

平成 20 / 年 2 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19592069
研究課題名（和文） 脂肪細胞の血管新生機序と安全な移植技術への応用
研究課題名（英文） Mechanism of angiogenesis for adipocytes for the application to the stable transplantation technique
研究代表者
氏名（ローマ字）：カ久 直昭（RIKIHISA NAOAKI）
所属機関・部局・職：千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60436433

研究成果の概要：

本研究の目的は移植脂肪組織の生着率を向上させる安全な細胞外環境と血管新生誘導因子を明らかにすることである。研究成績から脂肪移植の生存率の向上に脂肪細胞の機能発現を制御することが関わること、そのために細胞外環境との密接なインターアクションが重要であり、MMP 発現を亢進する作用を有する活性物質の長期補充により移植脂肪の生着率を亢進することが可能であることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：移植、脂肪細胞、脂肪組織、血管新生、細胞外マトリクス、生存

1. 研究開始当初の背景

形成外科的欠損部位における組織修復の必須技法の一つに脂肪組織の自己移植がある。すなわち、欠損容積を補充する自己脂肪組織を摘出し、細切調整した後に欠損部位に移植することにより、長期間安定に病態を修

復し安全な再構築を促進することを目的とする。すでに臨床技術として有用かつ普及している技術であるにも関わらず、移植された脂肪組織の安定性は個々の病態や方法により一定ではなく、その原因として、採取脂肪組織の多様性、移植脂肪の調整技術への依存

性、移植組織の生着に関わる宿主側の環境要因等があげられる。これらの諸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、移植時におけるサイトカイン注入により生着効率が向上することが知られている。これまでに我々は、脂肪移植の生着に関わる影響因子を明らかにすることを目的に、モデル動物および細胞ならびに分子生物学的手法により脂肪細胞機能を評価することにより移植影響因子の解析を行い、一連の研究成果から、脂肪組織の移植後の生着には、脂肪細胞自体から分泌される VEGF が重要であり、その分泌は宿主要因、移植脂肪の摘出部位により影響されることが明らかになった。したがって、移植脂肪組織の生着率を向上させるためには、移植された脂肪細胞が VEGF 分泌能を維持する周辺環境を構築することが重要であると考えられる。このような研究基盤から、我々は、移植脂肪組織が安全に効率よく生着するには、細胞外マトリックスの存在下で VEGF をはじめとするサイトカインを適切に誘導しやすい細胞外環境を整備することが重要であるという考えに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪細胞が脂肪組織を構築するため調節機構をとりわけ VEGF などのサイトカイン産生から明らかにし、移植脂肪組織の生着率を向上させる安全な細胞外環境と血管新生誘導因子を明らかにすることである。

3. 研究の方法

bFGF (basic fibroblast growth factor) 作用における MMP の関与、MMP による VEGF 発現効果および低用量 GH のインスリン抵抗性に及ぼす作用についてモデル動物および培養細胞を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) bFGF による MMP を介した移植脂肪細胞の生着向上機序

多くの研究から血管新生因子 VEGF に加えて、bFGF が、移植脂肪の生着を向上させる作用のあることが知られている。しかしながら、移植脂肪における作用は明らかになっていない。したがって、bFGF の生着向上機序を明らかにして、VEGF による血管新生促進作用との関連また協調作用を明らかにすることは、脂肪細胞移植の生着率の向上に重要である。これまでに、bFGF がマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 遺伝子発現を亢進することが知られている。3T3-L1 脂肪細胞において、bFGF は MMP の中でも MMP2 遺伝子発現を著明に亢進した。MMP2 リコンビナント蛋白は、3T3-L1 細胞における脂肪蓄積、PPAR γ 発現、グルコースの取り込みを、bFGF と同程度に促進する作用を有していた。bFGF によるこれらの作用は MMP2 作用を抑制することにより著明に減弱した。脂肪細胞をマウス皮下に移植した生着率の検討により、bFGF は移植脂肪の外観、脂肪蓄積、脂肪蓄積関連遺伝子発現を向上するのに対して、MMP 抑制剤を添加するとこれらの作用が消失した。以上の成績から、bFGF の移植脂肪の生着率を向上する作用には MMP2 遺伝子発現誘導作用に関わることが示された。MMP による細胞外マトリックス分解作用、細胞外環境の最適化、また MMP によるさまざまな分子の活性化が脂肪細胞の生着に重要であると考えられる。

(2) MMP による脂肪細胞の VEGF 産生促進作用

脂肪細胞が内臓領域に蓄積する場合に、皮下領域とは異なった遺伝子発現がみられ、このことが、インスリン抵抗性等の病的機序に結びつく。3T3-L1 脂肪細胞をマウス内臓領域に移植するとさまざまな遺伝子が誘導され

るが、最も誘導される遺伝子の一つに MMP 3 が同定された。この MMP3 は脂肪組織に浸潤するマクロファージからも分泌され、このことが脂肪細胞の TNF- α 発現を介した病的脂肪細胞への変化を誘導する可能性がある。しかしながら、MMP3 がどのように移植脂肪細胞の生着や脂肪細胞の成熟化への機能発現に関わるのか不明であり、この機序解明が、移植脂肪細胞の生着の向上に重要である可能性がある。3T3-L1 脂肪細胞において、脂肪酸は VEGF 発現を誘導する。TLR2 欠損マウスで脂肪負荷により VEGF 発現が誘導されないことから、この誘導作用に TLR (Toll-like receptor) 2 遺伝子発現が介在すると考えられる。マクロファージ培養上清液は脂肪酸による VEGF 発現を誘導する。この作用は、MMP3 遺伝子や蛋白抑制により減弱する。同様に、MMP3 は脂肪酸による VEGF 発現を誘導し、この作用は TLR2 抑制により抑制される。これらの結果は、MMP3 が脂肪細胞の脂肪酸による VEGF 発現を増強し、この作用により、マクロファージが脂肪細胞の VEGF 発現を亢進させると考えられる。したがって、MMP3 は移植脂肪の血管新生を向上させるのに重要な VEGF 発現を亢進することで移植脂肪の生存を向上させることに寄与する可能性がある。

(3) ホルモン補充による脂肪細胞機能制御の可能性

脂肪細胞は蓄積するさまざまな環境に影響を与えると同時に、細胞外環境から細胞機能を修飾される。このことは移植脂肪細胞の機能が MMP により調節されること、その結果、VEGF や TNF- α 等のサイトカイン発現が変動することから明らかである。このような事実から、脂肪細胞の機能、とりわけインスリン抵抗性に結びつくサイトカイン発現を調節する因子の補充療法が病的脂肪細胞を改善する可能性がある。そこで、臨床的応用が可能

である低用量成長ホルモン (GH) によるインスリン抵抗性が以前作用における病的脂肪細胞の制御を検討した。インスリン抵抗性発現に、内臓脂肪における TLR2/TNF- α 発現細胞の出現が密接に関わる。低容量 GH 補充は、高脂肪摂取によるインスリン抵抗性、内臓脂肪における TLR2/TNF- α 発現細胞の出現を有意に抑制した。この作用は IGF 中和抗体処置でこの作用は抑制されるとともに脂肪蓄積量には明らかな影響を与えなかった。3T3-L1 脂肪細胞で、IGF-1 が特異的に GH による TLR2 または TNF- α 発現抑制作用を減弱することから、GH は IGF-1 産生を介して TLR2/TNF- α 発現細胞の出現を抑制すると考えられた。このことから、ホルモンや活性物質等の補充療法により脂肪細胞の機能調節が可能であることが明らかになり、上記の研究成績とあわせて、MMP 発現を亢進する作用を有する活性物質の長期補充により移植脂肪の生着率を亢進することが可能であると考えられる。

(4) 脂肪移植の生存率の向上における脂肪細胞の機能発現を制御の展望

本研究成果により、脂肪移植の生存率の向上に脂肪細胞の機能発現を制御することが関わること、そのために細胞外環境との密接なインターアクションが重要であることが明らかになった。そのために、血管新生作用に加えて MMP によるマトリックス制御が有用であり、臨床応用への発展を考えるにあたり活性物質の長期補充が脂肪細胞の機能を制御することが可能であることが明らかになった。今後、モデル動物を用いた移植脂肪組織の安全な細胞外環境と細胞外環境のさらなる検討が期待される。

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)

〔雑誌論文〕(計4件)

(1)Unoki H, Bujo H, Jiang M, Kawamura T, Murakami K, Saito Y. Macrophages regulate tumor necrosis factor-alpha expression in adipocytes through the secretion of matrix metalloproteinase-3. Int. J. Obes. 2008;32:902-911. (査読有)

(2)Kubota Y, Unoki H, Bujo H, Rikihisa N, Udagawa A, Yoshimoto S, Ichinose M, Saito Y. Low-dose GH supplementation reduces the TLR2 and TNF-alpha expressions in visceral fat. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008;368:81-87. (査読有)

(3)Kawamura T, Murakami K, Bujo H, Unoki H, Jiang M, Nakayama T, Saito Y. Matrix metalloproteinase-3 enhances the free fatty acids-induced VEGF expression in adipocytes through toll-like receptor 2. Exp. Biol. Med. (Maywood)2008;233:1213-1221. (査読有)

(4)Kuramochi D, Unoki H, Bujo H, Kubota Y, Jiang M, Rikihisa N, Udagawa A, Yoshimoto S, Ichinose M, Saito Y. Matrix metalloproteinase 2 improves the transplanted adipocyte survival in mice. Eur. J. Clin. Invest. 2008; 38:752-759. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

力久 直昭 (RIKIHISA NAOAKI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60436433

(2) 研究分担者

武城 英明 (BUJO HIDEAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：80291300

一瀬 正治 (ICHINOSE MASA HARU)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90082156

齋藤 康 (SAITO YASUSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50101358

卯木 浩之 (UNOKI HIROYUKI)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：40323290

(3) 連携研究者

無し