

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15654

研究課題名(和文) Lineage tracingによる脂肪移植片生着機構の解明

研究課題名(英文) Lineage tracing of adipose-derived stem/stromal cells in fat grafts.

研究代表者

宇田 宏一 (Uda, Hirokazu)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20337306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の系譜追跡という手法を用いて脂肪移植における脂肪幹細胞/間質細胞由来の細胞の挙動を追跡した。具体的には、Prx1発現細胞を赤色蛍光色素tdTomatoにてgenetic markingし、野生マウスの脂肪とともに混合移植して、移植後の脂肪組織内におけるtdTomato陽性細胞の形質・局在を観察した。その結果、移植脂肪内において脂肪幹細胞/間質細胞由来の一部は、脂肪細胞や血管内皮細胞に分化していることが示された。

研究成果の概要(英文)： We established Prx1Cre;Ai14 mice in which Prx1-expressing cells were genetically marked with tdTomato. Adipose-derived stem/stromal cells (ADSCs) from Prx1Cre;Ai14 mice expressed tdTomato. Using the transgenic mice, we transplanted fat grafts from wild mice to wild mice with tdTomato positive ADSCs, and analyzed the grafts with immunofluorescent imaging. In the transplanted grafts, tdTomato-positive cells partially expressed perilipin or CD31, suggesting ADSCs contributed to regeneration of adipocytes and endothelial cells.

研究分野：形成外科学

キーワード：脂肪移植

1. 研究開始当初の背景

脂肪移植は形成外科にとって古典的な手技であるが、近年乳房再建術の需要増大に伴い、改めて注目が高まっている。我々は乳房再建のみならず様々な先天性・後天性組織欠損に対して積極的に脂肪移植術を施行し、良好な結果を得るとともに、マウス・ラット・ヒトを対象とした基礎研究により、脂肪移植における移植片生着過程の一部を明らかにしてきた。

従来の多くの脂肪移植研究では、脂肪由来幹細胞/間質細胞は CD34、組織マクロファージは CD206 というように、主に表面マーカーをターゲットとした免疫染色やフローサイトメトリーによって解析が行われてきた。しかし、これらの方法では特定の細胞の局在や形質の変化を追跡することは不可能であるため、脂肪移植における移植片生着の機序、特にリモデリングによって新たに発生する脂肪細胞の由来については未解明のままであった。

2. 研究の目的

Cre-loxP システムを用いた細胞の系譜追跡 (Lineage tracing) という手法により特定系統の細胞を genetic にマーキングし、その局在と形質の変化を追跡することにより、脂肪移植生着のメカニズムを明らかにするため、本研究を立案した。

3. 研究の方法

(1) Prx1Cre; Ai14 マウスの作製

計画では脂肪前駆細胞のマーカーとして PDGFR に着目し、PDGFR 発現細胞の系譜追跡を行う予定であったが、その後脂肪前駆細胞のマーカーとして PDGFR の特異度が低く、Prx1 の方がより特異度の高いという報告が相次いだため、計画を変更して Prx1 発現細胞の系譜追跡を行うこととした。

まず、Prx1 のプロモーター制御下に Cre recombinase を発現する Prx1Cre マウスと、Cre recombinase 発現下に赤色蛍光色素 tdTomato を恒久的に発現する ROSA26-LSL-tdTomato マウスを交配することにより Prx1 発現細胞に由来する細胞が tdTomato を恒久的に発現する Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato マウスを作製した。各 transgene 発現の確認は、仔マウスの尾の先端を用いた genotyping により行った。

Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato マウスの鼠径部より脂肪組織を摘出し、抗 CD31 抗体、抗 CD34 抗体、抗 Perilipin による免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

(2) Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato マウス由来 Adipose-derived stem/stromal cells (ADSCs) の作製

Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato マウスの鼠径部より脂肪組織を摘出し、コラゲナーゼ処理・遠心分離をすることによって沈殿した細胞群を ADSCs として初代培養した。この Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato マウス由来の ADSCs に対して、CD34, CD31 による免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

(3) 脂肪と ADSCs の混合移植

Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato マウス由来の ADSCs を Wild マウスより採取した脂肪組織とともに Wild マウスの背部皮下に移植し、4 週間後に摘出した。摘出した脂肪組織に対して免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

(4) Prx1Cre;

ROSA26-LSL-tdTomato; Col1/EGFP マウスの作製・ADSCs 作製・脂肪移植実験

1 型コラーゲン産生細胞が緑色蛍光色素 EGFP を発現する Col1/EGFP マウスと ROSA26-LSL-tdTomato マウスを交配することにより、ROSA26-LSL-tdTomato; Col1/EGFP マウスを作製した。続いて Prx1Cre マウスと ROSA26-LSL-tdTomato; Col1/EGFP マウスを交配することにより、Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato; Col1/EGFP マウスを作製した。

(2) と同様に Prx1Cre;

ROSA26-LSL-tdTomato; Col1/EGFP マウス由来の ADSCs を初代培養し、それを用いて (4) と同様に脂肪移植実験を行った。

4. 研究成果

(1) Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato マウスの作製

Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato マウスを作製するにあたり、ROSA26-LSL-tdTomato マウスの繁殖に非常に難渋し、継続的な実験が可能となる Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato マウスを得るのに予想外の時間を要してしまった。Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato マウスの鼠径部脂肪組織において全ての Perilipin 陽性細胞は tdTomato 陽性であり、Prx1 発現細胞が脂肪前駆細胞であることが示された。また、tdTomato 陽性 CD34 陽性 CD31 陰性細胞は CD31 陽性の血管内皮細胞の近傍に存在しており、Prx1 発現細胞はいわゆる Pericyte であり、Prx1 発現細胞が ADSCs と同一の集団であることが示された。

(2) Prx1Cre; ROSA26-LSL-tdTomato マウス由来 ADSCs の作製

初代培養直後は tdTomato 陽性細胞と陰性細胞が混在しており、陰性細胞は CD31 陽性の血管内皮細胞であったが、継代を進めると CD31 陽性細胞は駆逐され、ほぼ全て tdTomato 陽性 CD34 陽性 CD31 陰性細胞の ADSCs のみとなった。

(3) 脂肪と ADSCs の混合移植

生着した脂肪組織内には tdTomato 陽性細胞が散見され、これらの一部は Perilipin 陽性もしくは CD31 陽性であった。

(4) Prx1Cre;

ROSA26-LSL-tdTomato; Col1/EGFP マウスの作製・ADSCs 作製・脂肪移植実験

ROSA26-LSL-tdTomato; Col1/EGFP マウスの作製にあたり、初めはヘテロ/ヘテロマウスを使用していたが、Prx1Cre マウスと交配した際に Prx1Cre;

ROSA26-LSL-tdTomato; Col1/EGFP マウスが産まれる確立が非常に低かった(確率的には 1/8 だが、実際はそれ以下であった)ため、まずは

ROSA26-LSL-tdTomato; Col1/EGFP マウスのホモ/ホモマウスを作製し、これを Prx1Cre マウスと交配することにより、1/2 の確率で Prx1Cre;

ROSA26-LSL-tdTomato; Col1/EGFP マウスを得ることができるようになった。

生着した脂肪組織内において線維化している部分は、ほぼ tdTomato 陰性 EGFP 陰性であった。

(5) 結論

脂肪移植の際における組織のリモデリングには ADSCs が関与していることが示された。また移植組織内の線維化には、ADSCs ではなく donor 由来の細胞が関与していることが明らかになった。

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0件)

1: Mashiko T, Wu SH, Kanayama K, Asahi R, Shirado T, Mori M, Sunaga A, Sarukawa S, Uda H, Yoshimura K. Biological properties and therapeutic value of cryopreserved fat tissue. Plast Reconstr Surg. 141: 104-115, 2018

2: Uda H, Kamochi H, Sarukawa S, Sunaga A,

Sugawara Y, Yoshimura K. Clinical and quantitative isokinetic comparison of abdominal morbidity and dynamics following DIEP versus muscle-sparing free TRAM flap breast reconstruction. Plast Reconstr Surg. 140: 1101-1109, 2017

3: Uda H, Yoshimura K, Asahi R, Sarukawa S, Sunaga A, Kamochi H, Sugawara Y. Vertically Set Sombrero-shaped Abdominal Flap for Asian Breast Reconstruction after Skin-sparing Mastectomy. Plast Reconstr Surg Glob Open. 4: e1123, 2016

[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

宇田 宏一 (HIROKAZU, uda)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 20337306

(2)研究分担者

須永 中 (ATARU, sunaga)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号： 00406117

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()