

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5月31日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700486

研究課題名（和文）脂肪組織由来細胞を用いた組織再生の解明-イメージングシステムを駆使して

研究課題名（英文）Investigation of tissue regeneration by adipose tissues-derived cells; Utilizing an imaging system

研究代表者

服部 秀美（HATTORI HIDEMI）

防衛医科大学校・防衛医学研究センター・助教

研究者番号：80508549

研究成果の概要（和文）：脂肪組織は、虚血性疾患に対する細胞移植療法のための有用な細胞供給源といわれている。しかし、脂肪組織由来の細胞移植による組織の再生メカニズムについては不明な点が多い。そこで、脂肪組織由来間質細胞を移植した後に誘発される血管新生について *in vivo* イメージングシステムを用いて検討した。その結果、脂肪組織由来間質細胞移植による血管新生は、移植した細胞と遊走された炎症系細胞との相互作用により生じるのではないかと示唆された。

研究成果の概要（英文）：Adipose tissue is considered to be a useful cell source for cell-based therapy of ischemic disease. However, regeneration mechanism of tissue by adipose tissue-derived cell transplantation has not fully defined. In the present study, we examined about angiogenesis induced after adipose tissue derived-stromal cell transplantation by using an *in vivo* imaging system. From the results, it was suggested that the angiogenesis by adipose tissue derived-stromal cell transplantation was induced by the interaction between injected cells and migrated hematopoietic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	0	2,100,000
2011年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	0	3,100,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：脂肪組織由来間質細胞、骨髄細胞、炎症系細胞、*in vivo* イメージング、ケモカイン、血管新生、血管新生増殖因子

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化や高齢化社会により、動脈硬化、心筋梗塞及び糖尿病などの生活習慣病患者が急増している。日本では、死亡原因

の第1位である「がん」を除き、多くが血管閉塞性の虚血性疾患により死亡している。

イモリのような生物では、目がとれたり足

が切れたりしても組織を元通りにする再生能力がある。しかし、ヒトでは、擦り傷や骨折等の軽度の損傷においては時間を費やせば元通りになるものの、切断された手足を元通りに戻す能力までは備わっていない。下肢虚血による潰瘍や壊疽の患者において、最悪の場合、足の切断ということもありうる。イモリではないため、足が切断されたら二度と元には戻らない。

近年、成人の組織に幹細胞が存在することが報告されており、脂肪組織中にも骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、血管系の細胞などに分化可能な幹細胞が存在するといわれている。脂肪組織は脂肪細胞や幹細胞だけでなく様々な細胞が存在する multi-potential な細胞の集合体である。脂肪組織は、これまで単純なエネルギー貯蔵庫という役割だけを果たしていると思われていたが、近年、生理活性を有する様々なサイトカインや増殖因子等がこの組織から分泌されるとの報告が数多くなされており、内分泌機能を司る重要な組織であるといわれている。また、脂肪組織には、豊富な血管網が発達し、さらに血管新生増殖因子も高濃度に分泌するという報告もある。

本来備わっているヒトの自己治癒能力を超えた治療を行うためには、細胞、マテリアル、タンパク質など、何か外部から注入する必要がある。近年、細胞移植療法に用いるための細胞供給源として、脂肪組織が注目されている。脂肪組織を使用する利点は、生体中に約 20%も存在する豊富な組織であること、そして、皮下脂肪組織であれば、カニューレを使用することによって比較的容易に低侵襲的に採取することができるがあげられる。この脂肪組織由来の細胞を用いて、効果の高い細胞移植療法が期待されている。

2. 研究の目的

下肢虚血や心筋梗塞などの疾患に対して、脂肪組織由来の細胞を注入することによる組織再生が試みられている。血管新生を目的とした組織再生の場合、その予後のメカニズムは、移植した細胞が血管内皮細胞や血管平滑筋細胞などの血管を構成する細胞となることで血流が再開するという説と、移植した細胞が分泌する血管新生増殖因子が移植した周辺の血管に作用し、新たな内皮細胞が遊走され血管が形成されるという説など諸説ある。そのため、細胞移植における血管新生におけるメカニズムについては不明な点が多いため、効果的な細胞移植療法を行うためには、血管新生を含む組織再生のメカニズ

