

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390452

研究課題名（和文） ヒト脂肪由来幹細胞の細胞特性と潜在機能の解析

研究課題名（英文） Analysis of cellular characterization and potential functions of human adipose derived stem cells

研究代表者

吉村浩太郎 (YOSHIMURA KOTARO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60210762

研究成果の概要：

1) 培養ASCの細胞表面抗原発現の変化：ASCを接着培養すると新鮮時には発現がなかったCD105 (endoglin; 間葉系幹細胞のマーカーの1つ)が発現することをあきらかにした。また、培養を続けると減少するCD34の発現を長期的に維持する培養法を開発した。

2) ASCは、皮膚線維芽細胞をはじめ、骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC)、臍帯由来幹細胞など間葉系の組織前駆細胞と形態的には類似しているが、機能、表面抗原発現における相違点を明らかにした。a～dの内容についてJournal of Cellular Physiology誌 (2006) に報告した。

3) 脂肪再生に関する研究を行い、ヒト吸引脂肪が幹細胞欠乏組織であることを明らかにし、幹細胞を補助的に用いる新しい脂肪移植法の概念を提唱した。免疫不全動物を用いて、ヒト脂肪組織および脂肪組織由来幹細胞を用いて脂肪再生への有効性を示した。また、GFPラットを用いて、幹細胞の追跡実験を行い、血管内皮細胞への分化を確認した。また、ヒト脂肪とヒト脂肪由来幹細胞の混合移植モデル (ヌードマウス) を用いて、やはり血管内皮細胞への分化を確認した。この研究内容については、Tissue Engineering誌 (2006) に報告した。

4) 遠心処理により脂肪組織から水分が失われ、一部の脂肪細胞は破壊されるが幹細胞は生存することを明らかにし、また脂肪移植における遠心処理の最適化に関する研究についてPlast Reconstr Surg誌 (2008) に報告した。

5) 脂肪組織および幹細胞の非凍結保存の最適化についてPlast Reconstr Surg誌 (2007) に報告するとともに、長期凍結保存した脂肪由来幹細胞の機能解析結果をやはりPlast Reconstr Surg誌 (2008) に報告した。

6) 脂肪幹細胞の多分化能を維持したままで、効率的に短期間で増殖させる方法についてCytotherapy誌 (2007) に報告した。

7) 脂肪由来幹細胞にbFGFが作用するとHGFを強力にHGFを分泌することを明らかにした。またこの作用はJNKシグナルを介し、脂肪組織の虚血再還流傷害後の脂肪再生、血管新生において、脂肪幹細胞由来のHGFが線維化を抑制する働きがあることを明らかにした。また、血管新生、脂肪再生において脂肪幹細胞が主役的な役割を果たして増殖、遊走することを明らかにした。これらの結果はStem Cells誌 (2008) に報告した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：組織培養・移植学

