

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791739

研究課題名 (和文) 脂肪由来幹細胞を用いた血管内皮・周皮細胞分化誘導法の開発

研究課題名 (英文) Investigation of differentiation induction method of capillary endothelial cells and pericytes by using adipose derived stem cells

研究代表者

東野 琢也 (HIGASHINO TAKUYA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70433901

研究成果の概要 (和文)：ヒト皮下脂肪組織の損傷後に放出される 4 つの因子 (bFGF, EGF, PDGF, TGF-β) を混合し、脂肪組織創傷治癒関連因子カクテル (AIC: Adipose injury cocktail と命名) を作成した。AIC は主に脂肪由来幹細胞 (Adipose derived Stem Cell) を活性化し、増殖、遊走を促進し、脂肪および血管内皮系統への分化傾向を高めた。急性虚血脂肪組織や糖尿病脂肪組織への AIC 局所投与により、ASC を主とする細胞増殖を生じ、血管新生および脂肪新生所見がもたらされた。AIC は虚血脂肪組織に対する血管新生治療として有用であることが示唆され、虚血性難治性潰瘍などに対する血管新生治療に適用できると考えられた。

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). The purpose of this study is to elucidate the therapeutic potentials of AIC. AIC preferentially activated adipose-derived stem/progenitor/stromal cells (ASCs) to proliferate, migrate, and form networks compared with vascular endothelial cells. AIC-treated ASCs tended to differentiate into adipocytes or vessel-constituting cells rather than into other cell types. In ischemic adipose tissues of mice, induced by either a surgical intervention or diabetes, AIC administration enhanced proliferation, especially of CD31-/CD34+ ASCs, and mitigated tissue hypoxia by increasing capillary density and reducing fibrogenesis. These results suggest 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 regarding morbidity, cost, and physical risks and may be used as an alternative therapy for improving tissue oxygen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

キーワード：AIC、増殖因子、ASC、血管新生治療

### 1. 研究開始当初の背景

創傷治癒の過程で脂肪組織の創傷治癒過程を解明することは、難知性潰瘍などの深い創を治癒させる上で重要である。脂肪細胞の新生・増生には必ず毛細血管新生が伴うことが知られている。一方で脂肪組織内には脂肪幹細胞 (adipose-derived stem cells:ASCs) と呼ばれる多能性細胞が含まれており、これが ECs に分化したり血管新生因子を分泌することで血管新生に関与していることが報告されている。しかし、その効率的な分化誘導方法は確立されていない。また、ASC が複数の成長因子を放出し、これらが血管新生因子に関与していることも明らかになっている。しかし最適な因子の組み合わせ、濃度配分は確立されていない。我々は以前外科手術後のドレーン排液を解析し、損傷後脂肪組織内には創傷治癒過程別に異なる成長因子が放出されていることを報告した。この放出される因子のなかで初期に放出されるものがその後の反応のトリガーになると考え、これを同じ濃度配分で調整混合し、脂肪組織創傷関連因子カクテル (adipose injury cocktail:AIC) と名付けた。そしてこの AIC により効率的な血管新生誘導が行えるのではないかと仮説した。

### 2. 研究の目的

本研究では、AIC が疑似的障害環境を作り、組織幹細胞を活性化して組織再生をもたらすかどうかを検討した。そして新たな血管新生治療の開発を行うことである。

### 3. 研究の方法

培養ヒト ASCs およびヒト ECs への AIC の影響を調べた。また AIC を生体脂肪組織に局所投与することで、組織に局在する ASCs が活性化され、脂肪新生や血管新生をもたらす、組織の酸化状態を改善するか確認した。またマウスの単径脂肪を用いて正常脂肪モデル、急性虚血脂肪モデル、糖尿病モデルを作成し、AIC の影響を調べた。

### 4. 研究成果

ASCs 及びヒト ECs の増殖を促進した (図 1)。

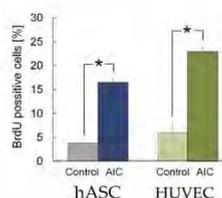
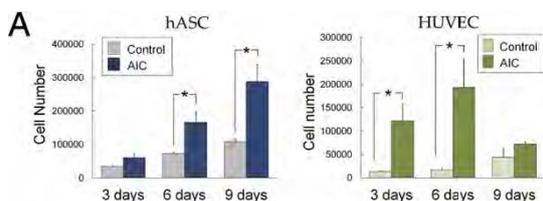


図 1: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

AIC を構成する各因子間の共力作用を調べるため、不完全 AIC (4 因子のうち、3 種類を組み合わせる) を用いて BrdU assay を行ったところ、どの増殖因子を 1 つ欠いても増殖効果は維持されず、4 因子は相補的に作用していることがわかった (図 2)

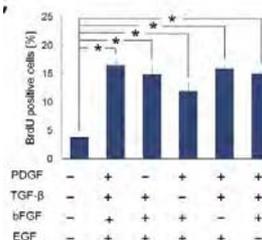


図 2: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

AIC はヒト ASCs の遊走を促進したが、HUVECs の遊走には影響しなかった (図 3)。

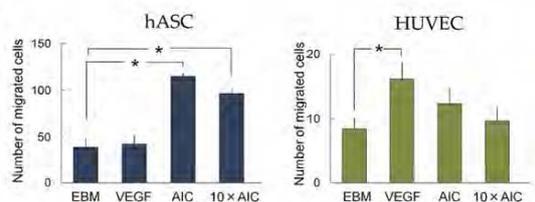


図 3: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

AIC 刺激により、ヒト ASCs の脂肪分化傾向は高まり、軟骨分化傾向及び骨分化傾向は低下した (図 4)。

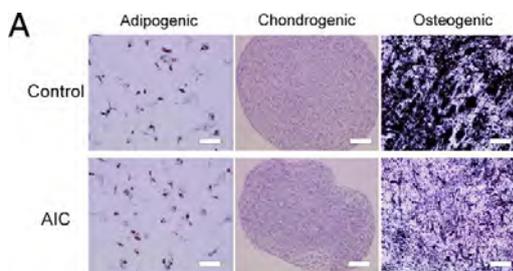


図 4: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

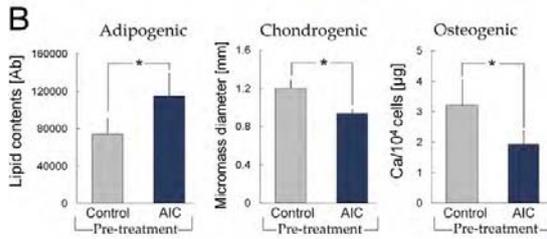


図4: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

AIC 刺激により、ヒト ASCs は顕著に複雑な血管様ネットワーク構造を形成した (図 5)。

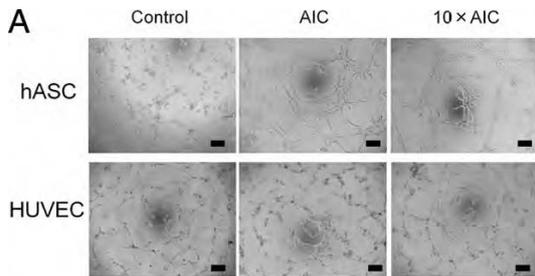


図5: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

AIC が形成するネットワークは Lectin 陽性であり、HUVEC と同定での vWF を発現した。これらの所見より AIC に刺激された ASCs は ECs に分化することが示唆された (図 6)。

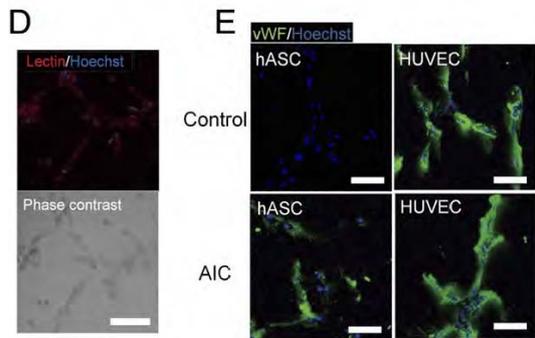


図6: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

健常マウスの単径脂肪組織の栄養血管を結紮切離して作成した虚血モデルでは、モデル作成 1 週後で、AIC 投与群で脂肪組織酸素分圧が有意に上昇した (図 7)。

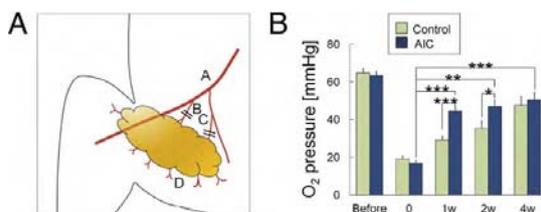


図7: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

4 週間の実験期間を通して AIC 投与群で有意な血管密度の増加を認めた。(図 8)

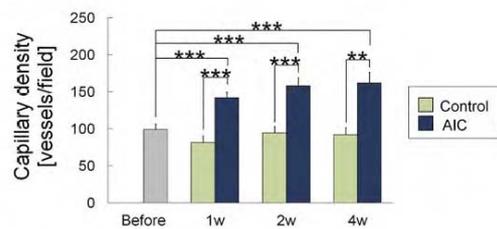
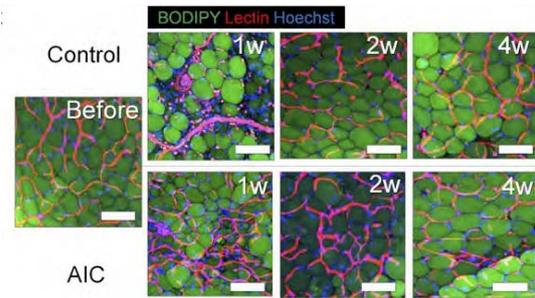
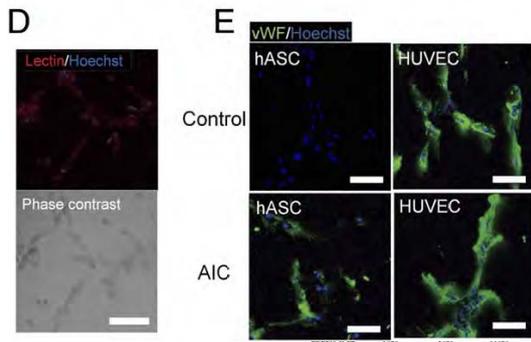


図8: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用



より引用

RealTimeRT-PCR を用いて遺伝子発現解析をおこなったところ、AIC 投与により、1 週間後の CD34、Flk-1、及び CD31 の mRNA 発現促進がされた (図 9)。

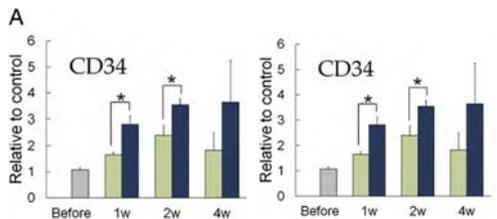


図9: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

リモデリング過程を比較すると、AIC 投与群では線維化が有意に少なかった (図 10)。

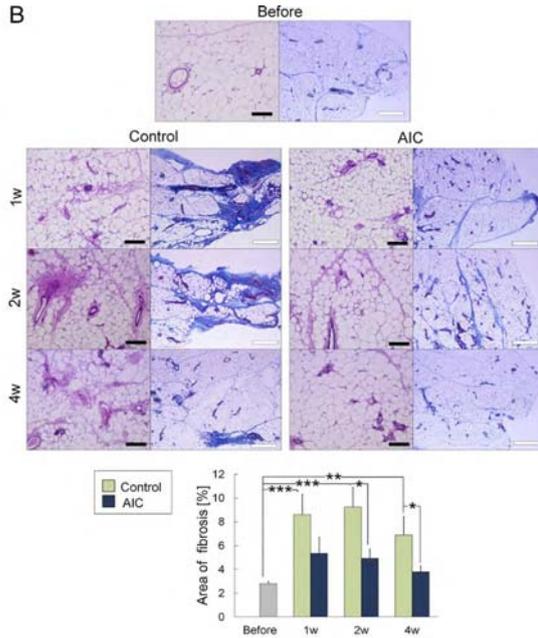


図 10: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

糖尿病マウスの脂肪組織は慢性的に虚血状態にある。AIC は糖尿病マウスの脂肪組織に血管新生を促した (図 11)。

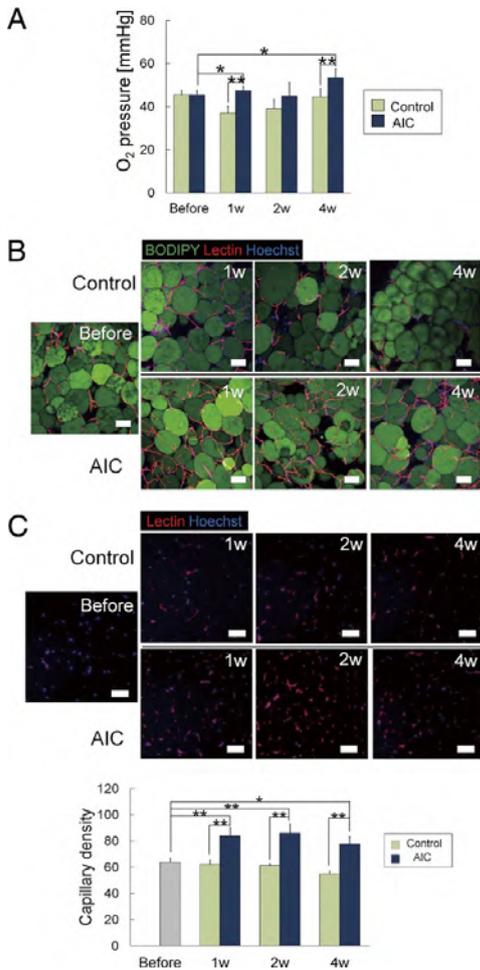


図 11: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

パラフィン切片をペリリピン染色し、小サイズ perilipin+細胞は新生脂肪細胞であり、AIC 投与群で増加した (図 12)。

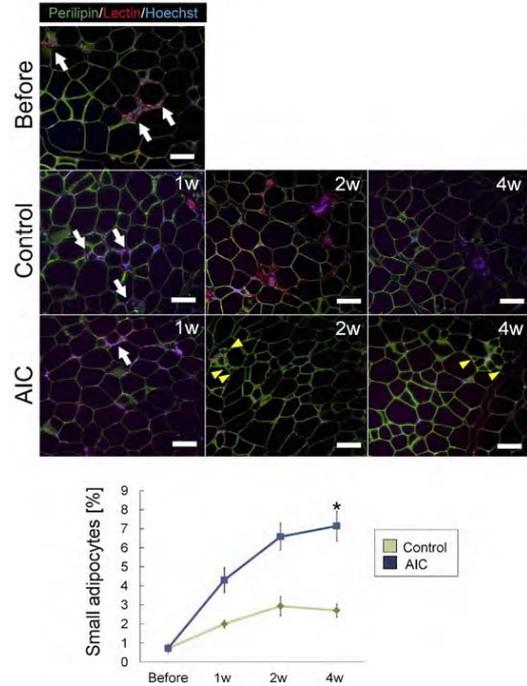


図 12: [Eto et al. Am J Pathol 2322-32, 2011] より引用

本研究の結果より、AIC は急性虚血脂肪組織や糖尿病脂肪組織に血管新生及び脂肪新生を生じ、適切な脂肪再構築と酸素化改善をもたらすことが示された。糖尿病脂肪組織はま線維的に虚血状態にあることを考慮すると、AIC は虚血脂肪組織に対する血管新生治療ツールとして有用であることが示唆され、虚血性難知性潰瘍などに対する血管新生治療に適用できると考えられた。

### 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 1 件)

- ① Eto H, Suga H, Inoue K, 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-Derived Stem/Progenitor/Stromal Cells and Induction of Angiogenesis. Am J Pathol.

2011 May;178(5):2322-32

査読あり

[学会発表] (計 1 件)

①発表表題: 急性虚血誘導時の組織内適応変化の解析

学会名: 第 19 回日本形成外科基礎学術集会

発表年月日: 2010 年 6 月 17 日

発表場所: パシフィコ横浜

[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]

なし

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東野 琢也 (HIGASHINO TAKUYA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 70433901

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし