

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23792036

研究課題名（和文）

移植脂肪細胞の生着向上におけるアクアポリン機能の同定と修飾法の探索

研究課題名（英文）

The role of aquaporin in the mechanism of adipocyte graft survival

研究代表者

窪田 吉孝 (KUBOTA YOSHITAKA)

千葉大学医学部附属病院・助教

研究者番号：10375735

研究成果の概要（和文）：

水チャネルであるアクアポリン-1は低酸素刺激により血管内皮細胞で発現誘導され、細胞遊走などに関連している可能性が示唆されている。細胞ヒト腹部皮下組織から採取した天井培養由来増殖性脂肪細胞および脂肪組織由来幹細胞がともに、アクアポリン-1を発現し、ともに低酸素下でアクアポリン-1の発現を上昇させるが、その程度は脂肪組織由来幹細胞の方が強いことを明らかにした。アクアポリン-1が低酸素環境下における細胞生存に普遍的に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Aquaporin1, first discovered as a water channel, is suggested to have multiple roles including cell migration. We previously reported that hypoxia increased Aquaporin1 in human retinal vascular endothelial cell. In this study, we have revealed that both adipose derived stem cell and ceiling culture derived proliferative adipocyte, harvested from human abdominal subcutaneous fat tissue, have Aquaporin 1. Hypoxia increases Aquaporin 1 in both types of cell. The result suggests that aquaporin 1 is related to not only a water transportation but also cell survival in hypoxic condition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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

脂肪細胞移植法は形成外科領域において組織増量による形態改善を目的として行われる有用な方法である。脂肪移植はドナーの豊富さ・安全性・移植後形態の自然さ(Bucky, *Aesthet Surg J* 2008)から、今後ますます応用

領域が広がることが確実である。しかし、移植の問題点として、生着率が20-40%程度 (Tremolada, *Cell Transplant* 2010)と低く、成績が不安定な点がある。このことは、臨床上、適応を拡大するうえで重大な障害であり、この問題を克服するために世界

中で様々な基礎研究が行われている。我々は、移植脂肪細胞が避けることのできない初期の移植環境が悪い低酸素状態で早急に細胞機能を改善する技術開発の重要性に着目した。すなわち、第一に低酸素下における生着を向上させることである。この標的蛋白として我々は膜蛋白アクアポリン (Fruhbeck, *Nature* 2005) に注目した。その理由は、下記のように共同研究者により水チャンネル作用以外に血管新生に関わる新しい機能が明らかにされたからである。

(1) 網膜に発現するアクアポリン-1 は、VEGF と独立し、また協調的に低酸素状態における血管新生を誘導する (Kaneko, *Microvasc Res* 2008)。

すなわち、低酸素とともに引き起こされる代表的な病態である糖尿病性網膜症の血管新生作用でアクアポリンが促進的に関与しているという事実である。したがって、網膜症治療とは逆に脂肪細胞ではアクアポリン機能を亢進またはアクアポリン遺伝子発現を増強することが、移植環境が悪い中で移植細胞の生着を向上させるという発想に至った。

脂肪細胞におけるアクアポリンの存在およびその役割についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

脂肪細胞に各種存在状態におけるアクアポリンサブタイプごとの発現の確認と低酸素環境下における発現誘導を明らかにする。

3. 研究の方法

これまでに我々はヒト由来脂肪細胞の採取・調整ならびに分化・培養の手法を確立している。

我々は本研究を実施するためにヒト由来培養脂肪細胞を調整し解析することについて千葉大学倫理委員会の承認を得た。ヒト腹部術中摘出脂肪組織 (用いて、単一脂肪細胞調整を行い、本調整ヒト脂肪細胞におけるアクアポリンアイソフォーム発現の同定、低酸素誘導因子による発現調節解析を行った。

