

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18441

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞の生体内系譜追跡を用いた皮膚放射線障害の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapies for cutaneous radiation injury using in vivo lineage tracing of adipose-derived stem cells

研究代表者

森下 悠也 (Morishita, Yuya)

自治医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：60860872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Prx1CreマウスとAi14マウス、Col1/EGFP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を恒久的に発現し、なおかつI型コラーゲン発現細胞がEGFPを発現する遺伝子改変マウス(PAGマウス)を作製した。PAGマウスの鼠径脂肪より脂肪由来幹細胞(tdT-ADSCs)を抽出・培養し、Wildマウスの背部に作成した皮膚放射線障害部に注入移植した。移植後の組織を蛍光免疫染色にて観察したところ、皮下にtdTomato陽性GFP陽性の細胞を認め、移植したtdTomato陽性ADSCsが放射線障害の修復過程におけるコラーゲン生成に寄与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、脂肪由来幹細胞を用いた皮膚放射線障害に対する再生治療を開発することであった。マウスの疾患モデルに対して移植した脂肪由来幹細胞の生体内における局在・形質変化を系譜追跡という手法を用いて追跡することにより、従来の手法では不可能であった脂肪由来幹細胞の生体内における挙動の一端が解明され、臨床応用の足がかりが出来た。

研究成果の概要(英文)：By mating Prx1Cre mice with Ai14 mice and Col1 / EGFP mice, genetically modified mice (PAG mice) in which cells derived from Prx1-expressing cells permanently express tdTomato and type I collagen-expressing cells express EGFP. Was produced. Fat-derived stem cells (tdT-ADSCs) were extracted and cultured from the inguinal fat of PAG mice, and injected and transplanted into the skin radiation-damaged area created on the back of Wild mice. When the tissue after transplantation was observed by fluorescent immunostaining, tdTomato-positive GFP-positive cells were observed under the skin, indicating that the transplanted tdTomato-positive ADSCs contributed to collagen production in the process of repairing radiation injury.

研究分野：形成外科学

キーワード：放射線潰瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪由来幹細胞は、採取が容易な再生医療のソースとして注目されており、国内外で多くの研究が行われている。しかし、脂肪由来幹細胞の生体内での挙動、すなわち移植した脂肪由来幹細胞は幹細胞性 (stemness) を維持したまま生着するのか、分化することにより組織の再生に関与しているのか、成長因子を放出しながら消失するのかなどについてはまだ不明な点が多く、そのことが治療の開発・最適化や発展的応用の妨げとなっている。また、そもそも組織に局在する脂肪由来幹細胞がどの程度恒常性の維持や創傷治癒に寄与しているのかすら明らかではない。

生体内での脂肪由来幹細胞を追跡するのが難しい理由としては、表面抗原以外に脂肪由来幹細胞を特徴付けるマーカーが乏しいことや、細胞が分化すると表面抗原の発現が変化してしまうことが挙げられる。そのため、表面抗原を対象としたフローサイトメトリーや免疫染色では、生体内における細胞の局在・形質変化を同時に追跡することは不可能である。

近年、マウス鼠径部の皮下脂肪組織内において、Prx1 遺伝子を発現している細胞群が CD34(+), CD31(-), CD45(-), CD29(+), Sca-1(+) であり、従来マウスの脂肪由来幹細胞とされている細胞群とプロファイルが一致していることが報告された。我々はその事実に着目し、Prx1 発現細胞を蛍光色素により genetic に marking する系譜追跡という手法 (次頁図参照) を用いて移植後の脂肪由来幹細胞の挙動 (局在・形質変化) を明らかにし、その結果に基づいて移植方法の開発・評価・最適化を行うために本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪由来幹細胞の生体内における挙動について遺伝子改変マウスを用いて詳細に解析することにより、脂肪由来幹細胞を用いた皮膚放射線障害に対する再生治療を開発することである。具体的には、マウスの疾患モデルに対して移植した脂肪由来幹細胞の生体内における局在・形質変化を系譜追跡という手法を用いて追跡・解析することにより、皮膚放射線障害モデルに対する移植治療の開発・評価・最適化を行う。本研究により、従来の手法では不可能であった脂肪由来幹細胞の生体内における挙動が解明され、皮膚放射線障害に対する新規治療法開発への道が開ける。

3. 研究の方法

まず、Prx1プロモータ制御下にCreを発現するPrx1Creマウス、Cre発現後にtdTomatoを永続的に発現するAi14マウス、 α 1型コラーゲン発現細胞がEGFPを発現するCol1-EGFPマウスをそれぞれ交配することによって、Prx1発現細胞がtdTomatoによってgenetic markingされることによりPrx1の発現が消失 (= ASCsが分化) した後も光り続け、さらに α 1型コラーゲン発現細胞がEGFPを発現する、Prx1Cre;Ai14;COL/EGFPマウス (以下PAGマウス) を作成した。PAGマウスの鼠径部皮下脂肪より、脂肪由来幹細胞 (以下tdT-ADSCs) を抽出・培養した。

続いて、wildマウスの背部に40Gy/20daysにて放射線を照射することにより、ASCs移植の対象となる皮膚放射線障害モデルを作成した。放射線障害部の皮下にtdT-ADSCsの懸濁液を注入移植し、移植後の組織を1,4,8週間後に蛍光免疫染色にて観察した。

4 . 研究成果

放射線障害部の皮下にtdTomato陽性GFP陽性の細胞を認め、移植したtdT-ADSCsが放射線障害の修復過程におけるコラーゲン生成に寄与していることが示された。コロナ禍による研究制限により、一時的に遺伝子改変マウスの繁殖を、維持のみを目的とする匹数まで減らしたため、詳細な解析や移植方法の最適化までではできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------