ムについて解明することが重要である。

組織再生は、炎症期、肉芽形成期、リモデリング期などの一連の過程において様々な細胞が状況に応じて活躍し、収束過程を経て組織が元に戻る。炎症とは、侵襲に対する生体反応であり、生体に外傷などの侵襲が加わると様々な分子や細胞が活性化される。プロスタグランジン、プロテアーゼ、サイトカイン、ケモカインなどの炎症性メディエーター、そして細胞内外に存在する多くの分子と種々の細胞が複雑に関与するのである。その後、毛細血管の新生と肉芽組織の形成や線維化が亢進し、最終的に、組織修復・再生という過程をたどる。ヒトは約 60 兆個の細胞によって構成されているため、数個の細胞やタンパク質による再生機序を *in vitro* で解明しても、生体の組織再生の機序を解明したことにはならない。そこで脂肪組織由来間質細胞 (adipose tissue-derived stromal cells: ASCs) の移植による生体内での作用機序を蛍光 *in vivo* イメージングシステムを用いて、移植した細胞を追跡することによって、何が再生を促進的に作用しているのか全体像を解明する。特に組織再生のスタートとなる炎症期を重点に、移植した細胞との相互作用を可視化し、何が血管新生を導いているのかを解き明かす。

3. 研究の方法

本研究の実施の際には、防衛医科大学校動物実験倫理委員会及び防衛医科大学校組織換え DNA 実験安全委員会の承認を得て行った。

C57BL/6 マウスの鼠蹊部皮下脂肪組織を 0.1% コラゲナーゼタイプ I 溶液によりバラバラにし、100 μm フィルターを用いて余分な組織を除いた。遠心と洗浄を繰り返し得られたのが、プライマリーの ASCs である。5% fetal bovine serum 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium により 2 継代した ASCs を *in vivo* 及び *in vitro* での実験に使用した。

プライマリーの ASCs と 2 継代した ASCs の細胞群の細胞表面マーカーを比較するために、フローサイトメトリーにより検討した。培養上清を用いて、ASCs の分泌するサイトカイン、血管新生増殖因子及びケモカイン等を ELSIA 及び Bio-Plex で定量した。細胞遊走能を調べるために、ケモタキシスチャンバーを用いて検討した。

In vivo の検討として以下の手順で行った。C57BL/6 マウスに X 線照射を行った。翌日 green fluorescent protein (GFP) マウスの大腿骨及び脛骨から骨髓細胞を採取し、溶血

剤で赤血球を破壊し洗浄した後、C57BL/6 マウスの尾静脈からその GFP 陽性骨髄細胞を注入した。ただちに蛍光 *in vivo* イメージング装置を用いて、移植した GFP 陽性骨髄細胞を観察した。次に、2 継代した ASCs を PKH26 で標識し、マウスの皮下へ注入した。それぞれの細胞の生体内の挙動を経時的に蛍光 *in vivo* イメージング装置によって観察した。新生血管の観察には、近赤外蛍光試薬の血管造影剤を用いて観察した。さらに免疫染色を行い *in vivo* とのデータの裏付けを行った。

4. 研究成果

ASCs がどのような細胞集団であるか検討するために細胞表面マーカーを調べたところ、プライマリーの ASCs は 50%以上が CD45 を発現する血球系細胞であった。しかし、継代するうちに血球系細胞は消失し、2 継代した ASCs は、90%以上が CD29 及び Sca-1 陽性の接着細胞群であった。また、CD31 や CD34 のような内皮細胞マーカーは発現していなかった。

血管新生増殖因子である vascular endothelial growth factor、fibroblast growth factor-2 及び hepatocyte growth factor の分泌能を調べたところ、プライマリーの ASCs よりも 2 継代させた ASCs の方が、有意に分泌能が高く、管腔形成能も高いことが分かった。さらに上清中には、keratinocyte chemoattractant、monocyte chemotactic and activating factor、macrophage inflammatory protein-1 などのケモカインも含有していた。そこで、その上清に対する白血球遊走能について検討したところ、顆粒球、好中球及び単球に対して高い遊走能力があることが分かった。

In vivo の検討において、尾静脈から GFP 陽性骨髄細胞を注入した直後、血管内を循環する GFP 陽性細胞の様子を *in vivo* イメージング装置によって観察することができた。PKH26 標識 ASCs を皮下に注入した約 6 時間後から、GFP 陽性骨髄細胞が PKH26 標識 ASCs 注入部位へ遊走し始めた。さらに GFP 陽性骨髄細胞が、血管から血管外、そして組織中へ遊走される様子も観察することができた。経時的に GFP 陽性細胞が集積していく様子も観察できた。

