

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09497

研究課題名(和文) 創傷治癒過程に出現する脂肪細胞由来線維芽細胞の形質及び機能解析

研究課題名(英文) Analysis of characteristics and functions for adipocyte-derived fibroblasts appearing during wound healing

研究代表者

風間 智彦 (KAZAMA, Tomohiko)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：80525668

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)：成熟脂肪細胞の運命追跡が可能なAdipoq-ERT2Cre/tdTマウスの皮膚障害部位に、tdT陽性の脂肪細胞由来線維芽細胞様細胞(ADF)の出現を認めた。一部のADFは細胞増殖マーカーKi-67陽性であった。また、Reticular fibroblast、Pro-adipogenic fibroblastまたはペリサイトのマーカーをADFは発現していた。

in vitroにおいて調整したtdT陽性ADFは、脂肪由来幹細胞ASCと同等の増殖能や脂肪分化能を示した。細胞表面抗原解析では、Sca-1、CD29、CD106がASCと同様に高い陽性率を示す一方、CD44及びCD105の陽性率は低かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において成熟脂肪細胞の運命追跡が可能な遺伝子改変マウスを用いて、皮膚傷害時に出現するADFの形質および機能解析を行なった。本研究成果は、難治性皮膚疾患などに対するin situ cell therapyの開発に結びつく見識を深めることに繋がる。また、生体内で自立的に組織を再生し、機能回復へ結びつく有効性・安全性の高い新たな細胞治療技術の確立を目指すものとして学術的・社会的意義のある研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We observed the appearance of tdT-positive adipocyte-derived fibroblast-like cells (ADFs) at the site of skin injury in Adipoq-ERT2Cre/tdT mice, which are capable of tracking the fate of mature adipocytes. Some of the ADFs were positive for the cell proliferation marker Ki-67. Further, several ADFs expressed markers of reticular fibroblast, pro-adipogenic fibroblast, or pericyte.

Next, after collecting subcutaneous adipose tissue from tamoxifen-treated Adipoq-ERT2Cre/tdT mice, we tried to prepare ADFs in vitro by inducing dedifferentiation of mature adipocytes isolated by enzymatic treatment in a ceiling culture. The tdT-positive ADFs obtained by the ceiling culture method showed the similar adhesive and proliferative ability as adipose-derived stem cells (ASCs). Cell surface antigen analysis showed that Sca-1, CD29, and CD106 were highly positive as well as ASCs, while the positive rates of CD44 and CD105 were lower than those of ASCs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脱分化 脂肪細胞由来線維芽細胞 創傷治癒 成熟脂肪細胞 adiponectin ASC

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、Genetic-lineage tracing といった遺伝子改変技術の進歩により、特定の細胞をゲノムレベルでラベリングし、その細胞に由来する細胞・組織の運命追跡が可能となった。その結果、マウスなどの哺乳類においても、組織傷害後の修復過程で成熟細胞が脱分化や分化転換することで、組織再生に関わることが報告されている¹⁻³⁾。我々は、間葉系幹細胞 (MSC) と類似した高い増殖能と多分化能を有する脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) が脂肪細胞を天井培養法という方法で脱分化を誘導することで調製可能なことを明らかにした⁴⁾。また、これまでに脂肪細胞の運命追跡が可能な遺伝子改変マウス (Adipoq-CreERT2/tomato マウス) を作出しており、脂肪細胞特異的に tomato を発現することを確認している。この遺伝子改変マウスに皮膚全層欠損を作成し、経時的に観察した結果、創傷治癒過程で脂肪細胞に由来する線維芽細胞 (Adipocyte-derived fibroblasts: ADF) が一過性に多数出現することを確認し、そのほとんどの ADF が閉創・上皮再生に伴い約3週間の経過で自然消退した。以上の所見から、重篤な皮膚傷害によっても ADF が出現し、創傷治癒に何らかの役割を果たしていることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究は脂肪細胞の運命追跡が可能な Adipoq-CreERT2/tomato マウスを用い、皮膚傷害部位に出現する成熟脂肪由来の ADF の局在、形質および機能解析を行なった。本研究成果は難治性皮膚疾患などに対する in situ cell therapy の開発へと繋がる見識を深め、生体内で自立的に組織を再生し、機能回復へ結びつく有効性・安全性の高い新たな細胞治療技術の確立を目指すものとして科学的・社会的意義のある研究であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) マウス皮膚全層欠損モデルを用いた ADF の組織学的解析

Adipoq-cre/ERT2-tomato マウス (以下 tomato マウス) に皮膚全層欠損作製開始1週間前からタモキシフェン (1mg/body) を腹腔内投与し、蛍光色素 tomato を脂肪組織に発現させた。tomato マウスの背部皮膚に対し、約1×1 cmの皮膚欠損を作製する。皮膚全層欠損後から約2週間前後で皮膚の再生がみられるため、モデル作製より2週後の時点でCO2吸入を用いて安楽死させ、再生皮膚の検体を採取し (n=4)、再生皮膚の組織学的検討を行なった。評価は、赤色蛍光である tomato 陽性細胞を確認すると共に、Pericyte (NG2+)、Reticular fibroblast (DLK1+Sca-1-)、Pro-adipogenic fibroblast (Sca-1+DLK1-or-)、Papillary fibroblast (CD26+) に対する抗体を用いた免疫染色を行なうことで、tomato 陽性細胞の運命追跡を行なった。また、増殖性細胞の指標としてKi-67の免疫染色を行なった。

(2) 培養 ADF の解析

タモキシフェン投与後の Adipoq-ERT2Cre/tomato マウス皮下脂肪組織を採取後、酵素処理により単離された成熟脂肪細胞を天井培養による脱分化を誘導し、in vitroにおいて ADF の調製を行なった。ADFにおける細胞表面抗原解析を行うため、調整された ADF は0.2%ウシ血清アルブミン添加バッファーを用いて懸濁した後、非特異的結合を阻害するため正常ウサギ血清を添加し、10分間室温で静置した。細胞を洗浄した後、以下に示す各抗体を添加し、4℃、30分間暗所に静置し反応させた。検討した抗体はMSC特異的な細胞表面抗原マーカー (positive マーカー: Sca-1、CD29、CD44、CD73、CD105、CD106) ならびに negative マーカー: CD11b、CD45) を用いた。次に、In vitroにおける脂肪分化能解析を行なうため、調整された ADF を脂肪分化誘導培地にて14日間脂肪分化誘導を行なった。分化誘導後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後、Oil red O染色液を室温にて15分間作用させ、中性脂肪の細胞内蓄積を顕微鏡で観察した。それぞれの tomato (+) ADF の形質解析では、脂肪由来幹細胞 (ASC) との比較を行なった。

4. 研究成果

(1) 皮膚欠損作製後14日目の凍結切片標本を作成し、各種間質細胞マーカーに対する蛍光免疫染色により、tomato+ ADF の形質解析を行なった。血管内皮細胞マーカーであるCD31とペリサイトマーカーであるNG2の染色では、CD31+細胞、NG2+細胞、tomato+ ADFを確認した (図1)。CD31+血管内皮細胞の多くは管腔を形成し、NG2+ペリサイトは管腔を形成した血管内皮細胞の近傍にその局在が認められた (図1上段)。tomato+ ADFの一部にはNG2陽性を示す細胞が認められた (図1上段矢印)。一方、CD31陽性を示す tomato+ ADF は確認されなかった。

一部の NG2+ tdTomato+ ADF は CD31+ 血管内皮細胞に張り付くように存在し、血管構成細胞として典型的な細胞突起を有するペリサイト様の形態を示した (図 1 下段破線)。

