

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592080

研究課題名（和文） 脂肪組織幹細胞による血管再生機序の解明

研究課題名（英文） Mechanism of angiogenesis induced by adipose-derived stem cells

研究代表者

水野 博司（MIZUNO HIROSHI）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80343606

研究成果の概要：野生型 C57BL/6-Tg マウスの下肢虚血モデルに対し、GFP 遺伝子導入 C57BL/6-Tg マウス由来脂肪組織幹細胞（以下 ASCs）を下肢筋肉内に注入投与した。経時的に肉眼的観察、皮膚温測定、血管造影、各種血管成長因子の発現を調査下。血管造影では実験群において豊富な血管新生像を呈した。GFP を発現する血管内皮細胞は全体の 10-15%であった。血管成長因子の発現の程度は細胞移植後早期より上昇し、移植後後期まで持続した。以上より、血管再生効果は血管成長因子の効果が大きであると推測された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：脂肪組織幹細胞、血管新生、増殖因子、血管内皮細胞、再生医学、組織工学

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは以前ヒトの皮下脂肪組織中に骨髄由来幹細胞と同様の性質を有する細胞が存在することを 2001 年に世界で初めて証明し (Zuk et al, Tissue Eng 2001)、更には、全身の細胞に緑色の蛍光を発する GFP トランスジェニックマウスにおいても同様の幹細胞が獲得できることも 2004 年に世界で初めて証明することで本幹細胞を用いた動物実験系も確立した (Ogawa et al, BBRC 2004)。この脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived Stem Cells、以下 ASC と略す。) は in vivo においても種々の成熟細

胞 (脂肪、骨、軟骨、骨格筋など) に分化することが分かっており、我々の研究グループにおいても in vitro、in vivo で脂肪組織、軟骨組織、骨組織、骨髄組織、肉芽組織、歯周組織、神経細胞、心筋細胞の再生に成功し、その成果をこれまで多くの国内外における学会発表、論文発表を行い広く認知されるに至っている。ASC は実際の臨床応用を考えた際、自己由来の細胞を用いる限り生命倫理に抵触する可能性が殆どなく、免疫拒絶の問題もない上で胚性幹細胞 (ES 細胞) と大きく異なり、さらに骨髄と比較しても全身に大量に存在するため一度に多くの細胞が獲得でき

る上、ドナーの犠牲も最小限でかつ安全に使用できるという点で、将来の再生医療における重要な細胞源のひとつとして広く認識されるに至っている。

このASCは近年、血管内皮細胞にも分化可能であることが証明され、動物実験において下肢虚血性病変（閉塞性動脈硬化症など）や虚血性心疾患（急性心筋梗塞、慢性心不全など）の改善に有用であることも分かってきた（Planat-Bernard et al, Circulation 2004）。更にはASCの局所投与により皮弁血流の改善効果も認められることが最近の我々の研究により明らかとなった（Lu et al, Plast Reconstr Surg 2008）。しかしながらこの血流改善効果にはASCがそもそも有する血管内皮細胞への分化能による直接的効果が関与しているのみでなく、ASCから分泌される血管増殖因子などの液性成分を介した間接的効果によるものとの指摘もあり（Rehman et al, Circulation 2004）、血管再生における具体的かつ詳細な機序に関しては未だ不明のままであり、将来の臨床応用に際してこれらの詳細なメカニズムの解析は急務であった。

2. 研究の目的

本研究では動物モデルにおいて局所の虚血環境を作成し（マウス下肢虚血モデルおよびマウス皮弁虚血モデル）、様々な濃度のASCを局所投与後、虚血環境の改善がどの程度可能かを、肉眼的観察や血管造影所見などをもとに経時的に測定する。また各段階において組織標本を採取し、血管内皮細胞中に占めるASC由来血管内皮細胞の割合を定量化すると同時に、組織内に含まれる血管増殖因子（VEGF、bFGF、HGFなど）の発現を遺伝子レベルで解析、定量化し、その両者のデータを比較することで、双方がどの時点でどの程度血管再生効果に寄与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

当大学動物実験倫理委員会の承認に基づき、全身の細胞にあらかじめ緑色蛍光蛋白（Green Fluorescent Protein）が組み込まれたマウス（C57BL/6 TgN[act-EGFP]0sbC14-Y01-FM131、以下GFP陽性マウス）の鼠径部脂肪塊を全身麻酔下において採取し、我々が既に確立したASC精製プロトコルに従いそれぞれASC細胞を獲得した（Ogawa et al, BBRC 2004）。次に同種同系の野生型マウス（以下GFP陰性マウス）の大腿動静脈を完全に抜去した下肢虚血モデルを過去の報告に従い作成し（Planat-Bernard et al, Circulation 2004）、

6時間後にGFP陽性マウス由来ASC 2.5×10^6 個を右側下肢筋組織内の5か所に注入移植した。コントロール群として左側下肢筋組織内に細胞のない培地のみを注入したものを用いた。

移植後 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 28 日目に再度マウスに全身麻酔をかけた後、虚血下肢の肉眼的な色調の観察、赤外線サーモグラフィによる皮膚温の計測を行った。その後苦痛を与えぬよう安楽死させ、一部のマウスに対しては血管造影を施行し経時的な下肢の血管分布を観察した。また残りのマウスから下腿組織を採取し、一部は標本作成後、抗CD34抗体、抗第Ⅷ因子抗体、抗GFP抗体を用いた組織染色を行い、血管内皮細胞に占めるGFP陽性マウスASC由来血管内皮細胞の割合を検討した。また残りの検体の筋組織から標本作製し、血管増殖因子であるVEGF、bFGFおよびHGFの組織内発現の確認のため免疫染色を実施し、その程度を経時的に確認した。

4. 研究成果

肉眼的には術後2日目よりコントロール群で足の壊死を来すものが出現し、その発現頻度は実験群と比較し経時的に増加した。



図1 術後2日目におけるコントロール群の状態。I趾が既に壊死に陥っている。



図2 術後14日目における虚血下肢(右下肢:ASC投与、左下肢:コントロール)の状態。(写真上)ASC投与群のほうが肉眼的に良好な色調を呈している。(写真下)大腿部筋群の血行もASC投与群のほうが色調的に良好である。

さらに術後28日目に実施した下肢血管造影所見にて、細胞移植群はコントロールに比べて血管数の増加が確認され、血流の良好な回復が認められた。



図3 術後28日目ににおける下肢血管造影。ASC投与群(矢印)において良好な血管再生が確認された。

採取組織中の血管内皮細胞全体に占めるGFP陽性細胞の存在は、移植初期に確認され7日目において約10-15%程度であり、その後その割合は大きな変化はなかった。一方、免疫染色所見による各種血管成長因子(VEGF, bFGF)の発現の程度は、細胞移植後早期よりコントロールに比べて発現が上昇し、移植後後期まで持続した。

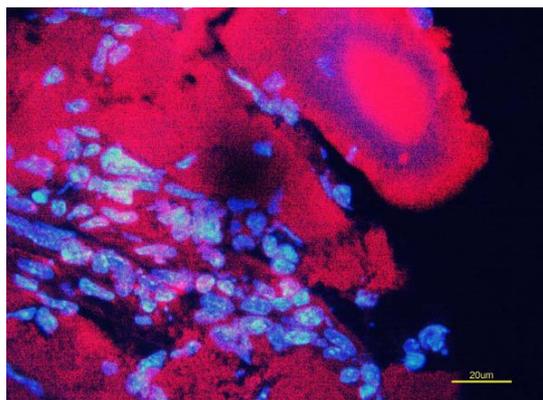


図4 細胞移植後7日目におけるVEGFの発現。抗VEGFモノクローナル抗体を用いた免疫染色において、広い範囲にわたって(赤い部分)発現が認められる。

現時点においてASCの血管内皮細胞への分化の程度と血管成長因子の発現との経時的

な相関関係は未だ明らかにできていないが、移植細胞中の血管内皮細胞への分化率が低いことを鑑みると、血管再生効果は血管成長因子の効果が大であると推測した。

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 11件)

1. Uysal AC, Ogawa R, Tobita M, Hyakusoku H and Mizuno H The effect of adipose-derived stem cells on ischemia reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation *Plast Reconstr Surg* (in press) (査読有)
2. Itoi Y, Takatori M, Hyakusoku H and Mizuno H Comparison of readily available scaffolds for adipose tissue engineering using adipose-derived stem cells *J Plast Reconstr Aesthet Surg* (in press) (査読有)
3. Okuda T, Uysal AC, Tobita M, Hyakusoku H and Mizuno H Prefabrication of tissue engineered bone grafts: an experimental study *Ann Plast Surg* (in press) (査読有)
4. Mizuno H Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review *J Nippon Med Sch* 76: 56-66, 2009 (査読有)
5. Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, Mizuno H, Yanagibayashi S, Yamamoto N, Azuma R, Nakamura S, Kiyosawa T, Ishihara M and Kanatani Y Accelerate wound healing in healing-impaired *db/db* mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix *Ann Plast Surg* 62: 317-321, 2009 (査読有)
6. 水野博司 脂肪組織由来幹細胞注入と脂肪注入の違いによる乳房増大術の現状と課題について *日美外報* 30(3): 161-164, 2008 (査読有)
7. Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H and Mizuno H Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells *Tissue Eng* 14(6): 945-953, 2008 (査読有)
8. Mizuno H, Itoi Y, Kawahara S, Ogawa R, Akaishi S and Hyakusoku H *In vivo* adipose tissue regeneration by adipose-derived stromal cells isolated from GFP transgenic mice

- Cells Tissues Organs 187(3): 177-185, 2008 (査読有)
9. Lu F, Mizuno H, Uysal AC, Cai X, Ogawa R and Hyakusoku H Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells Plast Reconstr Surg 121(1): 50-58, 2008 (査読有)
 10. 水野博司 皮下脂肪-再生医療の新たな細胞源 日医大誌 3(4): 183-186, 2007 (査読無)
 11. Nambu M, Ishihara M, Nakamura S, Mizuno H, Yanagibayashi S, Kanatani Y, Hattori H, Takase B, Ishizuka T, Kishimoto S, Amano Y, Yamamoto N, Azuma R and Kiyosawa T Enhanced healing of mitomycin C-treated wounds in rats using inbred adipose tissue-derived stromal cells within an atelocollagen matrix Wound Repair Regen 15(4): 505-510, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 14件)

1. Mizuno H Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration 9th National Conference of Burn, Reconstructive and Plastic Surgery (2009年3月3日 ハノイ)
2. 奥田貴久、A. Cagri Uysal、Hakan Orbay、河邊京子、小野真平、糸井由里恵、百束比古、水野博司 幹細胞より誘導した再生骨に対しprefabrication手法を用いて血管導入された組織移植に関する研究 第1回日本創傷外科学会(2009年1月17日 東京)
3. Mizuno H, Uysal AC, Orbay H, Okuda T and Hyakusoku H Adipose derived stem cells accelerate primary nerve repair 6th Annual Meeting of International Federation of Adipose Therapeutics and Science (2008年10月16日Toulouse, France 2008)
4. 奥田貴久、A. Cagri Uysal、糸井由里恵、河邊京子、小野真平、Hakan Orbay、百束比古、水野博司 prefabricated flapを用いた再生培養骨への血管付加 第17回日本形成外科学会基礎学術集会(2008年10月2日 東京)
5. Okuda T, Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H and Mizuno H Flap prefabrication technique as a tool for inducing angiogenesis in tissue engineering 3rd Annual Meeting of the Plastic Surgery Research Council (2008年5月30日 Springfield, IL)
6. Mizuno H, Uysal AC, Tobita M, Ito Y, Hyakusoku H and Nambu H Clinical perspective of the stem cell therapy in the field of plastic surgery The 9th Japan-Korean Congress of Plastic and Reconstructive Surgery (2008年2月22日 沖縄)
7. Mizuno H, Hyakusoku H, Miyamoto M and Tabata Y Therapeutic strategy for chronic wound by stem cells or controlled-release of basic fibroblast growth factors International Conference on Advances in Bioresorbable Biomaterials for Tissue Engineering (2008年1月6日 Singapore)
8. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M and Hyakusoku H The effect of stem cells on acute wound healing Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society Asia-Pacific Chapter Meeting 2007 (2007年12月5日 東京)
9. Mizuno H, Uysal AC, Lu F, Ogawa R and Hyakusoku H Angiogenic potential of adipose-derived stem cells in skin flap model Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society Asia-Pacific Chapter Meeting 2007 (2007年12月5日 東京)
10. Uysal AC, Mizuno H, Nambu M, Tobita M and Hyakusoku H The effect of stem cells on acute wound healing 5th Annual Meeting of International Federation of Adipose Therapeutics and Science (2007年10月19日Indianapolis, Indiana)
11. A. Cagri Uysal、水野博司、飛田護邦、糸井由里恵、百束比古 拡張された皮弁に対する脂肪組織幹細胞の影響 第16回日本形成外科学会基礎学術集会(2007年10月11日 神戸)
12. 水野博司 再生医療の現状と脂肪組織幹細胞の有用性 第4回日本獣医内科学アカデミー学術大会(2007年8月12日 東京)
13. Mizuno H, Uysal AC, Tobita M, Itoi Y, Ogawa R, Nambu M, and Hyakusoku H Adipose derived stem cells as a novel source of cell-based therapy *in vivo* The 14th international congress of the international confederation for plastic, reconstructive and aesthetic surgery (2007年6月28日Berlin)
14. Uysal AC, Mizuno H, Ogawa R, Lu F, Tobita M and Hyakusoku H The effect of stem cells on skin flap models: random skin flap, prefabricated skin flap,

ischemia reperfusion injury model,
expanded skin flap The 14th
international congress of the
international confederation for
plastic, reconstructive and aesthetic
surgery (2007年6月28日Berlin)

〔図書〕(計 2件)

1. 水野博司 メディカルドゥ (分
担) 脂肪組織由来幹細胞 「遺伝子医学MOOK
別冊 進み続ける細胞移植治療の実際－再
生医療の実現に向けた科学・周辺要素の理解
－(上巻)細胞移植治療に用いる細胞とその
周辺科学・技術」編集：田畑泰彦 2008;
pp77-80
2. Ogawa R, Fujimura J, Mizuno
H, Hyakusoku H and Shimada T NOVA
Science publishers, New York (分
担) Tissue engineering using
adipose-derived stem cells
harvested from GFP transgenic
animals 「New Developments in Stem
Cell Research」 Editor: Erik V.
Grier 2007; pp149-172

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 博司(MIZUNO HIROSHI)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80343606

(2) 研究分担者

大木 更一郎(OKI KOICHIRO)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：90291715
小池 幸子(KOIKE SACHIKO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：90386227
百束 比古(HYAKUSOKU HIKO)
日本医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：00165135

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

小野 真平(ONO SHIMPEI)
日本医科大学・大学院生