

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791913

研究課題名(和文) 発生学的由来による脂肪組織幹細胞の多様性の解明とそれに基づく再生医療応用の探索

研究課題名(英文) Elucidation of peripheral nerve regeneration-promoting mechanism and in vivo kinetics of transplanted adipose-derived stem cells for medical applications

研究代表者

素輪 善弘 (sowa, yoshihiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80468264

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)：本研究の目的は、由来の異なるそれぞれの細胞がどのように脂肪由来幹細胞に寄与しているかを解明することである。われわれはP0 or Wnt1-Cre/ Floxed-リポーターマウスを用いてADSCsの中で神経堤由来細胞をマーキングしたところ、ADSCsの一部が神経堤細胞で構成されていることを明らかにした。これらの細胞集団は脂肪前駆細胞マーカーを発現し、高い脂肪分化能を有していた。また生体脂肪組織の一部が神経堤由来であり、脂肪組織内の血管に沿って位置していた。脂肪由来幹細胞には非神経堤細胞集団とは細胞特性や機能性の異なる細胞集団が含まれ、かつ脂肪前駆細胞と大きく相関することが示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed at investigating how and to what extent the neural crest contributes to ASCs using Cre-loxP-mediated fate mapping. ASCs harvested from subcutaneous fat depots of either adult P0-Cre/ or Wnt1-Cre/ Floxed-reporter mice contained a few neural crest-derived ASCs (NCDASCs). This subpopulation of cells exhibited a unique bipolar or multipolar morphology with higher expression of neural crest and preadipocyte markers and differentiate into adipocytes with high efficiency, indicating their commitment to adipogenesis. In vivo, a very small proportion of adipocytes were originated from the neural crest. These results demonstrate that ASCs contains neural crest-derived adipogenic progenitors whose phenotype is distinct from that of non-neural crest derivatives.

研究分野：形成外科

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 再生医療 体性幹細胞 神経堤 脂肪前駆細胞 細胞分化

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、脂肪組織内にも多能性を有する体性幹細胞（脂肪組織由来幹細胞：adipose tissue-derived stem cell、以下 ADSC）が存在することが明らかになり、骨髄採取に比し数倍の間葉系幹細胞を比較的低侵襲にしかも大量に採取できることからその再生医療応用が注目されている (Muschler GF et al., J Orthop Res.2001)。

(2) しかしながら、実際臨床応用に用いられている ADSC が含まれるとされる脂肪血管間質画分はその由来・能力の点で多様な細胞集団から構成されており、ADSC を含む脂肪組織の発生学的由来についても不明な点が多い (Ho AD et al. 2008; Lin CS et al., 2010)。現在 ADSC の最も有力な候補は血管周皮細胞 (pericytes) であると考えられるが (Crisan M et al., 2008)、血管周皮細胞は中胚葉以外に神経堤や骨髄等の多様な由来が指摘されている。また脂肪組織そのものも一般に中胚葉由来とされるが、神経堤や骨髄由来細胞の関与を示す報告もみられており、実際の脂肪血管間質画分には脂肪細胞系統以外のもの (e.g. endothelial progenitor cells) も含めて由来・分化段階が様々な細胞群が含まれていると考えられる。

(3) 例えば、ADSC は間葉系幹細胞として脂肪、軟骨、骨に分化する能力をもつのみならず、神経系、肝臓、膵臓などの胚葉を超えた分化を誘導できる可能性が報告されているが、ADSC 培養系に含まれる特定の起源をもつ幹細胞や前駆細胞がこうした分化転換に寄与

している可能性も考えられる。こうした ADSC の多様性とそれぞれの集団の特性を明らかにすることは、生理的な脂肪組織の制御機構という点のみならず、ADSC のより有効で安全な医療応用の観点からも重要な課題である。

2. 研究の目的

我々はこれまでにマウス及びヒト ADSC の分離・培養を行い、部位・年齢による性質の差異と末梢神経再生を促進するニッチェ保持能力について検討を進めてきた (現在投稿中)。その過程の予備的な知見で ADSC 培養系には一部神経堤由来の細胞群が含まれており、他の細胞とは異なる性質を有する可能性を見いだしている。本研究ではこの知見を発展させるかたちで、ADSC 培養系に含まれる異なる起源を有する細胞集団を追跡可能な遺伝子改変マウスモデルを作製し、それぞれの異なる集団の特性を解析することで、ADSC の多様性を明らかにすることを目的とする。さらに、それぞれの集団の特性を利用した従来とは異なる ADSC の新規の利用法を探索すると同時に、ヒト ADSC にも同様の細胞群が含まれているかを検討することで、将来の再生医療応用への発展を試みる。

(1) 異なる起源に基づいた ADSC の構成解析と再生医療応用に向けたそれぞれの有効な細胞分離法の確立

ADSC がいくつかの由来や能力の異なる細胞から構成されたヘテロな細胞集団であることに着目し、Cre/loxP system を利用した遺伝子改変マウスモデルを用いることで ADSC における由来の異なる細胞群を分けて追跡し、それぞれのについてその幹細胞能を

中心とした細胞特性を解明するとともに、その有効な分離法を模索する。また以上の細胞群に特異的な表面抗原パターンを解析することで、ヒト ADSC においても利用可能な分離法を探索する。あわせて脂肪組織の部位による ADSC の由来構成が変化することにも注目し、ADSC の採取部位による、それぞれの由来細胞の採取効率についても評価する。

(2) それぞれの由来や特性に応じた ADSC の臨床応用法の探索

上記で得られた知見をもとに、Cre reporter マウス由来 ADSC をドナーとして用いることで、脂肪再生における ADSC の生体内での動態及び脂肪細胞への分化効率をそれぞれの異なる由来 ADSC 群間で比較検討することで、より効率的で生理的な脂肪組織再生法を模索する。

研究の方法

(1) ADSCs 細胞培養と神経堤由来細胞のマーカーキミング

本実験において用いた細胞はすべて初代培養のものとした。ADSCs はマウスの鼠径部脂肪組織より Zuk PA (Tissue Eng, 2001) らの方法で培養した。P0-Cre/ or Wnt1-Cre/ Floxed-リポーターの 2 種類マウスの頭頸部と腹部のそれぞれ脂肪組織より ADSCs を培養した。

(2) NCDADSCs と non-NCDADSCs の細胞特性の比較検討。

NCDADSCs と non-NCDADSCs それぞれの Cell Yields を FACS Analysis, で Growth rate を MTT assay を用いて評価した。それぞれの細胞群に特異的な表面抗原パ

ターンを解析するために免疫細胞染色を行った。使用したマーカーは神経堤幹細胞マーカー : p75-NTR, シュワン細胞マーカー or 脂肪前駆細胞マーカー : S100 , グリア系マーカー : GFAP, 間葉系マーカー : Fibronectin であった。またマウス間葉系幹細胞マーカー : CD29, CD44, CD90, Sca-1, 血管内皮細胞マーカー : CD31, 造血幹細胞マーカー : CD45, 脂肪前駆細胞マーカー CD24, CD34 神経堤幹細胞マーカー : p75NTR を指標に FACS analysis で評価した。

(3) NCDADSCs と non-NCDADSCs の 3 系統分化能の比較検討

脂肪分化 : 定性を Oil red O 染色で、定量は Perilipin 陽性細胞の割合 (%) と RTPCR による RNA 発現量比較 (目的遺伝子 :

Pref-1, C/EBP δ , GATA2, PPAR- γ , AP2) で比較した。

骨分化 : 定性を Alizarin Red 染色で、定量は Osteopontin 染色面積比率で比較した。

軟骨分化 : 定性を Alcian blue 染色、RTPCR による RNA 発現量比較 (目的遺伝子 :

SOX9, Aggrecan, collagen a) で比較した。

(4) 生体内におけるの解剖学的位置検討 頸部・腹部それぞれの皮下脂肪(In Vivo)における GFP 陽性細胞(NCDADSCs)の探索

P0-Cre/ or Wnt1-Cre/ Floxed-リポーターの 2 種類マウスにおける頸部・腹部それぞれの皮下脂の凍結切片を作成し、以下のマーカーを用いて蛍光免疫組織染色を行った。

mature adipocyte markers : perilipin,

endothelial markers : CD31(PECAM),

mural marker : SMA, pericyte markers :

PDGF β , 神経堤幹細胞マーカー : p75-NTR,

シュワン細胞マーカー or 脂肪前駆細胞マ

カー : S100, グリア系マーカー : GFAP。

研究成果

(1) NCDADSCs の培養

GFP + 細胞 (すなわち Neural Crest-derived ADSCs :NCDADSCs) が約 1-3% の割合で ADSCs に含まれることが確認された。GFP 陽性細胞は細長くいくつかの突起を有した特異な細胞形態をしていた。部位別の含有率については、腹部が約 1-2% なのに対して、頸部は 4% の割合を示した。含有率は継代を重ねても低下しないが、週齢が大きくなるほど低下する傾向があった。NCDADSCs は non- NCDADSCs に比較して細胞増殖率がやや劣るものの 有意な違いはなかった。

(2) 表面抗原パターンの比較検討

GFP + 細胞の多くが P75NTR, S100b, Nestin 陽性を示した。しかし、シュワン細胞マーカーである GFAP、および、間葉系細胞マーカーである Fibronectin は陰性であった。また GFP+細胞は GFP-細胞に比較して脂肪前駆細胞マーカーが高値であった。GFP + 細胞は GFP-細胞に比較して 多能性マーカーの発現は低値であった。これは、GFP+細胞が多能性を維持していない限局的な前駆細胞であることを示唆している。Sox2 については多能性というよりは、神経堤由来細胞に特異的な発現によるものと思われた。

(3) 腹部では、GFP-細胞が 45.7% の細胞が脂肪分化したのに対し、GFP 陽性細胞は 66.3% の細胞が脂肪分化した。頸部でも、GFP-細胞が 46.9% の細胞が脂肪分化したのに対し、GFP 陽性細胞は 73.3% の細胞が脂肪分化した。

骨分化能比較では、腹部・頸部ともに GFP 陽性細胞は GFP 陰性細胞に比較して、骨分化能は低値を示し、軟骨分化においても、Aggrican、collagen2a、sox9 のいずれの mRNA 発現比較でも軟骨分化能は低値を示した。

(4) 頸部の皮下脂肪では GFP 陽性の成熟脂肪細胞が見られた。腹部の皮下脂肪では GFP 陽性の成熟脂肪細胞はみられなかった。脂肪間質 (血管周囲) にみられた GFP 陽性細胞は Endothelial cell marker、pericyte marker、mural cell marker のいずれも陰性であった。一方、In Vivo においても p75NTR と S100 陽性で GFAP 陰性の脂肪間質に存在する GFP 陽性細胞が確認された。

(5) 過去の文献でも、脂肪間質細胞の中で、CD34 陽性 CD31 陰性の subpopulation に脂肪前駆細胞が含まれているといった指摘や、stem cell markers+, CD24,CD34 陽性の細胞群が実際に生体移植で脂肪組織に分化し、増殖したと報告されている^{1,2)}。また山本らによると、脂肪間質細胞の中で p75NTR 陽性細胞は高い脂肪分化能力を維持しているとし³⁾。

われわれの研究成果に文献的な考察を加えると、NCDADSCs は「脂肪前駆細胞」であることが強く示唆される。今後の検討課題としては、ヒトにおいても p75NTR や S100 抗体を用いて、神経堤由来脂肪間質細胞を分離できる可能性があり、またこれらの細胞群は、従来に比較してより効率良く安全に脂肪再生に関連した臨床応用 (Fat Augmentation) に利用可能なことが考えられた。

< 引用文献 >

1: Sengenès C, Lolmède K, Zakaroff-Girard A et al. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display

distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. J Cell Physiol. 205, 2005: 114-22.

2: Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. Cell. 17,2008, 240-249.

3: Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S et al. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. J Dermatol Sci. 48,2007: 43-52

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6件)

素輪善弘 井村徹也、岸田綱郎、沼尻敏明、松田 修、西野健一. 【総説】末梢神経損傷に対する脂肪由来幹細胞移植治療の可能性 細胞-治療の up to date- 5.158-165(2014). (査読有)。

素輪善弘、井村徹也、岸田綱郎、沼尻敏明、松田修、西野健一. 脂肪由来幹細胞を用いた末梢神経再生戦略-in vivo における検討.Peripheral nerve.25. 321(2014). (査読無)。

Sowa Y, Imura T, Numajiri T, Takeda K, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Nishino K.Adipose Stromal Cells Contain Phenotypically Distinct Adipogenic Progenitors Derived from Neural Crest. PLoS ONE.8/e84206 (2013) (査読有). 10.1371/journal.pone.0084206

素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、伏木信次、武田孝輔、西野健一.脂肪組織由来幹細胞を用いた末梢神経再生にシュワン細胞への分化誘導は有用か-in vitro における検討.日本形成外科学会誌 33.649-657(2013) (査読有)。

Sowa Y, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Fushiki S.Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin.Stem Cells Dev.21.1852-1862(2012) (査読有). 10.1089/scd.2011.0403.

素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、西野健一、伏木信次. 脂肪組織由来幹細胞の神経分化誘導は末梢神経再生治療に有用か-培養下での基礎的検討.Peripheral Nerve.23. 279-280(2012) (査読無)。

〔学会発表〕(計13件)

素輪善弘、岸田綱郎、松田 修、西野健一. 多彩な神経損傷に対する再生治療を目的としたシュワン細胞作製の試み. 第44回日本創傷治療学会. 2014年12月3日5(仙台)

素輪善弘、井村徹也、岸田綱郎、沼尻敏明、松田修、西野健一. 末梢神経再生を目的としたダイレクト・リプログラミングによるシュワン細胞作製. 第23回日本形成外科学会基礎学術集会 2014年9月15日(松本)

素輪善弘、井村徹也、岸田綱郎、沼尻敏明、松田修、西野健一.脂肪由来幹細胞を用いた末梢神経再生戦略-in vivo における検討. 第25回日本末梢神経学会学術集会 2014年7月25日(京都)

素輪善弘、井村徹也、岸田綱郎、沼尻敏明、松田修、西野健一.末梢神経損傷に対する未分化脂肪由来間質細胞移植治療の可能性. 第35回日本炎症・再生医学会 2014年7月2日5(沖縄)

素輪善弘、井村徹也、岸田綱郎、沼尻敏明、松田修、西野健一.末梢神経損傷に対する脂肪由来幹細胞移植治療法の検討. 第13回日本再生医療学会総会 2014年3月5日(京都)

素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、武田孝輔、西野健一.成体脂肪組織間質に存在する神経堤由来脂肪前駆細胞.第22回日本形成外科学会基礎学術集会 2013年11月7日(新潟市)

素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、武田孝輔、西野健一.細胞治療のUp To Date :末梢神経損傷における脂肪組織由来幹細胞利用法の基礎的検討.第5回日本創傷外科学会総会学術集会 パネルディスカッション 2013年7月11日(京都)

素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、武田孝輔、西野健一.成体脂肪組織間質には神経堤に由来する白色脂肪前駆細胞が存在する.第12回日本再生医療学会総会 2013年3月23日(横浜)

素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、武田孝輔、西野健一、伏木信次.神経堤を由来に持つ脂肪組織幹細胞の特性解析.第22回日本形成外科学会基礎学術集会 2012年10月5日(猪苗代)

素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、伏木信次、西野健一.脂肪組織由来幹細胞の神経分化誘導は末梢神経再生治療に有用か - 培養下での基礎的検討.第23回日本末梢神経学会学術集会 2012年8月31日(博多)

素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、武田孝輔、西野健一、伏木信次.シユワン分化誘導は脂肪組織由来幹細胞分泌因子を用いた末梢神経再生に有用か-in vitro における検討.第21回日本形成外科学会基礎学術集会. 2012年10月4日(猪苗代)

素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、伏木信次、西野 健一.神経分化誘導の有無による脂肪組織由来幹細胞の末梢神経再生促進能への影響.第33回日本炎症・再生医学会、2012年7月5日(博多)

素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、伏木信次、

西野 健一.脂肪組織由来間質細胞(ASC)の一部は神経堤由来である.第11回日本再生医療学会総会 2012年6月13日(横浜)

6. 研究組織

(1)研究代表者

素輪 善弘 (SOWA TOSHIHIRO)
京都府立医科大学 / 医学研究科(研究院) / 助教

研究者番号 : 80468264