1. 研究開始当初の背景

再生医学の研究が全盛を迎える中で、その多くは幹細胞として、ES細胞、骨髄もしくは臍帯血または末梢血由来組織幹細胞を利用している。脂肪組織は、臍帯血や他の組織と異なり大量に採取することが可能であり、一度に大量の幹細胞を採取することが可能であり、幹細胞を培養・増殖することなく、再生医療に応用することが可能である。このように新鮮細胞が臨床応用可能な量まで採取できるのは、骨髄、末梢血、と脂肪の3組織のみである。したがって、とくに再生医療の萌芽期においては、新鮮細胞が利用できる貴重な組織として重要な役割が予想される。食生活の変化、高齢化進行に伴い、肥満患者が急速に増えており、脂肪吸引手術が糖尿病、膝関節症や成人病への対応としても注目され始めており、今後我が国においてもその手術実施数は米国同様に増加していくと考えられ、廃棄物である吸引脂肪を有効利用できることは医療経済の観点からも注目されている。脂肪組織由来幹細胞は形成外科医によって日常的に採取されるため、脂肪由来幹細胞については形成外科医・美容外科医がその研究の将来を担っている。すでに当研究室をはじめ、間葉系ならびに血管系幹細胞の存在が脂肪組織内において確認されており、さらに他にも臨床応用可能な細胞の存在が示唆されている。すなわち、幅広い間葉系組織群の再生医療にむけた可能性が期待され、さらに血管新生への臨床応用が可能であり、形成外科領域のみならず、心臓疾患、閉塞性血管疾患、骨粗しょう症、糖尿病をはじめとする広い範囲の医療において画期的な進展をもたらす可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでの細胞特性の解析をさらにすすめて、各細胞群の機能を明らかにすること、さらにその潜在機能（多能性、分化能など）を引き出す方法を開発すること、さらにはその潜在機能を用いた臨床応用技術を開発することである。これまでに、脂肪由来幹細胞は、脂肪組織特有の前駆細胞であること、脂肪と血管の前駆細胞であること、間葉系をはじめ神経などにも分化することができること、などが明らかになった。しかし、まだその分化能は限られており、現在の技術では臨床治療における有用性はまだ限定的である。また、細胞の特性も明らかになってきてるとはいえ、まだ不明の点が多い。実際、我々の研究において、脂肪幹細胞の細胞表面抗原の特性を明らかとしたが、最近その中にもさらに最低2つの細胞群が存在することを明らかとした（未発表データ）。幹細胞マーカーとされるCD34においても、CD34陽性脂肪幹細胞とCD34陰性脂肪幹細胞では後者の方が脂肪、骨、軟骨など間葉系の分化能は大きいことが最近我々の研究によって明らかになった。このように脂肪幹細胞におけるCD34の意義はまだ不明であり、さらに新しいマーカー（未発表）においてもその意義や機能は不明であり、こうした未知の内容を明らかにすることが、脂肪幹細胞の特性の本質を解明するために不可欠であると考えられる。

3. 研究の方法

1) 脂肪由来細胞群のさらなる characterization

これまでに前回の研究において行ってきた、脂肪由来新鮮細胞群の組成分析を終了し、*Journal of Cellular Physiology* 誌に報告した。CD31-CD34+CD45-CD90+CD105-CD146-細胞として同定された脂肪幹細胞は、培養すると CD105 陽性となり一部が CD34 陰性となることが明らかとなった。この脂肪幹細胞における CD34 の意義についての研究を進める。CD34 陽性細胞と陰性細胞に分離し、それぞれの多分化能(とくに、脂肪、骨、軟骨、血管)について調べた。CD34 発現の機能的意義が明らかになることにより、脂肪幹細胞の特性の本質に迫ることが可能であると共に、今後の応用研究において用途に応じた培養法、投与方法の開発が可能となる。細胞培養法により CD34 発現がどのように変化するのか、CD34 発現を維持できる長期培養法を開発を目指す。さらに、最近ある細胞表面マーカーに (Factor-X) より CD34 陽性脂肪幹細胞はさらに2つの細胞群に分離することができることがわかり(未発表データ) そのマーカーについても同様に発現の機能的意義を調べた。他の骨髄由来などの組織幹細胞との機能的相違をさらに明らかにすることが可能となる。Factor-X についても、様々な培養法によりどのように発現が変化するのかを分析し、発現を維持できる長期培養法を開発を行った。以上の特性の分析に際しては、コントロールとして、既知の体性幹細胞、すなわち骨髄由来造血幹細胞、骨髄由来間葉系幹細胞、末梢血由来造血幹細胞、血管内皮前駆細胞、真皮由来線維芽細胞などとの比較実験を行い、その特性について多面から比較検討を行った。

2) CD34 の機能的意義の解明

脂肪幹細胞における CD34 の発現の有無による機能の違いを解明した。分析方法には、分化誘導培養による脂肪、骨、軟骨分化能の各定量的測定、リアルタイム PCR を用いた各 lineage 特有の mRNA の検出、3次元培養法を用いたより vivo に近い系での分化能の分析などを行った。血管内皮細胞、血管周細胞への分化能の検討も、我々独自の評価系を用いて行う。最近本細胞を使用して in vitro の血管内皮ネットワーク形成に成功し、血管新生能の vitro 評価系の確立した。現在までの研究で、CD34 陰性細胞の方が、脂肪と骨に関しては分化能が高いことを明らかにした。

3) 脂肪の微小環境モデルの開発

これまで使用してきたモデルに基づいて、様々な微小環境モデルを開発した。3種類(軽度、中等度、重度)の虚血脂肪組織モデル、脂肪組織の虚血再還流傷害モデル、脂肪

組織の急速成長肥満モデル、外的陰圧組織伸展モデル、阻血チューブ皮弁モデル、阻血皮膚潰瘍モデル、肥厚性癬痕(線維化)モデル、さらに、それらのそれぞれモデルに対する遺伝子、阻害剤もしくは徐放性増殖因子および細胞投与併用モデルなどである。

それぞれの組織において起こる構成細胞、構成細胞外基質のターンオーバー、リモデリングを観察した。また、その過程における脂肪幹細胞の役割、機能を分析した。具体的には、それぞれのリモデリング過程における脂肪組織の体積、重量、それぞれの構成細胞(脂肪細胞、脂肪幹細胞、血管内皮細胞、周皮細胞、線維芽細胞、組織内マクロファージなど)の数および組成割合(FACS、全組織染色)、GPDH 活性、死細胞数(PI 染色)、アポトーシス細胞数(TUNEL 染色)、増殖細胞数(Ki67)、変性脂肪細胞数、新生脂肪細胞数、コラーゲン定量、増殖因子など鍵蛋白の定量、マクロファージ数などを測定した。われわれの研究室では脂肪組織に対する新しい Whole mount 染色を導入し、毛細血管や脂肪細胞を未固定で切片として破壊しないで、3種類の色素(核、血管、脂肪細胞)を使って描出することが可能になった。そのため、これまでには不可能であった詳細な分析が可能となり、*Stem Cells* 誌(2008)に報告した。

4) ヒト脂肪幹細胞の血管分化誘導法の開発

脂肪幹細胞は vivo において血管に分化することは、我々の研究(*Tissue Engineering*, 2006)も含めて複数の研究によって明らかにされている。しかしながら、in vitro で血管に分化誘導する方法は、ES 細胞においても組織幹細胞においても確立されていない。我々は最も血管に分化しやすいと思われる幹細胞の1つである脂肪幹細胞を用いることにより、血管分化誘導法を開発した。具体的には、様々な蛋白、増殖因子、力学ストレス、気圧(低気圧、高気圧)、酸素濃度、細胞外基質、インターロイキンなどによる影響を、リアルタイム PCR を用いて微量の変化を検出する研究を網羅的に展開した。それぞれの因子の分化誘導への影響を解析し、最適な分化誘導法を再構築した。bFGF と3種類の増殖因子の利用で、遊走能を高め血管内皮に分化することを確認した。さらに発展させ最適化を行った。血管内皮細胞、血管周細胞への分化能の検討は、我々独自の評価系を用いて行った。最近本細胞を使用して in vitro の血管内皮ネットワーク形成に成功し、血管新生能の vitro 評価系の確立した。

4. 研究成果

- 1) 培養 ASC の細胞表面抗原発現の変化: ASC を接着培養すると新鮮時には発現がなかった CD105 (endoglin; 間葉系幹細胞のマーカーの1つ) が発現することをあきらかにした。また、培養を続けると減少する CD34 の発現を長期的に維持する培養法を開発した。
- 2) ASC は、皮膚線維芽細胞をはじめ、骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC)、臍帯由来幹細胞など間葉系の組織前駆細胞と形態的には類似しているが、機能、表面抗原発現における相違点を明らかにした。a~d の内容について Journal of Cellular Physiology 誌 (2006) に報告した。
- 3) 脂肪再生に関する研究を行い、ヒト吸引脂肪が幹細胞欠乏組織であることを明らかにし、幹細胞を補助的に用いる新しい脂肪移植法の概念を提唱した。免疫不全動物を用いて、ヒト脂肪組織および脂肪組織由来幹細胞を用いて脂肪再生への有効性を示した。また、GFP ラットを用いて、幹細胞の追跡実験を行い、血管内皮細胞への分化を確認した。また、ヒト脂肪とヒト脂肪由来幹細胞の混合移植モデル(ヌードマウス)を用いて、やはり血管内皮細胞への分化を確認した。この研究内容については、Tissue Engineering 誌 (2006) に報告した。
- 4) 遠心処理により脂肪組織から水分が失われ、一部の脂肪細胞は破壊されるが幹細胞は生存することを明らかにし、また脂肪移植における遠心処理の最適化に関する研究について Plast Reconstr Surg 誌 (2008) に報告した。
- 5) 脂肪組織および幹細胞の非凍結保存の最適化について Plast Reconstr Surg 誌 (2007) に報告するとともに、長期凍結保存した脂肪由来幹細胞の機能解析結果をやはり Plast Reconstr Surg 誌 (2008) に報告した。
- 6) 脂肪幹細胞の多分化能を維持したままで、効率的に短時間で増殖させる方法について Cytotherapy 誌 (2007) に報告した。
- 7) 脂肪由来幹細胞に bFGF が作用すると HGF を強力に HGF を分泌することを明らかにした。またこの作用は JNK シグナルを介し、脂肪組織の虚血再還流傷害後の脂肪再生、血管新生において、脂肪幹細胞由来の HGF が線維化を抑制する働きがあることを明らかにした。また、血管新生、脂肪再生において脂肪幹細胞が主役的な役割を果たして増殖、遊走することを明らかにした。これらの結果は Stem Cells 誌 (2008) に報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

- 1) Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. Regen Med 4: 265-73, 2009. 査読有
- 2) Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, Kurita M, Oshima Y, Sato K, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Hirohi T, Harii K. Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications, Breast J, in press. 査読有
- 3) Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, Nishimura S, Manabe I, Gonda K, Yoshimura K. FGF-2-induced HGF secretion by adipose-derived stromal cells inhibits post-injury fibrogenesis through a JNK-dependent mechanism. Stem Cells 27: 238-249, 2009. 査読有
- 4) Yoshimura K, Aoi N, Suga H, Inoue K, Eto H, Sato K, Kurita M, Harii K, Hirohi T. Ectopic fibrogenesis induced by transplantation of adipose-derived progenitor cellsuspension immediately after lipoinjection. Transplantation 85: 1868-1869, 2008. 査読有
- 5) Kurita M, Aiba-Kojima E, Shigeura T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, Eto H, Kato H, Aoi N, Yoshimura K. Differential effects of three preparations of human serum on expansion of various types of human cells. Plast Reconstr Surg 122: 438-448, 2008. 査読有
- 6) Suga H, Matsumoto D, Inoue K, Shigeura T, Eto H, Aoi N, Kato H, Abe H, Yoshimura K. Numerical measurement of viable and non-viable adipocytes and other cellular components in aspirated fat tissue. Plast Reconstr Surg 122: 103-114, 2008. 査読有
- 7) Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Gonda K, Harii K, Yoshimura K. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. Plast Reconstr Surg, 121: 1033-1041, 2008. 査読有
- 8) Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. Dermatol Surg

34: 1178-1185, 2008. 査読有

9) Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, Aoi N, Iizuka F, Sato K, Murase S, Koshima I, Yoshimura K. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. Plast Reconstr Surg 121: 401-410, 2008.

査読有

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 浩太郎(YOSHIMURA KOTARO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60210762

(2) 研究分担者

権太 浩一(GONDA KOICHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20292914

(3) 連携研究者