

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390477

研究課題名（和文） 組織および血管のリモデリングにおける脂肪由来幹細胞の機能解析

研究課題名（英文） Functions of adipose-derived stem cells in remodeling of tissue and vasculature

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（和文）：

皮弁挙上、外傷、脂肪移植、圧迫（褥瘡）、放射線照射、血行不全（糖尿病ほか）など、形成外科において脂肪組織が虚血に陥ることは頻りに遭遇するが、何が起きているのか調べられていない。マウスの鼠径脂肪組織（組織酸素分圧 50-60mmHg）で、軽（酸素分圧で正常の 75%）、中（55%）、重症（20%）と 3 種類の程度の急性虚血脂肪モデルを作成し、経時的変化を調べた。4 週間にはその阻血の程度に応じた線維化が形成された。軽症、中症モデルでは血管新生によりは 4 週までに徐々に回復したが、重症モデルでは 30mmHg 程度までであった。虚血誘導後すぐに HIF-1 と bFGF の発現、さらに脂肪細胞のアポトーシス・壊死、マクロファージの浸潤（死細胞の貪食は 4 週間まで）が認められた。死細胞の中には、脂肪細胞以外に、血管内皮細胞や血球由来細胞も見られたが、脂肪前駆細胞（幹細胞を含む：ASC）は見られなかった。こうした傷害変化に引き続き ASC や血管内皮細胞を中心として分裂を繰り返し、再生変化（脂肪新生、血管新生）が認められた。血管新生（レクチン陽性細胞の増加）は 3 日目から、脂肪新生（血管新生を伴う小脂肪細胞の増加）は 7 日目から、ともに 14 日目まで有意に認められた。さらに *in vitro* において、脂肪細胞と ASC を重度虚血環境（1%酸素）で培養したところ、脂肪細胞だけが早期にアポトーシスを起こし、ASC は 3 日間までは生存可能であった（その後壊死）。すなわち、虚血により敏感な細胞から順に細胞死を起こしていく一方、虚血に強い ASC は最低 3 日間は生存し、むしろ虚血変化に伴うシグナルに惹起されて活性化（分裂、遊走、分化）され、虚血に対する適応変化として脂肪新生や血管新生を促すことが分かった。こうした脂肪リモデリング機序が解明されたことは、臨床における組織の阻血、壊死回避のための治療戦略に重要な鍵を与えている。

研究成果の概要（英文）：

Many features of adipose stem/progenitor cells, such as physiological functions and localization, have been clarified in the past decade. Adipose tissue turns over very slowly and its perivascular progenitor cells differentiate into new adipocytes, replacing dead adipocytes. A number of clinical trials using freshly isolated or cultured adipose-derived stromal cells (ASCs) containing adipose progenitor/stem cells are ongoing in more than ten countries. Therapeutic use of adipose stem/progenitor cells has been shown to promote angiogenesis and adipose tissue regeneration. Identification of adipocyte releasing factors upon apoptosis/necrosis would be a break-through to step up to the next stage for adipose tissue regeneration. Activation of precursors in perichondrium and periosteum shows a dramatic neogenesis by only a simple injection and an ideal example of *in situ* tissue engineering. The “hit and catch” strategy using a mobilizer of bone-marrow stem/progenitor cells and a catcher (attractants) to lead the cells to proper homing into the target tissue may be our

future direction of promote manipulation of stem cells. Careful design of microenvironment activating ASCs, cell delivery protocol to avoid unexpected behavior and induce maximal potential of ASCs, and selection of target diseases, will be critical to the success of clinical applications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：形成外科

キーワード：脂肪由来幹細胞、血管内皮細胞、虚血、創傷治癒、血管新生

1. 研究開始当初の背景

我々は脂肪組織が虚血性変化、増殖変化、ターンオーバーにおいて、脂肪組織のリモデリングが起こり、その中で、脂肪細胞だけでなく毛細血管のリモデリングが同時に起きていることを知り、さらにそこで脂肪由来幹細胞が重要な役割を果たしていることを知ることになった。そこで、本研究においては、こうした脂肪組織が組織の成長、維持、修復、などの生理的変化、傷害や炎症などへの適応においておこる種々のリモデリング現象を追跡し、脂肪由来幹細胞の機能するメカニズムを明らかにすることを目的とした研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

これまでの脂肪幹細胞の細胞特性や局在の解析や、臨床応用に必要な保存法や培養法などの開発、評価をさらにすすめて、次の段階である脂肪幹細胞の機能について明らかにしていくことを目的としている。この機能とは、生理的条件下で、また特別な微小環境下で起こりうる脂肪組織や血管組織のリモデリング過程において、脂肪幹細胞がどのような動き(増殖、分化、遊走、など)をするのか、を詳細に調べることである。こうした生理的機能を、また細胞の潜在機能(多能性、分化能など)を知ることにより、その機能を治療という特定の目的のために最大限利

用する方法を導き出すところに最終的な目的が存在する。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や肝臓など胚葉を超えた分化能を有すること、脂肪細胞に比べて阻血に強いこと、条件を選べば効率的な増殖や保存が可能であること、などが明らかになった。しかし、まだ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、脂肪幹細胞といっても、最近その中にもさらに最低2つ以上の細胞群が存在することが示唆されており(未発表データ)、こうした未知の内容を明らかにすることが、脂肪幹細胞の特性や機能の本質を解明するために不可欠であると考えられる。さらに、臨床応用にむけて、幹細胞の潜在機能を使用目的に応じて、恣意的に導き出すための方法を開発する。幹細胞はその微小環境(炎症、接着分子、液性因子、酸素分圧、外的応力、など)に応じた適応反応を示すため、そのパターン解析により、目的に応じた刺激を選択することが可能になる。

3. 研究の方法

研究計画は大きく3段階に分かれる。第1段階は、様々な生理的環境の中での、また突発的環境の中での脂肪由来幹細胞の挙動を観察することである。その挙動を分析することにより、潜在能力や刺激や微小環境

に応じた適応変化を知ることができる。第2段階は、第1段階の結果に基づいて、細胞に体外において別の形で恣意的に同等の刺激を与えて、細胞の挙動を観察し、科学的に作用メカニズムを分析することである。予測通りの挙動が見られれば、次の段階へ移行する。第3段階は、以上の結果をもとに、治療戦略を立て、治療プロトコルの最適化の後に、対象疾患状態を作った動物において、その投与効果を調べることである。本段階自体は臨床応用への前段階に相当する。これらの3段階は複数の動物モデルの観察に始まり、複数の対象疾患に対する治療法の開発を同時平行に走らせるものである。

4. 研究成果

皮弁挙上、外傷、脂肪移植、圧迫（褥瘡）、放射線照射、血行不全（糖尿病ほか）など、形成外科において脂肪組織が虚血に陥ることは頻りに遭遇するが、何が起きているのか調べられていない。マウスの鼠径脂肪組織（組織酸素分圧50-60mmHg）で、軽（酸素分圧で正常の75%）、中（55%）、重症（20%）と3種類の程度の急性虚血脂肪モデルを作成し、経時的変化を調べた。4週間後にはその阻血の程度に応じた線維化が形成された。軽症、中症モデルでは血管新生によりは4週までに徐々に回復したが、重症モデルでは30mmHg程度までであった。虚血誘導後すぐにHIF-1とbFGFの発現、さらに脂肪細胞のアポトーシス・壊死、マクロファージの浸潤（死細胞の貪食は4週間まで）が認められた。死細胞の中には、脂肪細胞以外に、血管内皮細胞や血球由来細胞も見られたが、脂肪前駆細胞（幹細胞を含む：ASC）は見られなかった。こうした傷害変化に引き続きASCや血管内皮細胞を中心として分裂を繰り返し、再生変化（脂肪新生、血管新生）が認められた。血管新生（レクチン陽性細胞の増加）は3日目から、脂肪新生（血管新生を伴う小脂肪細胞の増加）は7日目から、ともに14日目まで有意に認められた。さらにin vitroにおいて、脂肪細胞とASCを重度虚血環境（1%酸素）で培養したところ、脂肪細胞だけが早期にアポトーシスを起こし、ASCは3日間までは生存可能であった（その後壊死）。すなわち、虚血により敏感な細胞から順に細胞死を起こしていく一方、虚血に強いASCは最低3日間は生存し、むしろ虚血変化に伴うシグナルに惹起されて活性化（分裂、遊走、分化）され、虚血に対する適応変化として脂肪新生や血管新生を促すことが分かった。こうした脂肪リモデリング機序が解明されたことは、臨

床における組織の阻血、壊死回避のための治療戦略に重要な鍵を与えている。

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4件、査読有）

- 1) Eto H, Kato H, Suga H, Aoi N, Doi K, Kuno S, Yoshimura K. The fate of adipocytes after non-vascularized fat grafting: Evidence of early death and replacement of adipocytes. **Plast Reconstr Surg** 129: 1081-1092, 2012.
- 2) Eto H, Suga H, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, Higashino T, Yoshimura K. Adipose injury-associated factors mitigate hypoxia in ischemic tissues through activation of adipose stem/stromal cells and induction angiogenesis. **Am J Pathol** 178: 2322-2332, 2011.
- 3) Suga H, Eto H, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, Yoshimura K. Adipose tissue remodeling under ischemia: Death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. **Plast Reconstr Surg** 126: 1911-1923, 2010.
- 4) Eto H, Suga H, Matsumoto D, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Yoshimura K. Characterization of adipose tissue structure and cellular components: Differences between aspirated adipose tissue and excised adipose tissue. **Plast Reconstr Surg** 124: 1087-1097, 2009.

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 浩太郎 (YOSHIMURA KOTARO)
研究者番号：60210762
東京大学・医学部附属病院・講師

(2) 研究分担者

東野 琢也 (HIGASHINO TAKUYA)
研究者番号：70433901
東京大学・医学部附属病院・助教

(3) 連携研究者