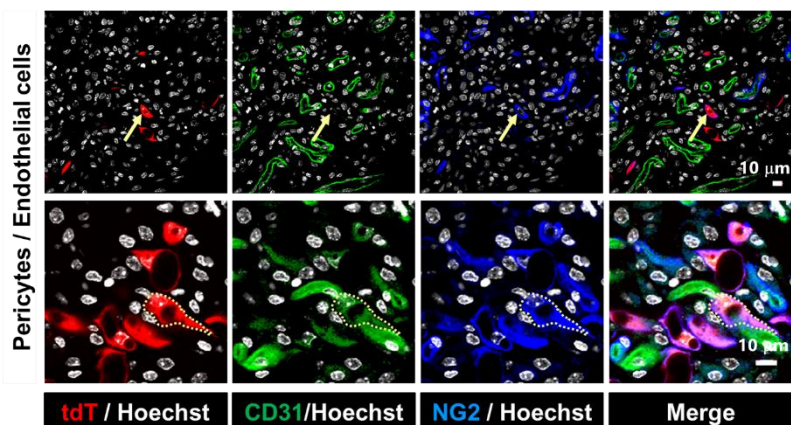


図1. 皮膚全層欠損部における血管内皮細胞及びペリサイトの同定

間葉系間質細胞マーカーである DLK1、Sca-1、CD26 の染色では、肉芽組織にびまん性に局在する Reticular fibroblast (DLK1+ Sca-1- 細胞)を確認した (図 2 矢頭)。tdTomato+ ADF の一部は DLK1+ Sca-1- であり、Reticular fibroblast の形質を有していた (図 2 矢印)。

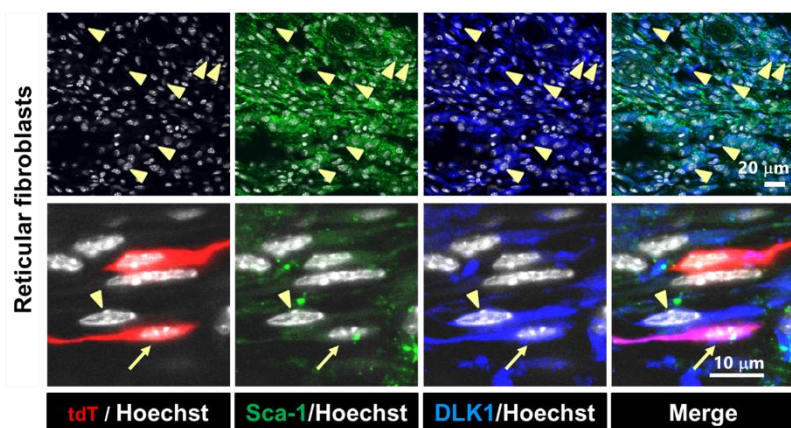


図2. 皮膚全層欠損部におけるReticular fibroblast の同定

また、同染色では Reticular fibroblast よりは少数であるが肉芽組織にびまん性に局在する Pro-adipogenic fibroblast (Sca-1+ DLK1+ or - 細胞)も確認された (図 3 矢頭)。tdTomato+ ADF の一部には Sca-1+ DLK1+ or -を示し、Pro-adipogenic fibroblast の形質を有する細胞も認められた (図 3 矢印)。

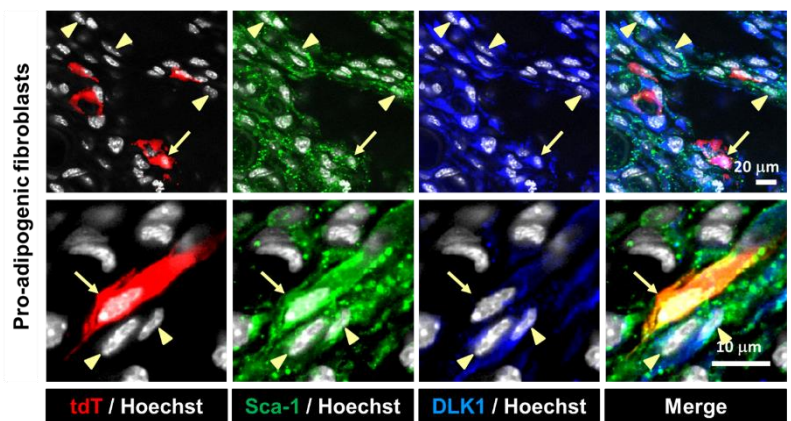


図3. 皮膚全層欠損部におけるPro-adipogenic fibroblast の同定

Papillary fibroblast マーカーである CD26 の染色では、肉芽組織と健常組織の境界領域を中心に Papillary fibroblast (CD26+ 細胞)を認めた (図 4 矢頭)。一方、Papillary fibroblast の形質を有する CD26+tdTomato+ ADF の存在は確認できなかった。

