

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09490

研究課題名(和文) 生体内系譜追跡による脂肪由来幹細胞の機能解析と新規再生治療法の開発

研究課題名(英文) Functional analysis of adipose-derived stem cells by in vivo lineage tracing and development of novel regenerative therapies

研究代表者

須永 中 (Sunaga, Ataru)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00406117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：3種類の遺伝子改変マウスを交配することにより、Prx1発現細胞に由来する細胞がtdTomatoを恒久的に発現し、なおかつI型コラーゲン発現細胞がEGFPを発現するPAGマウスを作製した。PAGマウスより脂肪由来幹細胞を抽出・培養し、細胞シート(tdT-ADSCシート)を作製した。マウスの腱損傷モデルを確立した後、tdT-ADSCシートを腱損傷部に移植し、移植後の腱を蛍光免疫染色にて観察したところ、修復された腱の内部にtdTomato陽性GFP陽性の細胞を認め、移植したtdTomato陽性ADSCsが腱の修復過程におけるコラーゲン生成に寄与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
脂肪由来幹細胞による腱の再生治療の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We generated PAG mice in which cells derived from Prx1-expressing cells permanently express tdTomato and type I collagen-expressing cells express EGFP by crossbreeding three types of genetically modified mice. ADSC sheets were prepared from PAG mice. After establishing a mouse model of tendon injury, tdT-ADSC sheets were transplanted into the injured area of the tendon and the transplanted tendon was observed by fluorescent immunostaining. The transplanted tdT-ADSC sheets were observed by fluorescence immunostaining. tdTomato-positive GFP-positive cells were found in the repaired tendon, indicating that the transplanted tdTomato-positive ADSCs contributed to collagen production in the tendon repair process.

研究分野：形成外科学

キーワード：脂肪由来幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂肪由来幹細胞は、採取が容易な再生医療のソースとして注目され、国内外で多くの研究が行われているだけではなく、すでに脂肪由来幹細胞移植の臨床応用も始まっている。しかし、生体内での脂肪由来幹細胞の挙動、すなわち幹細胞性 (stemness) を維持したまま生着するのか、分化することにより組織の再生に関与しているのか、成長因子を放出しながら消失するのかなど、その機能や局在についてはまだ不明な点が多く、そのことが治療の開発・最適化や発展的応用の妨げとなっている。また、そもそも組織に局在する脂肪由来幹細胞がどの程度恒常性の維持や創傷治癒に寄与しているのかすら明らかではない。

生体内での脂肪由来幹細胞を追跡するのが難しい理由としては、表面抗原以外に脂肪由来幹細胞を特徴付けるマーカーが乏しいことや、細胞が分化すると表面抗原の発現が変化してしまうことが挙げられる。そのため、表面抗原を対象としたフローサイトメトリーや免疫染色では、生体内における細胞の局在・形質変化を同時に追跡することは不可能である。

近年、マウス鼠径部の皮下脂肪組織内において、Prx1 遺伝子を発現している細胞群が CD34(+), CD31(-), CD45(-), CD29(+), Sca-1(+) であり、従来マウスの脂肪由来幹細胞とされている細胞群とプロファイルが一致していることが報告された。我々はその事実に着目し、Prx1 発現細胞を蛍光色素により genetic に marking する系譜追跡という手法を用いて移植後の脂肪由来幹細胞の挙動 (局在・形質変化) を明らかにし、その結果に基づいて移植方法の開発・評価・最適化を行うために本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪由来幹細胞の生体内における挙動について遺伝子改変マウスを用いて詳細に解析することにより、移植後の脂肪由来幹細胞の挙動 (局在・形質変化) を明らかにし、その結果に基づいて移植方法の開発することである。

具体的には、マウスの疾患モデルに対して移植した脂肪由来幹細胞の生体内における局在・形質変化を系譜追跡という手法を用いて追跡・解析することにより、脂肪由来幹細胞移植治療の開発・評価・最適化を行う。

### 3. 研究の方法

Prx1 プロモータ制御下に、すなわち Prx1 発現細胞特異的に Cre recombinase を発現する Prx1Cre マウスと、Cre recombinase を発現した細胞において赤色蛍光色素 tdTomato を恒久的に発現する Rosa26-LSL-tdTomato マウス (Ai14 マウス)、I 型コラーゲン発現細胞が EGFP を発現する Col1/EGFP マウスを交配することにより、Prx1 発現細胞が tdTomato によって genetic marking されることにより Prx1 の発現が消失 (= ASCs が分化) した後も光り続け、なおかつ I 型コラーゲン発現細胞が EGFP を発現する Prx1Cre;Ai14;Col1/EGFP マウスを作製した。

Prx1Cre;Ai14;Col1/EGFP マウスの鼠径脂肪より脂肪由来幹細胞 (tdTomato 陽性 ADSCs) を抽出・培養し、温度反応性ディッシュを用いて脂肪由来幹細胞シート (tdT-ADSC シート) を作製した。

Wild マウスのアキレス腱に 11 番メスで小切開を加えることにより、マウスの腱損傷モデルを作製した。tdT-ADSC シートを腱損傷モデルに移植し、移植後の腱を移植 1, 4, 8 週間後に蛍光免疫染色にて観察した。続いて、ドナーに Col1/EGFP マウスを用いて同様の実験を行った。

#### 4 . 研究成果

修復された腱の内部に tdTomato 陽性 GFP 陽性の細胞を認め、移植した tdTomato 陽性 ADSCs が腱の修復過程におけるコラーゲン生成に寄与していることが示された。tdTomato 陽性 GFP 陽性の細胞数は、1,4,8 週と経時的に減少した。

Col1/EGFP マウスを用いたモデルでは、GFP 陽性細胞全体における tdTomato 陽性 GFP 陽性の比率は 1,4,8 週と経時的に減少していた。

以上より、ADSC シートの移植は、主に受傷後早期のコラーゲン産生に寄与し、長期的な腱の恒常性への寄与は少ないと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	吉村 浩太郎  (Yoshimura Kotaro)  (60210762)	自治医科大学・医学部・教授   (32202)	研究への助言
研究分担者	宇田 宏一  (Uda Hirokazu)  (20337306)	自治医科大学・医学部・准教授   (32202)	研究への助言

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