(1) ヒト脂肪細胞におけるアクアポリンの発現解析

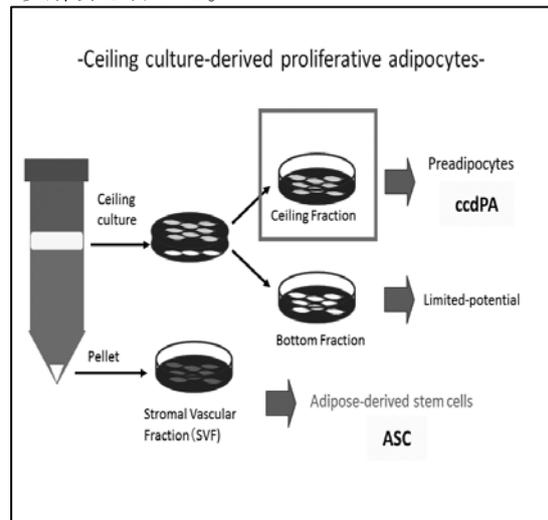
ヒト腹部皮下組織を鉗で細切後、コラゲナーゼ処理 1 時間行ったのち、遠心分離した。
① 沈殿分画 (stromal vascular fraction, SVF) を分離採取して、フラスコに播種した。

② 同時に浮遊層分画を、分離採取してフラスコに播種し培養液を満した。

①、②両者を 37°C、5% 二酸化炭素環境下で 1 週間培養した。

①は脂肪組織由来幹細胞 (Adipose derived stem cell: ASC), ②は天井培養由来増殖性脂肪細胞 (ceiling culture derived proliferative adipocyte, ccdPA) である。

ASC, ccdPA をトリプシン処理して回収して RNA を抽出し、逆転写酵素で cDNA とし、polymerase chain reaction にて mRNA の発現解析を行った。



(2) ヒト脂肪細胞における低酸素環境下におけるアクアポリンの発現解析

これまでに我々はヒト網膜血管内皮細胞 (human retinal vascular endothelial cell, HRVEC) において、低酸素環境がアクアポリン 1 の mRNA 発現と蛋白質発現を上昇させることをあきらかにした。

脂肪細胞におけるアクアポリン各アイソフォームの発現調節を、ガス環境的要因に焦点をあてて検討した。すなわち、移植初期状態 (低酸素分圧)、移植後期定常状態 (正常酸素分圧) によるアクアポリン発現誘導を mRNA で解析した。

-80°Cセルバンカー保存液凍結保存状態だったヒト腹部皮下組織由来の脂肪組織由来幹細胞 (ASC), 天井培養由来増殖性脂肪細胞 (ccdPA) を 37°C 湯浴で急速解凍のち、フラスコに播種した。72 時間後、トリプシン処理して回収し、12 ウエルディッシュに播種した。12 時間後、hypoxia chamber を用いて低酸素環境下で培養を開始した。ガス環境組成は 2% 酸素、5% 二酸化炭素、93% 窒素とした。コントロールとして常酸素 (normoxia) での培養をおこなった。

Normoxia のガス環境蘇生は 21% 酸素、5% 二酸化炭素、74% 窒素とした。

48 時間後、トリプシン処理して回収して

RNAを抽出し、逆転写酵素でcDNAとし、polymerase chain reactionにてmRNAの発現解析を行った。

(3) ヒト腹部皮下組織の解剖学的構築とアクアポリン発現の関連の解析

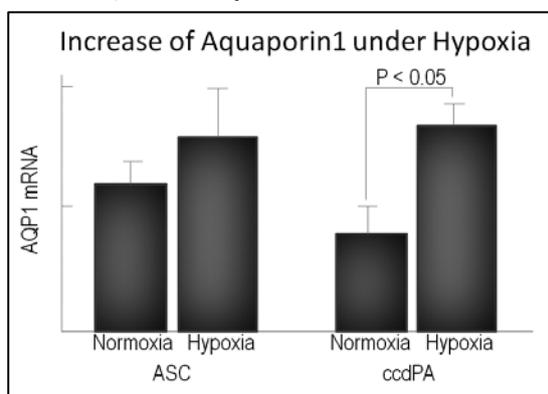
脂肪移植法のドナーのひとつである腹部皮下組織には、浅筋膜により隔てられた浅層皮下脂肪組織と深層皮下脂肪組織が存在することが知られている。両者は、解剖学的構築の違いから異なる物理的身体保護作用を持つが、細胞レベルでの機能的差異は明らかではない。皮下組織浅層と深層それぞれの脂肪細胞・脂肪組織由来幹細胞の細胞機能の違いを明らかにし、再生医療の目的別に適した細胞調製法を探索することが必要であると考えた。

ヒト腹部皮下組織の浅層と深層を分離したのち、それぞれから脂肪組織を採取した。鋏で細切のち、コラゲナーゼ処理して遠心分離した。沈殿層(stromal vascular fraction, SVF)と、浮遊細胞層(脂肪細胞)を分離回収した後、RNAを抽出し、逆転写酵素でcDNAとし、polymerase chain reactionにてmRNAの発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト脂肪細胞におけるアクアポリンの発現解析

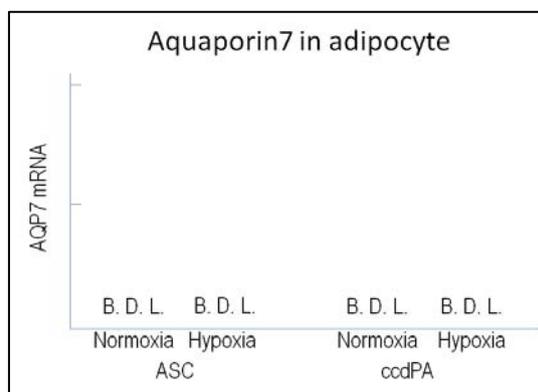
ヒト脂肪組織から分離培養した、脂肪組織由来幹細胞(Adipose derived stem cell, ASC)、天井培養由来増殖性脂肪細胞(ceiling culture derived proliferative adipocyte, ccdPA)ともにアクアポリン1を発現していることが明らかになった。一方、グリセロールチャンネルであるアクアポリン7は、ASC, ccdPAともに発現がみられなかった。成熟脂肪細胞においてはアクアポリン7はグリセロールチャンネルとして重要な役割を果たしているが、天井培養直後のccdPAでは脂肪滴は消失しており、ともなってアクアポリン7が消失したものと考えられた。



(2) ヒト脂肪細胞における低酸素環境下におけるアクアポリンの発現解析

2%低酸素刺激により、ASC, ccdPAともにアクアポリン1の発現上昇がみられた。発現上昇の程度はccdPAで大きかった。一方、アクアポリン7は低酸素刺激による発現誘導はみられなかった。

低酸素環境下におけるアクアポリン1誘導が、血管内皮細胞のみでなく脂肪組織由来幹細胞、天井培養由来増殖性脂肪細胞においてもみられることが明らかになった。水チャンネルアクアポリン1が低酸素環境下における細胞生存に重要かつ普遍的な役割を果たしている可能性が示された。一方、グリセロールチャンネルアクアポリン7は低酸素環境下における細胞生存にはあまり関与せず、脂肪細胞の成熟後の脂質代謝に関わるチャンネルであろうことが示唆された。



(3) ヒト腹部皮下組織の解剖学的構築とアクアポリン発現の関連の解析

皮下組織浅層から分離した、SVF,脂肪細胞の方が、深層から分離したSVF,脂肪細胞と比べてアクアポリン1の発現が低い傾向がみられた。

肥満状態では、皮下組織浅層・深層ともに組織量が増加するが、その程度は深層の方が大きいことが明らかになっており、両者は代謝環境が異なることが推定される。アクアポリンとの関連は今後さらなる検討が必要である。

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)

[学会発表] (計 2件)

(1) Yoshitaka Kubota, The role of aquaporin under hypoxic condition in early stage of adipocyte transplantation, 4th Congress of the World Union of Wound Healing Society, Sep. 2-Sep. 6, 2012. Yokohama, Japan.

(2) 窪田吉孝、三川信之、小坂健太郎、安

達直樹、秋田新介、力久直昭、黒田正幸、武
城英明、佐藤兼重 (2012). 皮下組織浅層・
深層の機能的差異の解析研究 第 21 回日本
形成外科学会基礎学術集会、福島

研究者番号：

(1)研究代表者

窪田 吉孝 (KUBOTA YOSHITAKA)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10375735