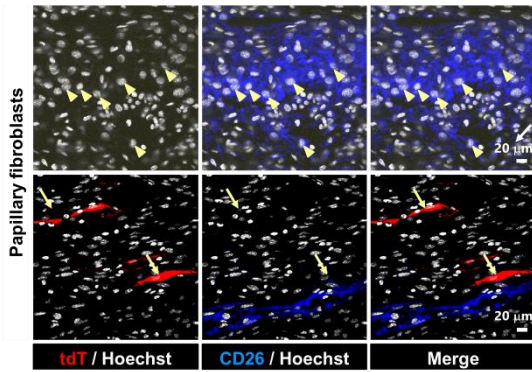


図4. 皮膚全層欠損部におけるPapillary fibroblast の同定

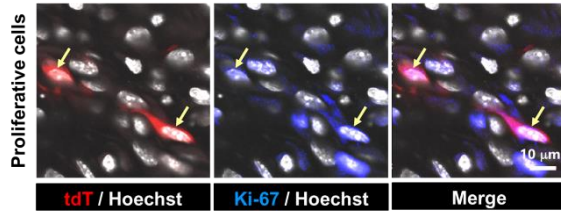


図5. 皮膚全層欠損部における増殖細胞の同定

(2) 増殖細胞マーカーKi-67の染色では、肉芽組織を構成する細胞の一部はKi-67+を示した(図5)。肉芽組織中のKi-67+細胞は特徴的な局在を示さずに、びまん性に散在していた。また、tdTomato+ ADFの一部にもKi-67+を示す細胞が確認された(図5矢印)。

(3) 天井培養法により得られたtdTomato+ ADFならびにASCにおける細胞表面抗原の発現を、フローサイトメトリーにて解析した結果、MSC陽性マーカーであるSca-1、CD29、CD106がASCと同様に高い陽性率を示す一方、CD44及びCD105の陽性率は低かった(図6、7)。MSC陰性マーカーであるCD11bならびにCD45はtdTomato+ ADFならびにASCにおいて陽性率は共に低かった。

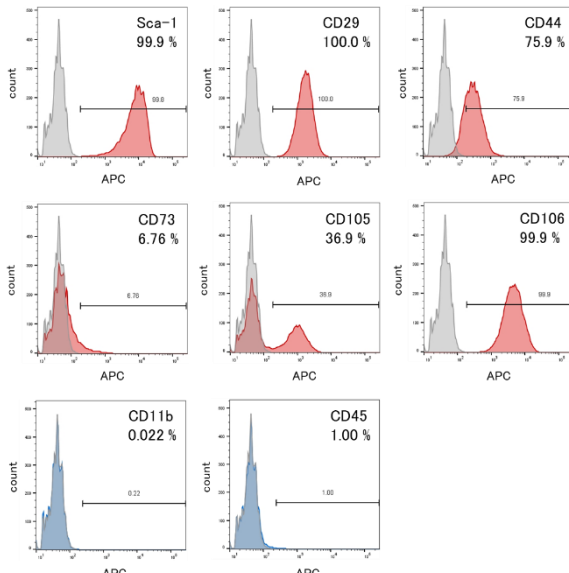


図6. ASCにおける細胞表面抗原解析

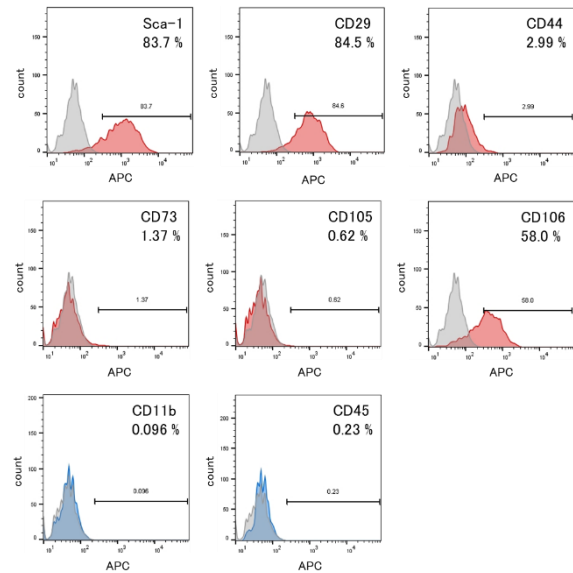


図7. tdtomato(+) ADFにおける細胞表面抗原解析

(4) 天井培養法により得られたtdTomato+ ADFならびにASCを脂肪分化誘導培地にて培養し、脂肪細胞への分化能について検討した。培養14日後のOil red O染色像に示すように、脂肪分化誘導後におけるtdTomato+ ADFはASCと同様に、Oil red O染色陽性の中性脂肪を細胞内に

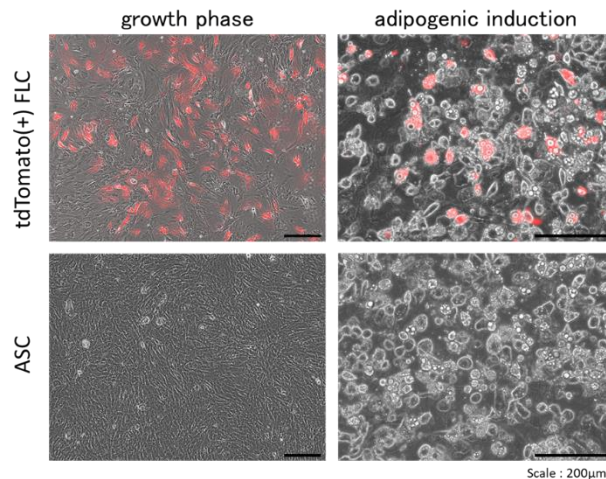


図8. 脂肪細胞分化能解析結果

蓄積した細胞が認められ、脂肪細胞へ分化したことが確認された（図 8）。

皮膚全層欠損モデルの組織修復過程において、組織の修復に伴い脂肪細胞由来の線維芽細胞様細胞（tdTomato+ ADF）が一過性に出現することが明らかとなった。tdTomato+ ADF の一部は、ペリサイト、Reticular fibroblast、Pro-adipogenic fibroblast の形質を獲得していることや、in vitro にて調整された tdTomato+ ADF は脂肪由来幹細胞 ASC に類似した増殖活性や脂肪分化能を示すことが明らかになった。皮膚全層欠損モデルの組織修復過程において、成熟脂肪細胞が脱分化または形質転換し、皮膚組織の修復に関与する可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) van Es JH, et al. Nat Cell Biol (2012) 14(10):1099-1104.
- 2) Tata PR, et al. Nature (2013) 503(7475):218-223.
- 3) Bochet L, et al. Cancer Res (2013) 73(18):5657-5668.
- 4) Matsumoto T, et al. J Cell Physiol (2008) 215:210-222

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 風間 智彦、山元 智衣、長岡 悠紀、萩倉 一博、李 予昕、松本 太郎
2. 発表標題 マウス皮膚再生過程に出現する成熟脂肪細胞由来線維芽様細胞の形質解析
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 三友紀、長岡 悠紀、萩倉 一博、風間 智彦、李 予昕、松本 太郎
2. 発表標題 マウス皮膚欠損修復過程における成熟脂肪細胞 の脱分化現象及び組織修復に関する検討
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川 三友紀、萩倉 一博、風間 智彦、李 予昕、松本 太郎
2. 発表標題 マウス皮膚欠損治療過程における成熟脂肪細胞の形質転換および組織再生に関する検討
3. 学会等名 第40回 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 三友紀、萩倉 一博、風間 智彦、李 予昕、松本 太郎
2. 発表標題 マウス皮膚欠損治療過程における成熟脂肪細胞の形質転換に関する検討
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019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	松本 太郎 (MATSUMOTO Taro) (50366580)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究 分担者	長岡 悠紀 (NAGAOKA Yuki) (30789186)	日本大学・医学部・研究員 (32665)	

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
---------	---------