免疫染色による検討の結果、初期に遊走された多くの GFP 陽性骨髄細胞は、顆粒球、好中球及び単球などの炎症系細胞であった。ASCs を注入した群の血管新生を近赤外蛍光試薬の血管造影剤を用いて観察したところ、ASCs 注入部位において炎症が惹起され新生

血管が形成されていた。GFP 陽性骨髄細胞の遊走をブロックすると、ASCs を注入したとしても血管新生が阻害されることが確認された。

以上のことから、ASCs の移植による血管新生は、移植した細胞が血管新生増殖因子を分泌する効果によるものだけでなく、ASCs を移植することでその移植部位へ骨髄由来炎症系細胞が遊走され、それらの細胞の相互作用により生じるのではないかと示唆された。

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 1 件)

① Hattori H, Amano Y, Ishihara M, Imaging of transplanted cells for regenerative medicine、日本生体医工学、査読無、Vol. 50 Suppl. 1 (CD-R) pp. 229-230

[学会発表] (計 10 件)

① 服部秀美、天野嘉子、石原雅之、移植した脂肪組織由来間質細胞の生着及びそれに伴う骨髄細胞遊走作用の *in vivo* イメージング、第 7 回日本分子イメージング学会、2012 年 5 月 25 日、アクトシティ浜松 (静岡県)

② 服部秀美、天野嘉子、石原雅之、再生医療における移植した細胞の可視化、第 51 回日本生体医工学学会大会、2012 年 5 月 11 日、福岡国際会議場 (福岡県)

③ 服部秀美、天野嘉子、高瀬凡平、石原雅之、細胞移植療法における移植した細胞と骨髄由来血球系細胞との相互作用、第 57 回防衛衛生学会、2012 年 2 月 2 日、陸上自衛隊衛生学校 (東京都)

④ 服部秀美、吉本怜子、山崎敬子、石原雅之、キトサンの血液凝集効果について、第 33 回日本バイオマテリアル学会、2011 年 11 月 2 日、京都テルサ (京都府)

⑤ Takase B, Tanaka Y, Higashimura Y, Hattori H, Ishihara M. Transient Right Ventricular Pressure Overload Induced by Pneumonectomy Causes Vulnerability to Lethal Arrhythmias, 4th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session, 2011 年 9 月 22 日、ヒルトン福岡シーホーク (福岡県)

⑥ 高瀬凡平、永田雅良、上畑昭美、田中良弘、服部秀美、石原雅之、藤田正俊、受動的全身周期性加速度運動の末梢血管内皮機能に及ぼす急性効果について、第 17 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会、2011 年 7 月 17 日、大阪国際会議場 (大阪府)

⑦ 服部秀美、天野嘉子、高瀬凡平、石原雅之、マウスの心血管イメージング、第 56 回防衛衛生学会、2011 年 2 月 3 日、陸上自衛隊衛生学校（東京都）

⑧ 高瀬凡平、田中良弘、東村悠子、服部秀美、石原雅之、心筋虚血再還流により生じる出血性ショック心臓の Optical Mapping 所見と蘇生後致死性不整脈の検討、第 24 回日本冠疾患学会学術集会、2011 年 12 月 11 日、東京ステーションコンファランス（東京都）

⑨ 石原雅之、中村伸吾、岸本聡子、田中良弘、服部秀美、前原正明、フラグミン/プロタミンマイクロ粒子を用いた細胞キャリアによる脂肪組織由来間葉系幹細胞の凝集と血管新生促進効果、第 32 回日本バイオマテリアル学会、2010 年 11 月 29 日、グランドプリンスホテル広島（広島県）

⑩ 石原雅之、中村伸吾、岸本聡子、田中良弘、服部秀美、前原正明、フラグミン/プロタミン微粒子細胞キャリアによる脂肪組織由来間葉系幹細胞の凝集と血管新生効果、第 48 回日本人工臓器学会大会、2010 年 11 月 20 日、仙台国際センター（宮城県）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 秀美 (HATTORI HIDEMI)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・助教
研究者番号：850508549

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし