

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09559

研究課題名（和文）創傷治癒をシステムで理解する：間質細胞の傷害刺激感知から血管新生増強まで

研究課題名（英文）Synergistic Cooperation of Heterogeneous Stromal Cells for Wound Repair Priming

研究代表者

岸本 聡子 (Kishimoto, Satoko)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：10511488

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）：我々は、脂肪組織に対する外科的な傷害刺激によって、脂肪由来の間質血管分画（stromal vascular fractions; SVFs）が再現性よく増加し、再編成されることを示した。我々はこの現象を「創傷治癒プライミング」と名付け、この現象を再現する方法を開発し、そのメカニズムを調べた。その結果、SVFsのプライミングには、脂肪実質の寸断（傷害）と皮下脂肪栄養動脈の結紮（虚血）という2つの外科的処置が必要であることが明らかになった。プライミングされたSVFsは、創傷治癒時にその細胞成分を迅速に再編成し、常駐する間質細胞と動員された免疫細胞が協働して、虚血組織に効果的な血管新生をもたらした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、異種雑多な間質細胞が創傷治癒というゴールを目指してチームとして機能するという新たな概念（創傷治癒プライミング）を提唱し、そのメカニズムについて研究することに学術的な意義があると考え、臨床現場で移植細胞の品質を均一に確保することが難しいという問題を解決するには、将来的に、外科的なプライミングと同等の効果が得られるアプローチ、例えば自然免疫シグナルを刺激する化学物質を用いたプライミングなどが有望な代替手段となり得る。このような化学的・薬理的なプライミングは、重症虚血肢などの虚血性心血管疾患に対する効果的な血管新生療法の開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We show that surgical treatments for adipose tissue reproducibly increase and reorganize adipose-derived stromal vascular fractions (SVFs). We term this phenomenon “wound repair priming” and subsequently developed a method to reproduce this phenomenon and investigated its mechanisms. The primed SVFs required two surgical procedures: mincing fat parenchyma (injury) and ligating the subcutaneous fat-feeding artery (ischemia). The primed SVFs rapidly reorganize their cell components during wound repair. Residential stromal cells and mobilized immune cells collaborate to achieve effective angiogenesis in ischemic tissues.

研究分野：再生医療

キーワード：創傷治癒 間質細胞 傷害刺激 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪由来間質血管分画 (Stromal Vascular Fractions ; SVFs) は、脂肪組織を酵素で消化して得られる細胞集団である。単離された SVFs は、脂肪由来の幹細胞や間質細胞の豊富な供給源であるだけでなく、血管内皮前駆細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、線維芽細胞、間葉系細胞、リンパ球、マクロファージ、脂肪前駆細胞などの不均一な細胞が混在している。

SVFs の自家移植は、末梢動脈閉塞性疾患の治療法として急成長している。このプロトコルの利点は、細胞が豊富に供給されること、細胞を培養せずに容易に単離できること、移植拒絶のリスクがないことなどである。しかし、臨床現場で SVFs の品質を均一に確保することは現実的には困難である。高齢者や合併症例では細胞機能が低下しているとの報告があり (引用文献) 治療効果に乏しい傾向がある。従って、細胞機能を増強してから虚血部位に移植する方法の開発が期待されている。

臓器間質細胞は傷害刺激を感知して、骨髄より炎症細胞を動員することで創傷治癒を活性化させる。その過程は複数の細胞集団がダイナミックに構成を変化させる複雑なもので、詳細について不明な点が多い。我々はこれまでに、採取元の皮下脂肪に予め傷害刺激を与えると脂肪由来の SVFs が再現性よく増加し、再編成されることを示した。我々はこの現象を「創傷治癒プライミング」と名付け、この現象を利用して移植前に予めドナー側で SVFs の活性化を促してからレシピエントへ移植することで、より効率的に血管新生を促進させることができるのではないかと考えた。この考えを持つに至った。

2. 研究の目的

創傷治癒プライミングをコントロールされた状態で再現し、増加した細胞集団の時系列変化および細胞間シグナルの観点からそのメカニズムを調べる。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* で創傷治癒プライミングに必要な傷害刺激の検討

重症化下肢虚血モデルに、以下の処置を施した各種 SVFs を同種移植し (injury only, ischemia only, injury+ischemia) 創傷治癒プライミングが引き起こされるか検討した。SVFs の増加と下肢虚血モデル移植後の血管新生増強を創傷治癒プライミングの指標とした。

- ・皮下脂肪組織実質を鉗で寸断 (injury)
- ・皮下脂肪栄養血管を結紮し、鼠蹊部皮下脂肪を虚血状態にする (ischemia)

(2) 増加細胞集団間のシグナル伝達経路の解析

傷害刺激 (プライミング) 後に経時的 (0,1,3 日後) に採取した皮下脂肪から SVFs を単離し、マイクロアレイ及びパスウェイ解析を実施した。

(3) 増加細胞集団における表面抗原プロファイルの解析

傷害刺激 (プライミング) 後に経時的 (0,1,3,7 日後) に採取した皮下脂肪から SVFs を単離し、フローサイトメトリーを用いて細胞の表面抗原から細胞構成を解析した。

(4) マウス下肢虚血モデルへの primed SVFs の移植実験

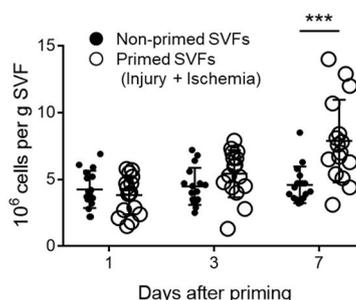
Primed SVFs の血管新生能を定量化するため、重症化下肢虚血モデルマウスに各種外科的処置 (injury only, ischemia only, injury+ischemia) を施した SVFs を移植し、術後 0,3,7,14 日目にレーザー Doppler 血流計を用いて後肢の血流を測定した。また、虚血後肢の筋肉組織を用いて CD31(+) の免疫染色を実施し、毛細血管密度を測定した。更に、ウェスタンブロッティングにより血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) -A の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) プライミング (injury+ischemia) による SVFs の生細胞数の変化

Primed SVFs の生細胞数は、Non-primed SVFs の生細胞数と比較して、7 日目に 1.72 倍に増加した ($p < 0.001$) (図 1)。一方、Non-primed SVFs の生細胞数に変化はみられず、細胞生存率にも有意な差はみられなかった。

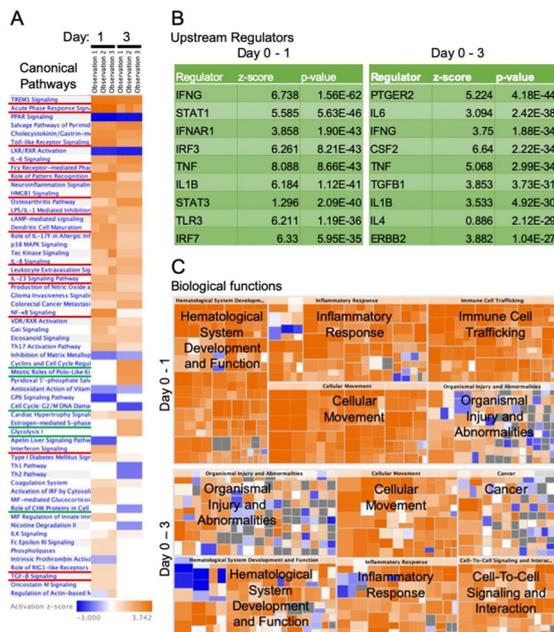
図 1: プライミングによる SVFs の生細胞数の変化
組織重量あたりの SVFs の数。
Injury: 脂肪実質の寸断による損傷
Ischemia: 脂肪栄養動脈の結紮による虚血



(2) プライミング (injury+ischemia) による SVFs の遺伝子発現プロファイルの変化

Primed SVFs の遺伝子発現プロファイルを、non-primed SVFs の遺伝子発現プロファイルと比較した (プライミング後 0-1 日目、0-3 日目を比較)。Canonical pathway 解析では、プライミング後 1 及び 3 日目に、骨髄系細胞に発現するトリガー受容体 (TREM)、急性期反応に関連する遺伝子、Toll 様受容体シグナルなどの自然免疫関連シグナルが顕著に変化した (図 2A)。これらの結果と一致して、自然免疫系のサイトカインと受容体がプライミングにおける代表的な上流調節因子であった (図 2B)。また、プライミング後 1 日目には、「hematological system development and function」、「inflammatory response」、「cellular movement」、「immune cell trafficking」などの生物学的変化が見られた (図 2C)。プライミング後 3 日目には、「organismal injury and abnormality」や「cancer」などの他の生物学的変化も顕著に現れた。細胞周期関連のシグナル (cyclins、cell cycle regulation や mitotic roles of Polo-like kinase など) は、プライミング後 3 日目でのみ発現が増加していた (図 2A)。

Canonical pathway 解析で低酸素関連シグナル (例: glycolysis pathways) の関与が示唆されたため、SVFs を分離した皮膚脂肪組織における低酸素誘導因子 (hypoxia-induced factor: HIF)-1 α の免疫染色を実施した。その結果、プライミング (injury+ischemia) 後 1 日目に HIF-1 α の顕著な安定化が観察された (図 3A 及び D)。しかし、injury または ischemia のどちらか一方だけの傷害刺激では観察されなかった (図 3B および 3C)。



これらのデータは、プライミングが自然免疫シグナルによる骨髄動員を介して細胞組成の劇的な変化を誘発し、その後、SVFs が細胞間の相互作用と増殖を通じて修復機能を最適化していることを示していると考えられる。

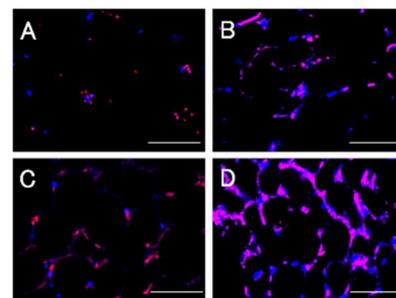


図 3: 皮下脂肪組織における HIF-1 α の安定化
A: sham, B: injury only, C: ischemia only, D: injury+ischemia, Scale bar=50 μ m

図 2: Primed SVFs の遺伝子発現プロファイル

(3) プライミング (injury+ischemia) による SVFs の再編成

フローサイトメトリー解析の結果、primed SVFs の細胞組成が経時的に変化することが明らかとなった。移植後 7 日目に CD45(+) の割合が有意に減少したが、一方で CD45(-)/CD31(-) の割合は相反し、間質細胞の活性化が推察された (図 4A)。

CD45(+) と CD31(-)/CD45(-) の散布図を見ると、primed SVFs は non-primed SVFs よりも明らかに分散していた (図 4B)。CD31(-)/CD45(-) 分画には、3.5% (参考文献) から 80% (参考文献) という大きな変動幅で CD34(+) 細胞 (脂肪前駆細胞) が含まれている。この細胞の割合は、プライミング後 3 日目には有意に減少したが、7 日目には non-primed SVFs と比較して同程度であった (図 4C)。CD140A (PDGFR α) を提示する脂肪前駆細胞は、生理的な状況に応じて、adipogenic (CD140A(+)/CD9(+)) または pro-fibrotic (CD140A(+)/CD9(-)) に分化することが知られている (参考文献)。プライミング後 1 日目には adipogenic の割合が低かったが、プライミング後の pro-fibrotic の割合は、non-primed SVFs と比較して同程度であった (図 4C)。

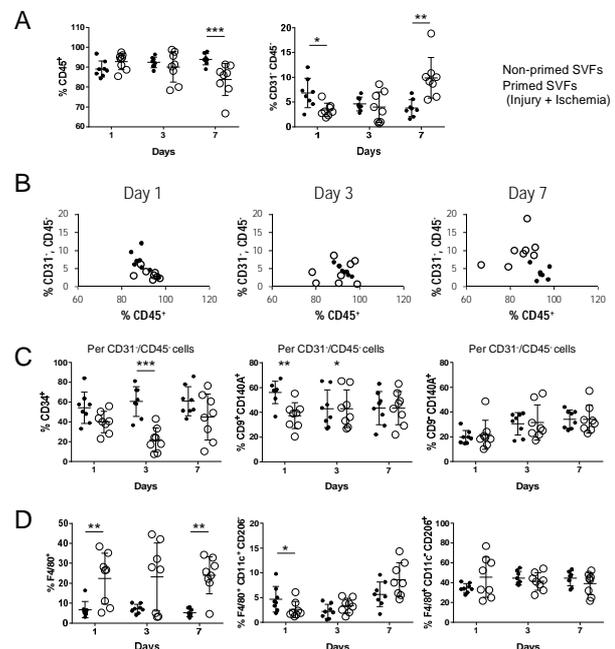


図 4: プライミングによる SVFs の細胞組成の変化

F4/80(+)分画(マクロファージ)の割合は、プライミング後1日目と7日目に有意に増加したが、M1(F4/80+)/CD11c(+)/CD206(-)およびM2(F4/80+)/CD11c(-)/CD206(+))の割合は、non-primed SVFsと比較してほぼ同程度であった(図4D)。

(4) プライミング(injury+ischemia)による虚血組織の血管新生

下肢虚血処置の1日後に、各種外科的処置を施したSVFsを移植した。下肢虚血処置後0日目での虚血後肢の血流量は、すべての群で対側のコントロール後肢よりも有意に低かった(図5A)。sham群(SVFs移植なし)では経時的に下肢が脱落したが、primed SVFs(injury+ischemia)群では移植後14日目までに血管新生が有意に促進された(図5A, B, $p < 0.01$)。プライミング刺激のどちらか片方(injury only or ischemia only)の群では、組織の虚血状態は改善されなかった(図5A, B)。移植後14日目のinjury+ischemia群の虚血肢皮膚に脱落や癒痕はみられなかったが、sham群では右虚血肢の脱落が見られ、injury only群とischemia only群では癒痕が見られた(図5C)。

虚血部位組織のCD31による免疫染色の結果、CD31(+)の血管面積が有意に増加した(図6A, B)。また、血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A)の合成は、プライミング後5日目にピークを迎えた(図7)。これらの結果より、損傷(injury)と虚血(ischemia)を組み合わせることで、VEGF-Aの合成を通して毛細血管の新生を誘導することが示された。

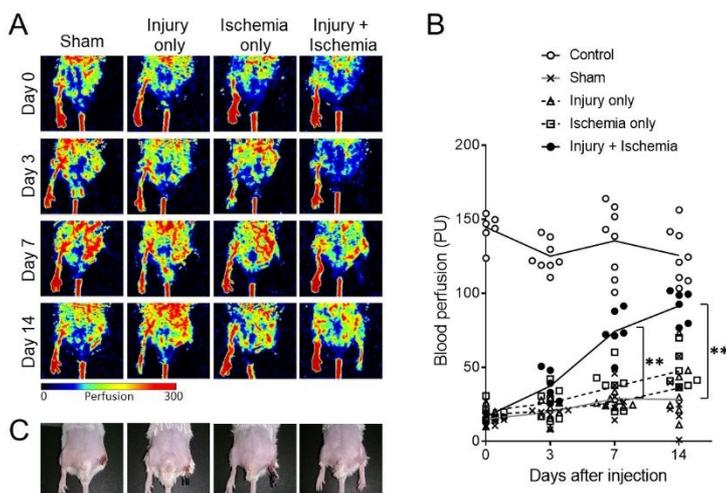


図5: マウス下肢虚血モデルへのSVF移植による血流回復効果

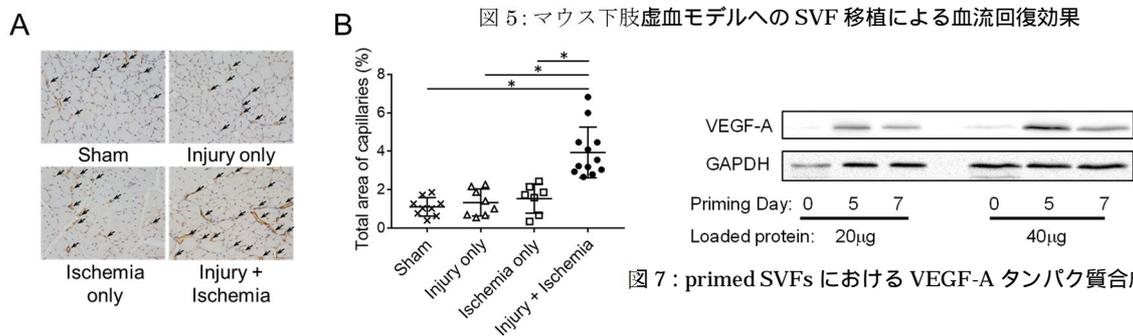


図6: SVF移植後の虚血部位における毛細血管新生効果

以上の結果より、脂肪組織に損傷(injury)と虚血(ischemia)という2種類の傷害刺激(プライミング)を与えると、脂肪由来のSVFsの数が増加した。プライミングされたSVFsは、組織修復時に迅速に細胞成分を再編成させ、組織に常駐する間質細胞と全身反応によって動員された免疫細胞が協働し、虚血組織に効果的な血管新生をもたらした。

我々は「創傷治癒プライミング」という独自の概念を提唱し、この現象を再現する手法を開発したが、この手法を臨床に応用することは現実的ではない。将来的には、外科的なプライミングと同等の効果が得られる化学的・薬理的なアプローチでプライミングを代替する必要がある。例えば、自然免疫シグナルを刺激する化学物質を用いたプライミングは、有望な代替手段となり得る。このような化学的・薬理的なプライミングは、重症虚血肢などの虚血性心血管疾患に対する効果的な血管新生療法の開発に貢献すると考えられる。

<引用文献>

Vasa M, et. al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 6, E1-7, 2001

Uezumi A, et. al. Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 864-873, 2006.

Marcelin G, et. al. A PDGFR α -mediated switch toward CD9^{high} adipocyte progenitors controls obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Cell Metab* 25, 673-685, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Satoko Kishimoto, Ken-ichi Inoue, Ryoichi Sohma, Shigeru Toyoda, Masashi Sakuma, Teruo Inoue, Ken-ichiro Yoshida	4. 巻 7219149
2. 論文標題 Surgical Injury and Ischemia Prime the Adipose Stromal Vascular Fraction and Increases Angiogenic Capacity in a Mouse Limb Ischemia Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 7219149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/7219149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ken-ichi Inoue, Satoko Kishimoto, Kazumi Akimoto, Masashi Sakuma, Shigeru Toyoda, Teruo Inoue, Ken-ichiro Yoshida, Mitsugi Shimoda, Shuji Suzuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblasts show heterogeneous gene expression and induce vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in response to environmental stimuli	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 416-425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ags3.12249. eCollection 2019 Jul.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masayuki Ishihara, Satoko Kishimoto, Shingo Nakamura, Yoko Sato, Hidemi Hattori	4. 巻 11
2. 論文標題 Polyelectrolyte Complexes of natural polymers and their biomedical applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymers (Basel)	6. 最初と最後の頁 672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym11040672.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masashi Sakuma, Satoko Kishimoto, Ken-ichi Inoue, Ryoichi Sohma, Shigeru Toyoda, Hideki Iwaguro and Teruo Inoue	4. 巻 12
2. 論文標題 Low-Molecular Weight Heparin/Protamine Micro-Nanoparticles Augmented Viability of Human Adipose-Derived Regenerative Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Journal of Scientific and Technical Research	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26717/BJSTR.2018.12.002265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ken-ichi Inoue, Satoko Kishimoto, Kanya Kaga, Miki Fuse, Akira Furuta, Tomonori Yamanishi	4. 巻 8
2. 論文標題 Autologous and heterotopic transplantation of adipose stromal vascular fraction ameliorates stress urinary incontinence in rats with simulated childbirth trauma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 9~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2017.11.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Asuka Morita, Motoshi Ouchi, Misao Terada, Hiroe Kon, Satoko Kishimoto, Keitaro Satoh, Naoyuki Otani, Keitaro Hayashi, Tomoe Fujita, Ken-ichi Inoue, Naohiko Anzai	4. 巻 67
2. 論文標題 Reproducible insulin secretion from isolated rat pancreas preparations using an organ bath.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 15-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.17-0059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masayuki Ishihara, Satoko Kishimoto, Shingo Nakamura, Koichi Fukuda, Yoko Sato, Hidemi Hattori	4. 巻 29
2. 論文標題 Biomaterials as cell carriers for augmentation of adipose tissue-derived stromal cell transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 567-585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/BME-181009	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井上健一, 岸本聡子, 井上晃男, 吉田謙一郎
2. 発表標題 組織間質細胞の修復戦略を細胞社会の文脈で理解する
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸本聡子, 井上健一, 朝戸裕貴, 井上晃男, 吉田謙一郎
2. 発表標題 創傷治癒における間質細胞の傷害刺激感知と血管新生増強
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 井上健一, 岸本聡子, 佐久間理史, 豊田茂, 井上晃男
2. 発表標題 Synergistic Cooperation of Heterogeneous Stromal Cells for Wound Healing
3. 学会等名 第81回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2017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	井上 健一 (Inoue Ken-ichi) (90587974)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	
研究分担者	佐久間 理史 (Sakuma Masashi) (10530199)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	
研究分担者	井上 晃男 (Inoue Teruo) (20168454)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------