

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390398

研究課題名(和文) 組織修復における骨髄由来前駆細胞の機能の解明と再生医療への応用

研究課題名(英文) Functional roles and potential clinical application of bone marrow-derived stem cells in tissue repair

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織の修復モデルにおける骨髄由来細胞の関与について、GFPマウスと対照マウスとの脂肪交換移植、ならびに、GFP骨髄を移植した放射線照射マウスと対照マウスとの間の脂肪移植を用いて、調べた。再生した脂肪細胞のほとんどは移植体由来であったが、再生した血管内皮細胞の約半数は骨髄由来であった。さらに少数の血管壁細胞、約3分の1の脂肪幹細胞は骨髄由来細胞によって構成されていた。これらのことは、骨髄由来細胞が血管再生とくに毛細血管の再構築においては非常に重要な役割を果たしていることを示し、さらに、修復後組織の組織幹細胞も供給していることを示している。

研究成果の概要(英文)：Inguinal fat pads of GFP mice and wild-type mice were cross-transplanted beneath the scalp. At 1, 2, 4, and 12 weeks post-transplantation, grafted fat was evaluated. Bone marrow of GFP mice was transplanted to wild-type mice(after irradiation) and were analyzed as well. The majority of host-derived cells detected during remodeling of grafted fat were macrophages. At 12 weeks, mature adipocytes largely were derived from adipose stem/stromal cells (ASCs) of grafts. Although vascular wall graft, vascular endothelial cells originated equally from graft and host bone marrow. ASCs of regenerated fat were an admixture of grafted, host non-bone marrow, and host bone marrow cells. Above findings underscore the importance of ASCs in the grafted fat for adipocyte regeneration. Host bone marrow and local tissues contributed substantially to capillary networks and provided new ASCs.

研究分野：形成外科

キーワード：骨髄由来幹細胞 脂肪幹細胞 血管内皮前駆細胞 ファイブロサイト 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

生理的な細胞死においても、突発的な細胞死においても、組織に存在する幹細胞が活性化され、死細胞を新生細胞で置換することが明らかにされている。しかし、組織にある一定以上の傷害が起こると、骨髄からの炎症細胞が浸潤し、炎症とともに創傷治癒が起こる。創傷治癒において骨髄由来細胞の関与があることは分かっているが、その関与する細胞種、それぞれの機能、どういう仲介物質を通して骨髄に伝達されるのか、どのようなメカニズムでそれらの細胞は傷害部位に集積するのか、など、そのメカニズムは未解明のことが多い。こうしたメカニズムを明らかにすれば、いかにして骨髄由来細胞を活性化し、循環に動員し、そして目的の臓器に呼び込み、さらに、それら集積した幹細胞に標的臓器で目的に応じた仕事をさせる、という新世代の幹細胞操縦療法(Hit&Catch therapy)が確立できることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、皮膚、皮下組織などの生理的(ターンオーバー)もしくは事後的組織修復において、骨髄由来幹(前駆)細胞がどのように関与し、機能するのか、その幹細胞の活性化と動員はどのようなメカニズムによって行われるのか、を明らかにすることを第一の目的としている。またその知見に基づき、骨髄由来幹細胞を遠隔操縦する方法を確立し、血管新生、創傷治癒、組織再生などの治療目的に利用する再生誘導療法(幹細胞遠隔操縦療法)を開発することを第二の目的とする。

3. 研究の方法

組織修復における骨髄由来幹細胞の役割とメカニズムの解明とその結果に基づく新治療の開発には下記の5つのステップを行う予定である。

(1)GFP 骨髄移植モデルを使った組織修復モデルの解析

GFP マウスから骨髄細胞を放射線照射マウスに移植すると、骨髄細胞はGFP 蛍光を発して同定できるようになる。この動物を使って、さまざまな組織傷害・修復モデルを作成し、その創傷治癒過程における骨髄由来細胞の関与を詳細に分析する。この部分が本研究の50%エフォートを占めることが予想される。

