

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659320

研究課題名（和文）低酸素に伴う脂肪組織の適応変化に関する研究：細胞死を介した幹細胞の活性化機構

研究課題名（英文）Adaptive changes of adipose tissue to hypoxia: cell death-mediated activation of 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（和文）：

我々は、脂肪組織の創傷治癒（脂肪吸引後）の各段階（凝固期、炎症期、増殖期）において、創部にそれぞれの段階に特有の因子が出ていることを報告した（Aiba-Kojima E, et al., Wound Repair Regen, 2007）。さらに、この初期の因子群には脂肪幹細胞を刺激する因子が含まれていることから、初期の傷害因子群を投与すれば、一連の創傷治癒過程と類似した反応を惹起できるのではないかと仮説を立てた。初期の因子群には他の段階にはあまり見られない bFGF, EGF, PDGF, TGF β が含まれており、臨床で得られた濃度組成に合わせてカクテルを作製し、AIC（脂肪傷害因子群）と名付けた。AIC および構成因子はそれぞれ程度は違うものの（血管内皮細胞は刺激せず）脂肪幹細胞の増殖、遊走、ネットワーク形成を促進したが、創傷治癒の後段階で現れる VEGF は脂肪幹細胞を刺激せず、逆に血管内皮細胞を刺激した。脂肪幹細胞は AIC のもとでは、脂肪細胞や血管構成細胞に分化しやすい傾向が見られた。一方、動物実験では阻血脂肪を外科的に作成したモデル、および阻血脂肪を持つ糖尿病マウスモデルで、AIC を徐放化ビーズとして局注治療したところ、脂肪幹細胞が活性化され、血管新生が見られ、線維化が抑制され、組織の酸素分圧が有意に上昇した。本研究の結果から、AIC を用いて脂肪組織における創傷治癒類似反応を惹起することにより、あらゆる虚血組織の血管新生治療に応用できる可能性が示唆された。本治療は、細胞治療ではないためコストや安全性の面で非常に優れており、臨床応用が容易である。AIC は PRP 含有の増殖因子を複数含んでおり、PRP を利用することで簡便に作成が可能であり、実際的な有用性が高いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Based on the analysis of exudates from injured adipose tissue, we prepared a mixture containing the injury-associated growth factors at the same proportion as the exudates, named adipose injury cocktail (AIC). We hypothesized that AIC induces a series of regenerating and angiogenic processes without actual wounding. The purpose of this study is to elucidate therapeutic potentials of AIC. AIC preferentially activated adipose-derived stem/progenitor cells (ASCs) to proliferate, migrate, and form capillary networks compared to vascular endothelial cells, while VEGF did not induce mitogenesis or chemotaxis in hASCs. Each component growth factor of AIC was differently responsible for the ASC activation. AIC-treated ASCs tended to differentiate into adipocytes or vessel-constituting cells rather than other cell types. In ischemic adipose tissues of mice, induced

either by a surgical intervention or by diabetes, AIC administration enhanced proliferation, especially of CD31-/CD34+ ASCs, and mitigated tissue hypoxia by increasing capillary density and reducing fibrogenesis. These results suggested that AIC may have therapeutic potentials for various ischemic/hypoxic conditions by inducing adipose remodeling and neovascularization through activation of ASCs and other cells. Treatment with AIC has many advantages over cell-based therapies with regard to morbidity, cost, and physical risks, and may be used for an alternative therapy for improving tissue oxygen tension.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

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

肥満が高血圧や糖尿病などの様々な成人疾患の原因となっていることが明らかになってきた。特に近年、肥満の脂肪組織は正常脂肪組織と比較して低酸素状態にあり、この低酸素こそが肥満の脂肪組織における慢性炎症や一連の機能異常の原因であるという説が注目されている。この仮説は非常に興味深いものの、低酸素の直接的な影響は正常個体の培養細胞を用いて in vitro で調べられているに過ぎず、生体の脂肪組織における低酸素の影響について調べた研究はこれまで皆無である。

2. 研究の目的

最近脂肪組織はゆっくりとターンオーバーしていることが明らかにされ、そのリモデリングをつかさどる脂肪組織局在幹細胞は胚葉を超える多能性を示す組織幹細胞として、再生医療の新たな細胞源として注目されている。本研究は、慢性炎症の原因とされる脂肪組織における低酸素の影響を調べるのみならず、脂肪細胞などの成熟細胞の細胞死が脂肪幹細胞を活性化する制御機構を明らかにし、さらに血管新生などのための再生医療を実現することを目的としている。

3. 研究の方法

1) 3段階の低酸素モデルの開発および虚血程度の測定

単径部脂肪に流入する血管を顕微鏡下で処理することにより、4つのバリエーションでモデルを作成する。脂肪組織の組織酸素分圧を針を刺入して直接測定し、作成直後においてそれぞれ10、30、60%阻血であることが確認された。同様に経時的にそれぞれのモデルにおける組織酸素分圧を測定する。

2) 各モデルにおける遺伝子発現

各モデルの6時間、1、3、7、14、30日後に脂肪組織を回収し、種アディポサイトカイン、虚血関連因子、炎症関連因子などの発現変化を調べる。レプチン、アディポネクチン、PPAR γ 、HIF1 α 、VEGF、HGF、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、MMP2、MMP9、GLUT1、PAI-1などを予定している。

3) 各モデルにおける組織染色

各モデルの1、3、7、14、30日後に脂肪組織を回収し、組織学的解析を行う。特に、ペリリピン陰性壊死脂肪細胞、肥満で認められるマクロファージ(F4/80、MAC-2、CD68などの免疫染色)の集積、いわゆる crown-like structure や新生脂肪細胞をカウントする。また、低酸素によるアポトーシスを TUNEL 染色、アネキシンFACSで経時的に定量評価する。Ki67の免疫染色を多重染色で行い、増殖細胞の特定と定量を行う。

4) 新しい Whole mount 染色

未固定の脂肪組織を特殊蛍光色素(脂肪細胞：BODIPY、血管：Lectin、核：Hoechst

33342)で染色し、共焦点顕微鏡で観察する方法であり、生体に近い状態で脂肪組織を観察できる優れた方法である。また、低酸素によってネクローシスに陥った細胞の検出、低酸素刺激後の脂肪由来幹細胞、血管内皮細胞の追跡にも有用である。低酸素刺激後に増殖している細胞の細胞種を特定する。

5) マルチカラーフローサイトメトリを利用した細胞レベルでの観察

脂肪細胞以外の諸細胞群は、コラゲナーゼ処理後に遠心を行うことにより、stromal vascular fraction (SVF)として採取でき、Flow cytometry での解析が可能である。多重解析を行い、各種細胞(脂肪由来幹細胞、血管内皮細胞、血液由来細胞)の割合を同時に定量する。また、PIやAcLDLの取り込み能、アポトーシスを起こす細胞、増殖する細胞の特定と定量、および経時的変化を調べる。

6) 低酸素刺激、各アディポサイトカインおよびシグナル伝達経路の障害、新治療の開発

HIFを介した低酸素刺激、低酸素によって発現が変化するアディポサイトカイン、関与するシグナル伝達経路の特異的阻害剤を投与し、低酸素による脂肪組織の変化に及ぼす局所的、全身的影響を検討する。さらに、阻害によって大きな変化が起こるアディポサイトカインについては、阻害ではなく逆に投与を行った場合についても検討を行い、新治療への戦略を見出す。

7) In vitro 系における脂肪由来幹細胞、血管内皮細胞、マクロファージの低酸素刺激による変化

低酸素(1%酸素、10-20mmHg)、生理的酸素(6%酸素、50-60mmHg)、高酸素(20%酸素、150mmHg)

において培養したそれぞれの細胞の遺伝子発現の変化を見る。また、低酸素下においてそれぞれの細胞が分泌する因子(培地)を互いにクロスして加えて、paracrine の影響を詳細に分析する。

8) 細胞死による分泌因子の解析

脂肪細胞、血管内皮細胞をそれぞれ単離、培養し、強制的に細胞死を誘導する。その際に、細胞から分泌される因子を細胞死因子(仮名)として、同定、定量する。Caspase3によりアポトーシスを抑制し、その変化を確認する。

4. 研究成果

本研究は、vivo および vitro において脂肪組織の急性虚血環境を再現し、その適応変化を多角的に検討した。方法：1) マウス鼠径脂肪の虚血モデルを作成し、

酸素分圧、組織学的変化、FACSを評価した。2) ヒト吸引脂肪組織を遊離状態におき、組織学評価とFACSにて細胞種別に経時的生存率を比較した。3) 脂肪組織構成細胞(脂肪由来幹細胞;ASC、血管内皮細胞;EC、脂肪細胞)を虚血下に培養し生存率を比較した。4) 虚血環境での細胞間相互作用を検討した。

結果：マウス脂肪組織の正常酸素分圧は61.4 ± 1.0 mmHgであり、30%を下回る虚血環境になると経時的に組織学的変化が生じた。脂肪細胞の死と血液細胞の浸潤が目立つ一方で、ASCとECは増殖し、その後血管新生および脂肪新生の所見がみられた。吸引脂肪組織を虚血環境下に24時間器官培養すると、脂肪細胞の100%、血管周囲細胞の51%が壊死細胞であった。またFACS解析では生存率が10%を下回るのは、ECは24時間後、ASCは72時間後であり、細胞種によって虚血への耐性が異なることが示された。培養細胞でも虚血を維持すると脂肪細胞、EC、ASCの順番で死に至った。さらに死細胞の細胞上清によりASCの増殖能は亢進し、脂肪分化傾向を増した。

考察：脂肪組織が重度の虚血環境におかれるとまず脂肪細胞が壊死に陥り、虚血状況が改善されない場合はひき続いてEC、ASCも壊死に陥ると考えられた。細胞死に続く組織内適応変化は、死に至る細胞が放出する因子により誘導されることが示唆された。液性因子により、虚血耐性の強いASCが増殖、分化し、組織再構築を司るという環境適応のためのメカニズムの存在が示唆された。

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2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.

〔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