

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592070
 研究課題名（和文） ヒト脂肪由来幹細胞を用いた血管新生治療の開発
 研究課題名（英文） Establishment of angiogenic therapy with human adipose derived stem cells
 研究代表者
 権太 浩一 (GONDA KOICHI)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：20292914

研究成果の概要：まず、脂肪由来幹細胞を培養する際に血管内皮細胞増殖培地(EGM-2)を用いると、脂肪、軟骨、骨への多分化能を維持したまま、短期間により多くの細胞を培養することが可能であった。また、培養の際に線維芽細胞増殖因子(FGF-2)を添加すると、JNK と呼ばれるシグナル伝達経路を介して、増殖および肝細胞増殖因子(HGF)発現が著明に亢進することが判明した。そして、この FGF-2 による脂肪由来幹細胞の増殖促進および HGF 発現亢進は、創傷治癒過程における組織リモデリングや線維化抑制に大きく関与していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：脂肪由来幹細胞・血管新生・創傷治癒・細胞増殖因子・FGF-2・HGF・JNK

1. 研究開始当初の背景

血管新生の研究は、国内外の様々な研究施設で遺伝子レベルから臨床応用まで、幅広い研究が行われてきたが、未解決な点も多かった。特に、脂肪由来幹細胞と血管新生との関係はきわめて新しい研究分野であり、研究開始当初に海外の研究施設から、脂肪由来幹細胞が血管内皮細胞にも分化し、脂肪由来幹細胞は自らが血管内皮細胞増殖因子(VEGF)や HGF などの細胞増殖因子を分泌し、血管新生を促進することが示されていた。このように、脂肪由来幹細胞は軟部組織再生における

臨床応用にとどまらず、血管新生においても今後の発展が期待されていた。

2. 研究の目的

脂肪由来幹細胞と血管新生との関係、特に血管新生に関与する細胞増殖因子が脂肪由来幹細胞に及ぼす影響について新たな知見を得る。さらに、血管新生の観点から、実際の生体における脂肪由来幹細胞の役割を明らかにし、脂肪由来幹細胞を用いた新たな治療の開発につなげる。

3. 研究の方法

(1)細胞増殖因子が及ぼす影響

血管新生に関する細胞増殖因子 (VEGF, FGF-2, HGF, 血小板由来増殖因子(PDGF)) が脂肪由来幹細胞に及ぼす影響を調べるため、増殖実験、Real-time PCR による遺伝子発現解析、ELISA や Western blotting による蛋白発現解析を行う。さらに、影響がある因子については、関与するシグナル伝達系を同定するための阻害実験も行う。

(2)生体における脂肪由来幹細胞の役割

マウスを用いた脂肪組織傷害モデルを開発し、組織傷害時における脂肪由来幹細胞の挙動を免疫染色、flow cytometry などを使用して調べる。さらに、阻害実験などを行うことにより、細胞増殖因子が及ぼす影響についても明らかにする。

4. 研究成果

(1)培地の影響

脂肪由来幹細胞を培養する際に血管内皮細胞増殖培地(EGM-2)を用いると、通常の培地(DMEM)と比較して短期間により多くの細胞を培養することが可能であった(図1)。また、EGM-2を用いた場合でも、脂肪、軟骨、骨への多分化能は維持されていた。さらに、EGM-2に含まれる細胞増殖因子の中では、FGF-2が最も増殖促進効果が高かった。

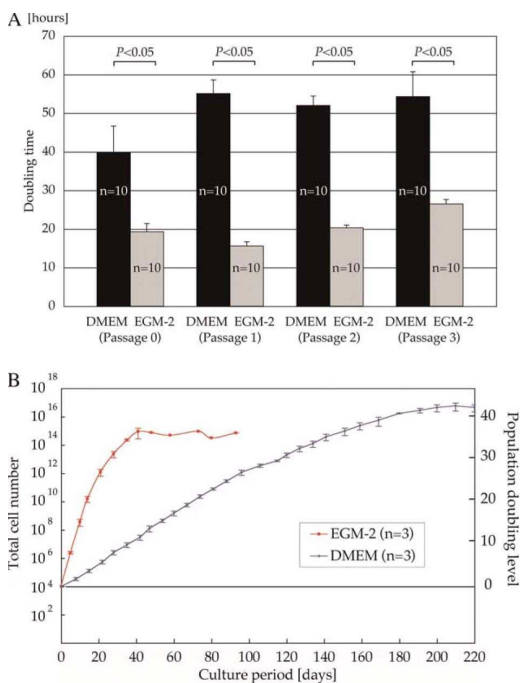


図1 : [Suga et al. Cytotherapy, 9: 738-745, 2007]より引用

(2)FGF-2が及ぼす影響

FGF-2は濃度依存性に脂肪由来幹細胞の増殖を促進した(図2)。

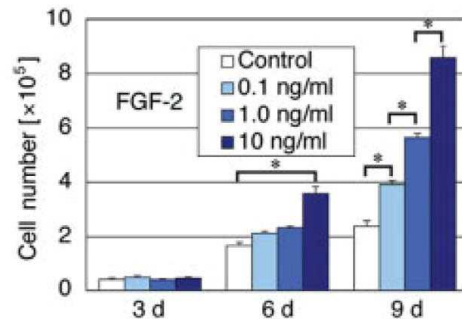


図2 : [Suga et al. Stem Cells, 27: 238-249, 2009]より引用

また、FGF-2を添加することにより、HGFの発現が著明に亢進することが判明した(図3)。さらに、シグナル伝達経路の阻害実験の結果から、FGF-2による増殖促進、HGF発現亢進には、ともにJNKと呼ばれるシグナル伝達経路が重要な働きをしていることが示された。

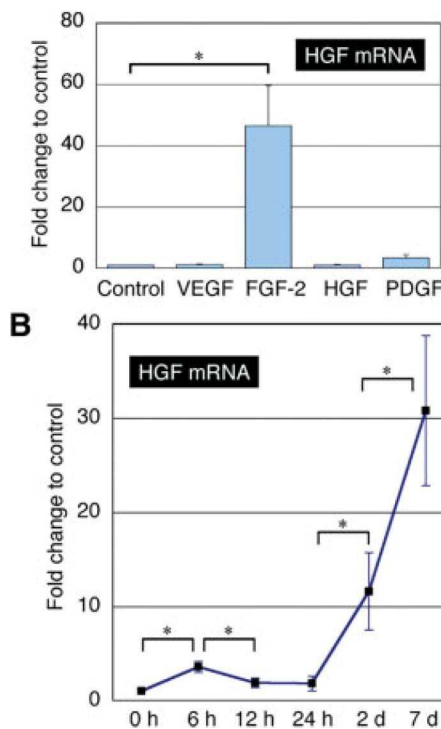


図3 : [Suga et al. Stem Cells, 27: 238-249, 2009]より引用

(3) 脂肪組織傷害モデルの開発

マウスの単径部組織を3時間虚血にした後、血流を再開させる、いわゆる阻血再還流傷害のモデルを確立した。この傷害モデルにおいては、傷害後3日目から7日目にかけて脂肪由来幹細胞 (CD34+/CD31-) が増加していた (図4)。

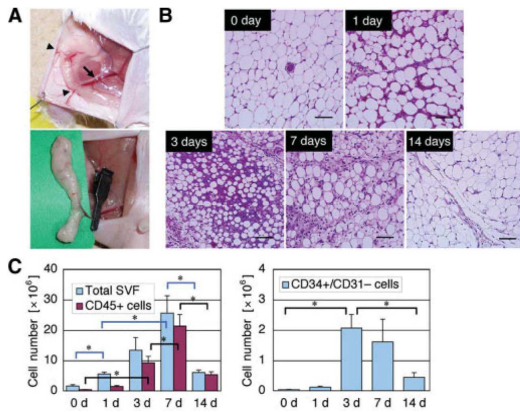


図4 : [Suga et al. Stem Cells, 27: 238-249, 2009] より引用

また、このモデルにおける細胞増殖因子の発現を調べた所、FGF-2 は傷害の早期から高い発現を示し、徐々にその発現が低下していくのに対し、HGF はそれより遅れる形で、ちょうど脂肪由来幹細胞が増加する時期に一致して発現が上昇していた (図5)。

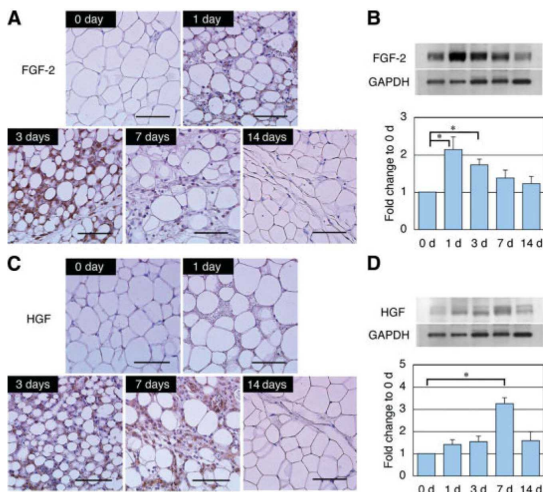


図5 : [Suga et al. Stem Cells, 27: 238-249, 2009] より引用

(4) 脂肪由来幹細胞の役割

上記の脂肪組織傷害モデルにおいて、FGF-2 中和抗体を用いて FGF-2 を、JNK 阻害剤を用いて JNK を阻害すると、増殖細胞の数が減少し、さらに、HGF の発現が抑制されることが判明した。また、このような阻害を行うと、創傷治癒過程での組織リモデリングが抑制され、治癒後の線維化が増すことも示された。このような線維化の増加は、HGF を中和抗体により直接阻害した場合でも同様に認められた (図6)。

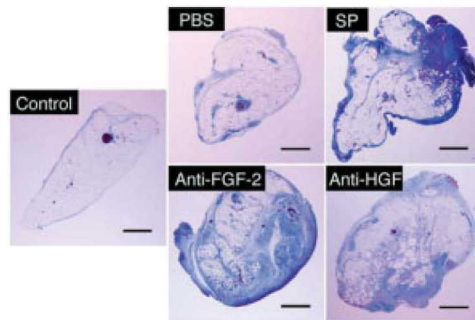
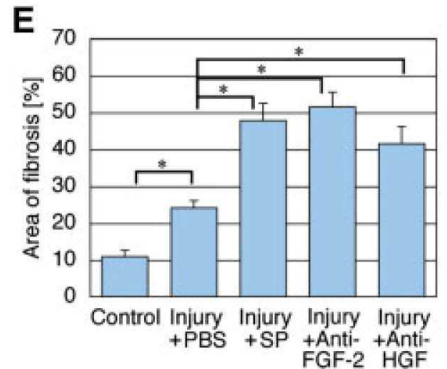


図6 : [Suga et al. Stem Cells, 27: 238-249, 2009] より引用

これらの結果から、脂肪由来幹細胞は FGF-2 の刺激に反応し、主に JNK を介して増殖および HGF 分泌を促進することにより、創傷治癒過程における組織リモデリングや線維化抑制において重要な役割を果たしていることが明らかにされた。今後は、血管新生治療のみならず、さまざまな線維性疾患の予防や治療目的でも脂肪由来幹細胞は期待でき、その際には、FGF-2 を併用することにより HGF を介した治療効果が高まることが期待される。

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2件)

Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, Nishimura S, Manabe I, Gonda K, Yoshimura K. IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. Stem Cells, 27: 238-249, 2009.

査読あり

Suga H, Shigeura T, Matsumoto D, Inoue K, Kato H, Aoi N, Murase S, Sato K, Gonda K, Koshima I, Yoshimura K. Rapid expansion of huma adipose-derived stromal cells preserving multipotency. Cytotherapy, 9: 738-745, 2007.

査読あり

[学会発表](計2件)

発表者：菅 浩隆

発表表題：脂肪由来幹細胞による血管新生誘導因子の分泌：低酸素ほかの環境因子による影響

学会名：第16回日本形成外科学会基礎学術集会

発表年月日：2007年10月11日

発表場所：神戸

発表者：菅 浩隆

発表表題：創傷治癒におけるHGFの作用と発現調整メカニズムの解明

学会名：第17回日本形成外科学会基礎学術集会

発表年月日：2008年10月2日

発表場所：東京

[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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

権太 浩一 (GONDA KOICHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20292914

(2)研究分担者

吉村 浩太郎 (YOSHIMURA KOTARO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60210762

(3)連携研究者

なし