(2)組織傷害後の末梢血内仲介物質の分析

組織傷害モデルにおいて、傷害後、経時的に末梢血を分析し、仲介因子候補の血中内動態を調べる。

(3)仲介物質による循環内被動員細胞の分析

各仲介候補物質を実験的に静注し、その後の末梢血内の有核細胞を調べて、どのような骨髄由来幹細胞が動員されたかを調べる。それらがどういう受容体を発現しているかも調べる。

(4)リガンド局注による骨髄由来幹細胞の集積効率の分析

によって動員された骨髄由来幹細胞の受容体に対するリガンドを仮想標的臓器に局注して、その集積効率を検証する。

(5)疾患動物モデルにおける、骨髄由来幹細胞遠隔操縦療法(Hit & Catch)の有効性の検証

さまざまな疾患動物モデルにおいて、本研究結果に基づく骨髄由来幹細胞遠隔操縦療法(Hit & Catch)の有効性を検証し、臨床応用の妥当性があれば、臨床研究のデザインを作成する。

4. 研究成果

(1)脂肪移植に関わる幹細胞の構成と機能に関する研究成果

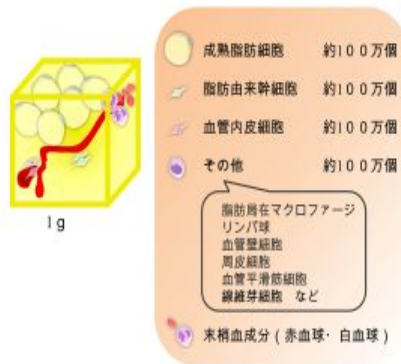
組織幹細胞と脂肪組織構成細胞

幹細胞とは多分化能と自己複製能を併せ持つ細胞と定義されているが、分化能などによってさまざまに分類されている。脂肪組織にも幹細胞は存在し、最も良く研究されているのは脂肪由来幹細胞(ASC: adipose-derived stem/progenitor cells)である。受精卵から作られる幹細胞のES細胞とは区別され、組織から採取できる幹細胞は組織幹細胞(成体幹細胞、体性幹細胞)と呼ばれる。脂肪由来幹細胞も組織幹細胞の一種であり、実験的には、脂肪・骨・軟骨・平滑筋・心筋といった間葉系や、神経(外胚葉)・肝臓(内胚葉)などと胚葉を超えて分化できることが知られている。脂肪由来幹細胞と呼ばれている細胞は様々な性質もっているが、異なる細胞の集まりであり、均一な同じ性質の細胞というよりも不均一な複数の細胞集団である。

本研究により、脂肪組織内の細胞成分を明らかにした。脂肪組織の体積の90%以上は成熟脂肪細胞で構成されているが、細胞数では約25%に過ぎない。我々の概算によると、1gの脂肪に含まれる成熟脂肪細胞は約100万個、脂肪由来幹細胞が約100万個、血管内皮細胞が約100万個、その他の細胞(脂肪局在マクロファージ、リンパ球、血管壁細胞、周皮細胞・血管平滑筋細胞、線維芽細胞など)が約100万個である。脂肪由来幹細胞を含む脂肪由来間質細胞の割合は約20%であるが、その比率は他の組織に比べて高い(骨髄に含まれる幹細胞は約0.001~0.01%)。また、脂肪組織は脂肪吸引術によって比較的容易に多量採取できるため、骨髄に代わる組織幹細胞源として注目されている

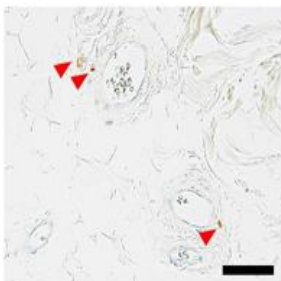
(図1)。

図1 脂肪組織の構成



肥満に伴う成長、過形成、創傷治癒、虚血、外圧による組織増大といった脂肪組織再構築の際に、脂肪由来幹細胞は重要な役割を果たす。脂肪由来幹細胞は、成熟脂肪や血管内皮に分化するだけでなく、様々な血管増殖因子を放出するのだ。脂肪組織が再構築される際には毛細血管の再構築も必ず伴うが、脂肪由来幹細胞が直接的にも間接的にも関与している。

組織幹細胞の新しい分類としての Muse 細胞
 脂肪組織内に存在する脂肪間質細胞は脂肪由来幹細胞を含む不均一な細胞集団である。出澤らは、間質細胞に含まれる、高度の多分化能を持つ真の幹細胞の概念として Muse (Multilineage-differentiating Stress Enduring) 細胞を 2010 年発表した。Muse 細胞は胚葉をまたぐ多分化能を持ち、ごく少量ながら皮膚や骨髄などに含まれていた。Muse 細胞からは遺伝子導入により iPS 細胞が作成できるのに対し、非 Muse 細胞からは iPS 細胞を作ることはできなかった。我々は免疫組織染色により Muse 細胞のマーカーである SSEA-3 をヒト脂肪組織において観察した。脂肪由来幹細胞の実体は、脂肪由来間質細胞に含まれている Muse 細胞であることが示唆された。

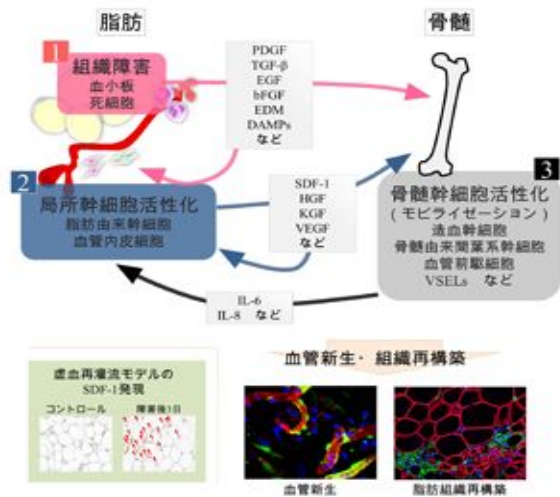


3. 骨髄由来幹細胞

骨髄には、造血幹細胞、骨髄由来幹細胞(間葉系幹細胞)、血管前駆細胞、VSELs(Very small embryonic-like cells)などの幹細胞が含ま

れる(図2)。

図2 骨髄由来細胞のモビライゼーション



脂肪移植などの組織障害時には、創傷部より放出されたサイトカインや増殖因子のシグナルが骨髄へ伝わり、骨髄から幹細胞が末梢血から障害組織にたどり着き(ホーミング)、組織再生に関わることがわかった。

上述の造血幹細胞、骨髄由来幹細胞、血管前駆細胞、VSELs は SDF-1(Stromal cell derived factor-1)の細胞膜受容体である CXCR-4 を有する。これらの幹細胞は組織傷害時に骨髄から末梢血に動員された後、虚血状態の血管内皮細胞や活性化血小板が放出する SDF-1 に捕捉されることで、傷害部位にホーミングすると考えられる。モビライゼーションを誘導する薬剤として AMD3100(CXCR4 アンタゴニスト)や顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte colony stimulating factor; G-CSF)などが、白血病の治療の際に末梢血から幹細胞を回収するために臨床応用されている。今後脂肪移植の領域でもモビライゼーションやホーミングに着目した薬物投与が検討される可能性がある。

(2)移植脂肪の生着過程に関する研究成果

短期

遊離脂肪移植では血行が再開するまでの初期、栄養や酸素は周囲組織からの拡散によって供給される。そのため 3 日以上にわたり虚血に陥った中心部の組織は壊死してしまう。移植組織床の健全性、組織の大きさが重要である。

A. 増殖因子

移植床の出血により血小板が活性化され、PDGF、EGF、TGF-βなどが放出される。移植し

た脂肪組織への傷害(成熟脂肪や血管内皮細胞の死、細胞外基質の傷害など)に伴い、bFGF、TNF-、TGF-、DAMPs(傷害関連分子パターン: Damage associated molecular pattern molecules)、プロテアーゼなどが放出される。これらがSDF-1、HGF、VEGF等の分泌を促し、骨髓・脂肪組織に存在する幹細胞や前駆細胞に働きかけることで、モビライゼーションやホーミング、分化誘導に関わっていることが示唆された。(図上記)

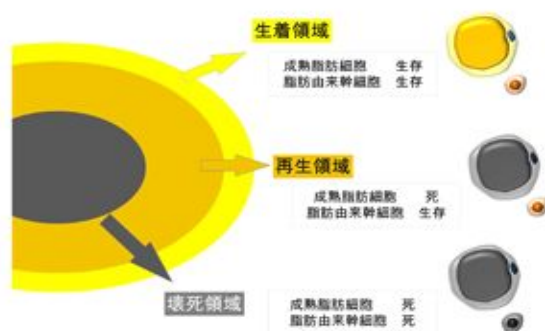
B. 細胞レベル

虚血が続けば細胞が死に至るが、細胞の種類により虚血への耐性が異なる。成熟脂肪細胞は最も虚血に弱く、3時間の一過性虚血であってもリモデリング(アポトーシスに続く、次世代細胞への置換)が誘導される。完全虚血を疑似した実験では、成熟脂肪細胞は1日間、血管内皮細胞は2日間、脂肪由来幹細胞は3日間の虚血で、細胞死に陥ることがわかった。

C. 組織レベル

移植脂肪の生着過程は表層からの距離によって3種類に分類されることがわかった。

図3 移植脂肪組織生着の3領域



1)生着領域、2)再生領域、3)壊死領域である。1)生着領域は移植脂肪組織の表層より100~300μmの範囲で、成熟脂肪細胞を含めて多くの細胞が生存したままである。組織形態変化は少ないが、移植後5~7日後より間質細胞の活発な分裂が認められ、これらはおそらく再生領域でのリモデリングに関与する。2)再生領域は生着領域の下で、600~1200μm程度の幅を占める。成熟脂肪細胞は移植後1~2日で細胞死するものの、生存した脂肪由来幹細胞により成熟脂肪細胞が再構成される。3)壊死領域では成熟脂肪細胞・脂肪由来幹細胞ともに細胞死に陥るため、組織再生は起こらない。すなわち、移植脂肪は少なくとも直径3mm以下で移植される事が望ましい。

長期

再生領域、壊死領域では成熟脂肪細胞は移植後1~2日で細胞死に至るが、その体積は直ちに減るわけではない。細胞死した脂肪細胞である油滴がすぐには吸収されずに体積を維持するためである。その後、油滴の吸収が進むとともに、新生脂肪細胞が出現、成長してくる。脂肪新生はとくに移植後約2ヶ月間観察される。その期間を過ぎても残っている大きな油滴は、炎症性マクロファージに包囲されて数か月をかけて徐々に吸収されていくが、大きいものは線維化を残したり、嚢胞壁が形成されオイル嚢胞となる。嚢胞が形成されると、それ以降は大きさは変わらず、炎症が慢性化し次第に石灰化すると考えられる。

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 3 件)

- 1) Doi K, Ogata F, Eto H, Kato H, Kuno S, Kinoshita K, Kanayama K, Feng J, Manabe I, Yoshimura K. Differential contributions of graft- and host-derived cells in tissue regeneration/remodeling after fat grafting. **Plast Reconstr Surg**, in press.
- 2) Kato H, Araki J, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, Mineda K, Kanayama K, Yoshimura K. Normobaric hyperoxygenation enhances initial survival, regeneration, and final retention in fat grafting. **Plast Reconstr Surg** 134: 951-959, 2014.
- 3) Kato H, Mineda K, Eto H, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, Kanayama K, Yoshimura K. Degeneration, regeneration, and cicatrization after fat grafting: Dynamic total tissue remodeling during the first three months. **Plast Reconstr Surg** 133: 303e-313e, 2014.

(学会発表)(計 件)

(図書)(計 件)

(産業財産権)
出願状況(計 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 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
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

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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし