

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21791760

研究課題名(和文) 幹細胞を用いた脂肪組織再生と血管新生における分子機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism identification of fat graft regeneration and angiogenesis with adipose-derived stem cells.

研究代表者

覚道 奈津子(KAKUDO, Natsuko)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：00509490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究で、我々は、脂肪幹細胞を用いた組織再生と幹細胞生着においては血管新生能が重要な役割を果たすこと、とくに脂肪幹細胞が血管新生作用を有する増殖因子であるVEGF、FGF-2、HGFなどの増殖因子を多く産生すること、そして低酸素条件下においてHIF-1の発現を介し、それらの産生が促進されることを明らかにした。組織生着や組織再建には局所の血流や血管新生が重要な役割を果たすため、脂肪幹細胞を用いた組織再建における幹細胞の担う重要な役割が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have demonstrated that angiogenic potential plays an important role in tissue regeneration and stem cell engraftment and that adipose-derived stem cells, in particular, has a property to produce many growth factors with angiogenic action, such as vascular endothelial growth factor, Fibroblast growth factor-2, and hepatocyte growth factor, which is enhanced via Hypoxia inducible factor-alpha expression under hypoxia conditions. As local blood flow and angiogenesis plays a crucial role for tissue engraftment and regeneration, it has been clarified that stem cell plays a key role in tissue regeneration using adipose-derived stem cell.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：幹細胞 脂肪 血管新生

1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪組織由来幹細胞(adipose-derived stem cells; ASCs)が発見され、骨髄間葉系幹細胞と同様の多分化能をもつと報告されている。脂肪組織は、形成外科的手術の際の余剰組織として採取することは容易であり、局所麻酔下で採取可能である。また骨髄に比較して採取後の疼痛も非常に少なく、採取後のドナーサイトの変形・欠損は非常に少ない。これらの理由から、脂肪組織は再生医療において、幹細胞の供給源として期待されている。ASCs は、美容外科手術のひとつである脂肪吸引手術より得られた液状脂肪(lipoaspirates)より 2001 年に初めて精製された。我々は、液状脂肪ではなく、切除したブロック状の皮下脂肪組織よりヒト ASCs(hASCs)を調製し、既存の報告と同様に、それぞれの分化誘導培地で培養された hASCs は、脂肪・骨・軟骨すべての成熟細胞へ分化可能であることが各種特殊染色により証明した。

ヒト脂肪組織には豊富な血管が存在し、脂肪細胞が層をなした小葉構造を多数の微小血管が包む形をとり組織構造が区分されている。脂肪組織自体は阻血に弱い組織であることが臨床的に明らかになってきている。これまでに脂肪組織形成と生着には脂肪幹細胞の存在と血管新生因子の関連性が重要であると考えられているが、それらの詳細については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト脂肪組織由来幹細胞(hASCs)を用いて、それらの in vitro および in vivo の血管新生に及ぼす影響を明らか

にする。In vitro においては、通常酸素または低酸素状態の hASCs が産生する血管新生因子(VEGF, FGF-2)の量と発現を定量する。また、低酸素状態の hASCs における HIF-1 の発現を検討する。In vivo においては、遊離脂肪移植に hASCs を付加してヌードマウス皮下に埋入し、5 ヶ月後に摘出し、移植脂肪体積と血管新生量を組織学的に探索する。

3. 研究の方法

手術の余剰組織から無菌的に得られた 1g 前後のヒト脂肪組織を採取後、PBS (phosphate buffered saline)で十分に洗浄し、血管、結合組織等を除去後、組織を細分化し、コラゲナーゼタイプ (Sigma, ST Louis) にて 40 分 40 にて震盪させ、組織を消化する。消化終了後、基礎培地を加えて 1,600rpm 3 分にて遠心処理を行い、下部に沈殿した細胞ペレット (cell pellet)を新しい基礎培地の入った遠心管に移して攪拌し、洗浄する。この作業を 3 回繰り返し、十分にコラゲナーゼを洗浄する。最後に細胞成分を 100 μ m のメッシュでろ過したのち、基礎培地、すなわちダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) に 10%濃度の胎仔牛血清 (fetal bovine serum: FBS), 100U/ml Penicillin G, 100 μ g/ml Streptomycin を添加したものに 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂の条件下で 3 継代培養したものを以下の実験に用いる。なお、この方法で得た hASCs は、骨・軟骨・脂肪へ分化する、多分化能を有することが明らかになっている。通常酸素または低酸素状態の hASCs が産生する血管新生因子(VEGF, FGF-2)の量を経時的に ELISA にて定量する。血管新生因子

の mRNA の発現を Real time-RT-PCR にて測定した。In vivo においては、遊離脂肪移植に hASCs を付加してヌードマウス皮下に埋入し、5 ヶ月後に摘出し、移植脂肪体積と血管新生量を組織学的に探索し、コントロール群(遊離脂肪のみ)と比較した。

4 . 研究成果

通常酸素または低酸素状態の hASCs が産生する血管新生因子(VEGF, FGF-2)の量は両者とも経時的に増加したが、その量は低酸素群の方が通常培養群に比較して有意に多かった。血管新生因子の mRNA 発現量も同様に、低酸素群の発現が通常酸素群に比較して有意に促進していた。低酸素 6 時間後において、HIF-1 の発現を確認した。

ヌードマウス埋入実験においては、hASCs 付加式脂肪移植群の方が、コントロール群に比較し移植脂肪体積も有意に多く、血管新生数も有意に多い結果となった。

このことより、hASCs は血管新生因子を産生し、その産生量は低酸素状態において促進されることが明らかになり、hASCs 付加式遊離脂肪移植での組織生着と血管新生における ASCs の果たす役割の一つが明らかになった。

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 4 件)

Kakudo N, Tanaka Y, Morimoto N, Ogawa T, Kushida S, Hara T, Kusumoto K. Adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat

grafting: optimal cell concentration and effects on grafted fat characteristics. J Transl Med, 11(1):Article No.254, 2013.10 (査読有)
DOI: 10.1186/1479-5876-11-254

Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Ogura T, Notodihardjo PV, Hara T, Kusumoto K. Effects of transforming growth factor-beta1 on cell motility, collagen gel contraction, myofibroblastic differentiation, and extracellular matrix expression of human adipose-derived stem cell. Hum Cell, 25(4):87-95, 2012.12

Doi: 10.1007/s13577-012-0049-0

Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Matsumoto N, Kusumoto K. The effect of C3 transferase on human adipose-derived stem cells. Hum Cell, 24(4):165-169, 2011.12

DOI: 10.1007/s13577-011-0033-0

覚道奈津子, 榎田哲史, 鈴木健司, 楠本健司, ラット脂肪組織由来幹細胞の脂肪・骨への分化、洛和会病院医学雑誌, 22:61-64, 2011.3 (査読無)

〔学会発表〕(計 7 件)

覚道奈津子, 森本尚樹, 原 朋也, 小倉常敬, 楠本健司: 低酸素培養における脂肪組織由来幹細胞の増殖効果、第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2013.11, 新潟市, (一般)

覚道奈津子, 田中義人, 森本尚樹, 榎田哲史, 原 朋也, 楠本健司: ヒト脂肪組織由来間葉系前駆細胞 (ADRCs) を用いた

脂肪移植：移植脂肪の性状に与える至適細胞配合量の影響第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2013.11, 新潟市, (一般)

覚道奈津子, 櫛田哲史, 鈴木健司, 楠本健司：脂肪組織由来幹細胞の特性と臨床応用へ向けた取り組み, 第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2011.10, 東京, (シンポジウム・ワークショップ・パネルディスカッションなど)

覚道奈津子, 櫛田哲史, 小倉常敬, PRISCILLA VALENTIN, 鈴木健司, 楠本健司：TGF- β がヒト脂肪組織由来幹細胞の増殖、遊走、収縮に与える影響、第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2011.10, 東京, (一般)

覚道奈津子, 櫛田哲史, 楠本健司：ヒト脂肪組織由来幹細胞の特性と再生医療における可能性, 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会, 2011.6, 京都市, (一般)

覚道奈津子, 楠本健司：ヒト脂肪組織由来幹細胞と増殖因子を用いた組織再生と展望, 第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2009.10, 東京, (シンポジウム・ワークショップ・パネルディスカッションなど)

覚道奈津子, 櫛田哲史, 楠本健司：線維芽細胞・脂肪組織由来幹細胞に対する多血小板血漿および線維芽細胞増殖因子による増殖効果, 第 41 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2009.9, 神戸市, (シンポジウム・ワークショップ・パネルディスカッションなど)

Kakudo N, Kushida S, Ogura T, Suzuki K, Kusumoto K (Takeshi Ishikawa and Masayoshi Yamamoto ed.), Adipose-Derived Stem Cells and their Application in Tissue Engineering. Tissue Engineering: Fundamentals, Techniques and Applications, Nova Science Publishers, 5,89-96, 2012.10 (部分執筆, 共著)

Natsuko Kakudo, Satoshi Kushida, Kenji Kusumoto (M.A. Hayat ed.) Adipose-derived Stem Cells and Platelet-Rich Plasma: Implications for Regenerative Medicine. Stem Cells and Cancer Stem Cells Vol.2: Therapeutic Applications in Disease and Injury, Springer, 315-322, 2011.10 (部分執筆, 共著)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

なし

取得状況 (計 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

覚道 奈津子 (KAKUDO, Natsuko)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：00509490

〔図書〕(計 2 件)

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

研究協力者

尾川 武史 (OGAWA, Takeshi)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80739206