンを用いて全層性皮膚潰瘍を作成する。潰瘍部に bFGF, VEGF, PBS(control)を投与し、数日後に形成された肉芽組織を採取し解析を行う。組織の HE 染色および免疫二重染色(CD34, Procollagen)を行い、Fibrocyte の同定と Fibrocyte による血管新生能を評価する。また組織から RNA の抽出を行い Real-time PCR にて CD34, collagen type I, CXCR4, CXCL12 等の mRNA 発現性を定量的に評価し、bFGF と Fibrocyte の発現性について評価を行う。

<フェーズ2 in vitro 解析>

SD ラット(日本クレア,雄,12週齢)の背部に生検用トレパンを用いて全層性皮膚潰瘍を作成する。潰瘍部に bFGF, VEGF, PBS(control)を投与し、数日後に形成された肉芽組織を採取する。採取した肉芽組織を細かく破砕し、コラーゲンゲル培地(Cell matrix type-A)に移植し3次的に培養を行う。培養された組織の HE 染色および免疫二重染色(CD34, Procollagen)を行い、Fibrocyte の同定と Fibrocyte による血管新生能を評価する。また組織から RNA の抽出を行い Real-time PCR にて CD34, collagen type I, CXCR4, CXCL12 等の mRNA 発現性を定量的に評価し、bFGF と Fibrocyte の発現性について評価を行う。

4. 研究成果

<フェーズ1 in vivo 解析>

4日目の肉芽組織を採取し CD34 と procollagen I による免疫二重染色を行った結果が図1である。細胞核は DAPI により青く染色され、CD34 は緑、procollagen I は赤く染まっている。3者を合成した Merge を見ると黄色く染まっている細胞(矢印)があり、これが CD34 と procollagen I の共陽性を示す CD34+Procollagen I +Fibrocyte である。またこの CD34+Procollagen I +Fibrocyte がつらなり管腔様の構造すなわち血管構造を形成していることが確認された。これらを定量的に評価したのが図2である。左は CD34+Procollagen I +Fibrocyte の細胞数を、右は血管構造の数を示している。このグラフから bFGF を投与したグループでは、コントロールグループや同じく血管促進因子である VEGF グループに比して統計学的に有意な CD34+Procollagen I +Fibrocyte の細胞と血管構造の増加が確認された。さらに、図3は real-time PCR により CD34 と collagen I の mRNA 発現性を検討したグラフであるが、ここでも bFGF グループでは有意な発現増加が確認され、蛋白発現レベルでも前

述の図2が証明された。

<フェーズ2 in vitro 解析>

コラーゲンゲル内で3次的に4日間培養された組織を採取し、上記のフェーズ1同様にCD34とprocollagenによる免疫二重染色を行いCD34+Procollagen +Fibrocyteの細胞数と血管様構造数を検討したところ、フェーズ1と同じくbFGFグループでは他の2グループに比して統計学的に有意な増加が確認された。またreal-time PCRを用いたCD34とcollagenのmRNA発現性の検討でも同様の結果が確認された。特にin vitroの実験では、in vivoの実験に比べてこれらの特徴が顕著となる傾向が見られ、コラーゲンゲルによる3次元培養の有用性が示された。さらには、近年Fibrocyteのマーカーとして注目されているCXCR4/CXCL12についても検討を行ったところ、CD34+Procollagen +FibrocyteではCXCR4の発現が確認された。bFGFグループでは、CXCR4/CXCL12の発現性は有意に増加しており、bFGFによるCD34+Procollagen +FibrocyteとCXCR4/CXCL12の関与について新たな知見が得られた。

以上、in vivo系、in vitro系の実験を通じて、本研究では骨髄間葉系由来Fibrocyteの組織修復における挙動およびbFGFとの関連性が部分的にはあるが明らかとなった。具体的には、bFGFはCXCL12-CXCR4シグナル増加を介してCD34+Procollagen I +Fibrocyteを誘導し、このFibrocyteが創部の血管新生の促進に関与しているということである。今後はこの研究をさらに発展させることで、難治性の皮膚障害等における新規の血管新生療法などの開発が可能になると考えられる。

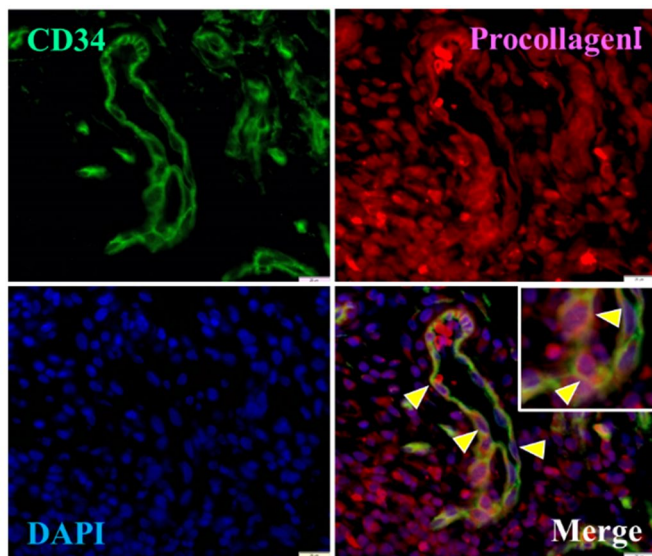


図1

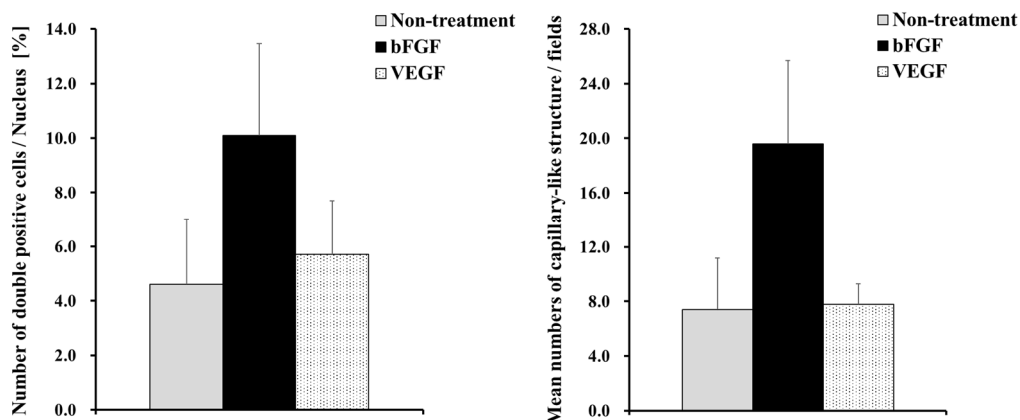
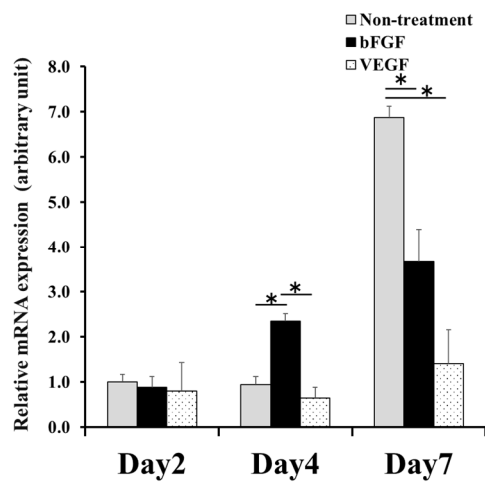
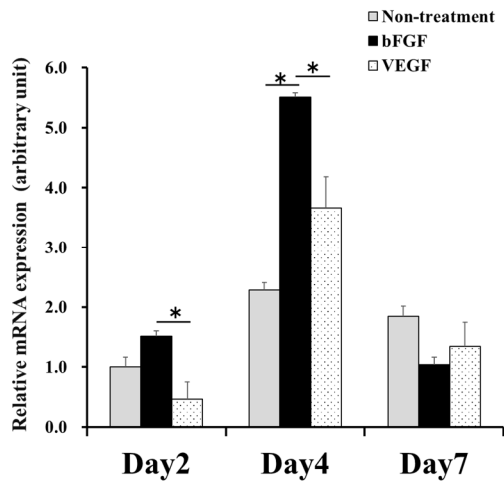


図2



3

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yoshikiyo Akasaka	4. 巻 3 (2)
2. 論文標題 Tissue repair mediated by basic fibroblast growth factor in wounds.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Toho Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 52-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miho Nakamichi, Yuri Akishima-Fukasawa, Chie Fujisawa, Tetuo Mikami, Kiyoshi Onishi, Yoshikiyo Akasaka	4. 巻 186
2. 論文標題 Basic fibroblast growth factor induces angiogenic properties of fibrocytes to stimulate vascular formation during wound healing	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 3203-3216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2016.08.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 岡根谷哲哉, 中道美保, 藤澤千恵, 青木茂久, 三上哲夫, 大西清, 赤坂喜清
2. 発表標題 組織修復における骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte) による血管新生メカニズム
3. 学会等名 第37回分子病理学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡根谷哲哉, 中道美保, 藤澤千恵, 青木茂久, 荻野晶弘, 岡田恵美, 三上哲夫, 大西清, 赤坂喜清
2. 発表標題 コラーゲンゲル3次元培養による肉芽組織からの骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の誘導
3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡根谷哲哉、中道美保、藤澤千恵、青木茂久、荻野晶弘、岡田恵美、三上哲夫、大西清、赤坂喜清
2. 発表標題 創部組織からの骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の誘導とbFGFの関与
3. 学会等名 第48回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡根谷哲哉、中道美保
2. 発表標題 骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)による血管形成誘導能の証明
3. 学会等名 第153回東邦医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤澤 千恵、青木 茂久、岡根谷 哲哉、中道 美保、深澤 由里、本間 尚子、大西 清、三上 哲夫、赤坂 喜清
2. 発表標題 コラーゲンゲル三次元培養による骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の誘導 と管腔様構造の形成
3. 学会等名 第 107 回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshikiyo Akasaka, Chie Fujisawa, Tetsuya Okaneya, Miho Nakamichi, Yuri Akishima-Fukasawa, Naoko Honma, Sachie Kanada, Tetsuo Mikami
2. 発表標題 Possible role of bFGF-induced miR146b-5p expression in wounds for tissue repair.
3. 学会等名 The 107th Annual Meeting of The Japanese Society of Pathology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiaki Akasaka, Tetsuya Okaneya, Chie Fujisawa, Miho Nakamichi, Kiyoshi Onishi, Yuri Akishima-Fukasawa, Naoko Honma, Tetuo Mikami
2. 発表標題 Phenotypic Change In Angiogenic Fibrocytes In Planter Decubitus Ulcers In Rats.
3. 学会等名 2018 WHS Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡根谷哲哉, 中道美保, 藤澤千恵, 木村裕美, 青木茂久, 武田慶, 荻野晶弘, 岡田恵美, 三上哲夫, 大西清, 赤坂喜清
2. 発表標題 創傷治癒における肉芽組織細胞による管腔様構造の形成とbFGFの関与
3. 学会等名 第47回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中道美保, 岡根谷哲哉, 藤澤千恵, 深澤由里, 三上哲夫, 河越尚幸, 今井常彦, 瓜田純久, 大西清, 赤坂喜清
2. 発表標題 ラット隆起性皮膚病変における骨髄間葉系前駆細胞 (Fibrocyte) の発現変化と血管新生
3. 学会等名 第47回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤坂喜清 藤澤千恵 中道美保 岡根谷哲哉 深澤由里 大西清 三上哲夫
2. 発表標題 創傷治癒の癒痕線維化を制御するmicroRNAの探索と機能解析
3. 学会等名 第47回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中道美保
2. 発表標題 Basic fibroblast growth factor induces angiogenic properties of fibrocytes to stimulate vascular formation during wound healing
3. 学会等名 第71回東邦医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡根谷哲哉, 中道美保, 藤澤千恵, 青木茂久, 武田慶, 荻野晶弘, 岡田恵美, 三上哲夫, 大西清, 赤坂喜清
2. 発表標題 創傷治癒における修復細胞による血管新生とbFGFの関与
3. 学会等名 第26回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshikiyo Akasaka, Miho Nakamichi, Chie Fujisawa, Yuri Fukasawa, Naoko Honma, Kiyoshi Onishi, Tetuo Mikami
2. 発表標題 bFGF Enhances Vascular Formation through Induction of Angiogenic Properties of Fibrocytes in Wounds
3. 学会等名 The 106th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshikiyo Akasaka, Miho Nakamichi, Chie Fujisawa, Kiyoshi Onishi, Tetsuya Okaneya, Yuri Akishima-Fukasawa, Naoko Honma, Tetsuo Mikami
2. 発表標題 Induction of angiogenic properties of brocytes by bFGF leading to vascular formation during wound healing
3. 学会等名 Wound Healing Society 29th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中道美保、深澤由里、藤澤千恵、三上哲夫、大西 清、赤坂喜清
2. 発表標題 骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)による新規の血管新生メカニズムの解明
3. 学会等名 第46回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中道美保、赤坂喜清、荻野晶弘、望月聖太、岡田恵美、大西 清
2. 発表標題 骨髄間葉系前駆細胞 (Fibrocyte) による新規の血管新生メカニズムと組織修復
3. 学会等名 第25回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yoshikiyo Akasaka, Miho Nakamichi, Naomi Inomata, Yuri Akishima-Fukasawa, Toshio Kinoshita, Kiyoshi Onishi, Tetuo Mikami
2. 発表標題 Induction of CD34+/pro-collagen I+ fibrocytes in granulation tissues following bFGF injection into rat skin ulcer.
3. 学会等名 2016 Wound Healing Society annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中道美保
2. 発表標題 骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)による新規の血管新生メカニズム
3. 学会等名 第148回東邦医学会例会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡田 恵美 (Okada Emi) (50318242)	東邦大学・医学部・准教授 (32661)	
研究分担者	赤坂 喜清 (Akasaka Yoshikiyo) (60202511)	東邦大学・医学部・教授 (32661)	
研究分担者	荻野 晶弘 (Ogino Akihiro) (70385657)	東邦大学・医学部・准教授 (32661)	