

創傷治癒過程における脂肪由来幹細胞の役割

—マウス虚血再灌流障害モデルを用いた実験—

指導教官 光嶋 勲

東京大学大学院医学系研究科

医学博士過程 外科学専攻

平成18年4月入学

菅 浩隆

目次

要旨	3
序文	4
方法	
細胞採取および培養方法	6
増殖実験	6
Flow cytometry	7
定量 real-time RT-PCR	7
ELISA による HGF 蛋白定量	8
MAPKs シグナル伝達経路の阻害	8
JNK 活性の測定	8
マウス脂肪組織虚血再灌流障害モデルの作成	9
In vivo 阻害実験	9
アポトーシスおよび細胞増殖の組織学的検出	9
免疫組織化学	10
Western blotting	10
GPDH 活性の測定	10
新鮮脂肪組織の 3 次元画像解析	11
統計解析	11

結果

創傷関連細胞増殖因子がヒト ASCs の増殖に及ぼす影響	12
創傷関連細胞増殖因子がヒト ASCs の形質発現に及ぼす影響	14
創傷関連細胞増殖因子がヒト ASCs 自らの 細胞増殖因子発現に及ぼす相互作用	16
ヒト ASCs に対して FGF-2 が及ぼす効果の 細胞内シグナル伝達経路	18
その他の細胞種における FGF-2 の影響	20
マウス兎径部脂肪組織における虚血再灌流障害	22
脂肪組織の創傷治癒過程における FGF-2 および HGF の発現	25
脂肪組織の創傷治癒過程における細胞の挙動	28
創傷治癒過程における HGF 発現および 線維化に対するシグナル阻害の影響	35
考察	38
参考文献	44
謝辞	50

要旨

創傷治癒過程における脂肪由来幹細胞（ASCs）の役割を解明するため、細胞増殖因子に着目して実験を行った。まず、FGF-2 の刺激により ASCs の増殖と HGF 発現が促進されること、そして、これらには JNK 経路が関与していることが判明した。マウスを用いた実験では、創傷治癒過程の初期に FGF-2 が大量に放出され、引き続いて ASCs の増殖や HGF 発現亢進が認められた。抗 FGF-2 中和抗体や JNK 阻害剤を投与すると、ASCs の増殖や HGF 発現亢進が抑制され、さらに治癒後の線維化が増加した。これらの結果から、ASCs は FGF-2 の刺激に呼応し、主に JNK 経路を介して増殖および HGF 分泌を促進することにより、創傷治癒過程の脂肪組織再生や線維化抑制において重要な役割を果たしていると考えられた。

序文

脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem/stromal cells) (以下 ASCs) は、脂肪組織に存在して脂肪細胞の前駆細胞として機能するのみならず、脂肪、骨、軟骨といった間葉系細胞への多分化能を持つ細胞として 2001 年から 2002 年にかけて初めて報告された、比較的新しい概念の細胞である [1]。近年の研究により、ASCs は脂肪組織において主に血管周囲に存在することや、マーカーとして CD34 が有用であることが分かってきた [2-4]。また、この細胞が血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor) (以下 VEGF) や肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor) (以下 HGF) などの細胞増殖因子を分泌することや [5-7]、さらには自らが血管内皮細胞に分化することも報告され [8, 9]、虚血下肢の治療 [5, 7]、心筋梗塞の治療 [10]、骨格筋再生への応用 [11]、脂肪移植との併用 [12] など、血管新生や組織再生を目的とした細胞治療への応用が期待されている。臨床応用もすでに試みられており、骨欠損 [13]、腸管ろう孔 [14]、脂肪組織増大 [15] における使用が報告されている。

ASCs は自ら細胞増殖因子を分泌するだけでなく、種々の細胞増殖因子の影響を受ける。塩基性線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor-2) (以下 FGF-2) は ASCs の増殖能を高め [16, 17]、さらに脂肪分化 [18] や軟骨分化 [16] を促進するといわれている。一方、FGF-2 は ASCs の骨分化は抑制するとされている [17]。血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor) (以下 PDGF) は ASCs の増殖および遊走を促進する [19]。また、当研究室は、VEGF, FGF-2, 表皮増殖因子 (epidermal growth factor) (以下 EGF), インスリン様増殖因子 1 (insulin-like growth factor-1) (以下 IGF-1) を含む培地を用いると、複数の増殖因子が相補的に働くことにより、多分化能を維持しつつ ASCs の増殖を著明に促進できることを報告している [20]。

細胞増殖因子が細胞に影響を及ぼす際に重要となるシグナル伝達因子として、

mitogen-activated protein kinases (以下 MAPKs) がある [21]。MAPKs には extracellular signal-related kinase (以下 ERK), c-Jun N-terminal kinase (以下 JNK), p38 という主要な 3 つの経路が存在するが, PDGF による ASCs の増殖促進や遊走促進には JNK が重要であるとされている [19]。また, ASCs が腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α) に反応すると, p38 を介して VEGF や HGF, IGF-1 を産生するという報告もある [22]。

今回の研究では, 創傷治癒過程における ASCs の役割に注目した。創傷治癒の過程ではさまざまな細胞増殖因子が産生され, 創傷治癒に関与する細胞の活動を制御している。当研究室では以前, 脂肪吸引手術後のドレーン廃液に含まれる細胞増殖因子の濃度を経時的に解析した [23]。その結果, FGF-2 や PDGF は術後早期に放出されるのに対して, VEGF や HGF はそれよりやや遅れてその濃度が上昇するという興味深い現象が認められた。また, 熱傷に対して FGF-2 を [24], 心筋梗塞に対して HGF を投与することにより [25], 組織再生が促進されたという報告もある。しかしながら, 脂肪組織における創傷治癒過程に着目した研究は少なく, 創傷治癒過程における ASCs の役割や ASCs と細胞増殖因子との関連についてはほとんど知られていないのが現状である。その原因として, 脂肪組織の創傷を再現できるような動物モデルが存在しなかったことが考えられる。

研究を始めるにあたり, 脂肪組織に多く存在し, 細胞増殖因子を分泌することができ, 脂肪細胞や血管内皮細胞に分化する能力もある ASCs は, 創傷治癒過程で重要な役割を果たしているはずであると仮説を立てた。また, その活動は, 創傷部位から放出される細胞増殖因子の影響を受けているはずであると考えた。そこでまず, 創傷に関連した細胞増殖因子 (VEGF, FGF-2, HGF, PDGF) がヒトおよびマウスの ASCs に及ぼす影響や関与するシグナル伝達因子を *in vitro* で検証した。さらに, 脂肪組織の虚血再灌流障害モデルをマウスで確立させ, 実際の創傷治癒過程における細胞増殖因子の発現変化や ASCs の関与を *in vivo* で検証した。

方法

細胞採取および培養方法：

腹部および大腿の脂肪吸引手術を受ける健康な女性患者（平均年齢 35.4 ± 3.3 才，平均 body mass index 22.1 ± 1.2 , $n = 9$ ）から吸引脂肪を採取した。この際，各施行医療機関における倫理委員会の審査，了承を得た様式を用いて，事前に患者からのインフォームド・コンセントを得た。吸引脂肪をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline) (以下 PBS) で洗浄後，0.075% コラゲナーゼを含む PBS 中で 37°C の下，30 分間分解を行った。遠心 (800g, 10 分) により脂肪細胞と線維性組織をペレットから分離した後，ペレットのみを再懸濁した。100 μm のフィルターを通した後，10 cm ディッシュに有核細胞 5×10^5 個の細胞を播種し， 37°C ，5% CO_2 の条件下で培養した（文献 [26] 参照）。培地は 10% ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (以下 DMEM) を使用し，3 日毎に培地交換を行った。初代培養を 7 日間行い，第 0 継代と定義した。1 週毎に継代を行い，第 1 – 3 継代のヒト ASCs を実験に使用した。マウス ASCs は，生後 6 週の ICR マウスの単径部脂肪を 2-3 mm 大に細切した後，上記と同様の処理により採取し，第 1 – 3 継代のマウス ASCs を実験に使用した。ヒト皮膚線維芽細胞は皮膚検体から Explant 法により採取し，第 3 – 5 継代の細胞を実験に使用した。ヒト骨髓由来間葉系幹細胞は Cambrex (Walkersville, MD) より購入し，第 3 – 5 継代の細胞を実験に使用した。

増殖実験：

ヒト ASCs を 6-well プレートに 2×10^4 個/well の濃度で播種し，3，6，9 日後の細胞数をセルカウンター (NucleoCounter, Chemometec, Allerod, Denmark) で測定した。その際，創傷に関連する細胞増殖因子 (VEGF, FGF-2, HGF, PDGF) (いずれも Wako Chemical (Osaka, Japan)) をそれぞれ 0, 0.1, 1, 10 ng/ml の濃度で添加した。その他の細胞種にお

いては、10 cm ディッシュに 2×10^5 個の細胞を播種し、7 日後に細胞数を測定した。

5-Bromo-2-deoxyuridine（以下 BrdU）取り込みアッセイには BrdU *In-Situ* Detection Kit (BD Biosciences, San Diego, CA) を使用した。ヒト ASCs を 4-well チャンバースライドに 5×10^4 個/well の濃度で播種し、各種細胞増殖因子を 10 ng/ml の濃度で添加して 48 時間培養した。BrdU ラベリングは 10 μ M の濃度で 3 時間行った。

Flow cytometry :

ヒト ASCs を各種細胞増殖因子 (10 ng/ml) と共に 7 日間培養した後、表面抗原の解析を行った。各種抗体 (anti-CD31-pycoerythrin (以下 PE), CD34-PE (BD Biosciences), Flk-1-PE, Tie-2-PE (R&D Systems, Minneapolis, IL)) と 30 分間反応後、LSR II flow cytometry system (BD Biosciences) を用いて解析を行った。コントロール抗体を用いた場合に陽性率が 0.1% 以下となるようにゲートを設定した。マウスの stromal vascular fraction (以下 SVF) 細胞の解析に際しては、前述した方法で細胞を採取した後、下記の抗体を用いて多重染色による解析を行った。抗体 : Anti-CD31-PE (BD Biosciences), CD-34-fluorescein isothiocyanate (以下 FITC) (eBioscience, San Diego, CA), CD45-PE Cy7 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), APC BrdU Flow Kit (BD Biosciences), Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences)。

定量 real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (以下 RT-PCR) :

ヒト ASCs を各種細胞増殖因子 (10 ng/ml) と共に 7 日間培養した後、RNA を抽出した。その他の細胞種においては、FGF-2 (10 ng/ml) の添加のみを行った。マウス脂肪組織からはホモジェナイズの後に RNA を抽出した。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて 2 μ g の総 RNA を抽出し、逆転写を行った。ABI 7700, TaqMan Universal PCR Master Mix, および下記のプライマー(いずれも Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて cDNA

を 40 サイクル増幅した。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (以下 GAPDH) を内部標準として比較 C_T 法により発現レベルの解析を行った。プライマー：ヒト VEGF (Hs00900054_ml), FGF-2 (Hs00266645_ml), HGF (Hs00300159_ml), PDGF (Hs00234042_ml), GAPDH (Hs99999905_ml), マウス VEGF (Mm00437304_ml), FGF-2 (Mm00433287_ml), HGF (Mm01135182_ml), GAPDH (Mm99999915_ml)。

Enzyme-linked immunosorbent assay (以下 ELISA) による HGF 蛋白定量：

ヒト ASCs を FGF-2 (10 ng/ml) と共に 72 時間培養した後、培養上清を ELISA kit for human HGF (Quantikine, R&D Systems) にて解析した。結果は回収時の細胞数 10⁶ 個当たりの分泌量として表記した。

MAPKs シグナル伝達経路の阻害：

MAPKs の主要な 3 経路を選択的に阻害する阻害剤 (ERK 阻害剤 U0126, p38 阻害剤 SB202190, JNK 阻害剤 SP600125) (いずれも Calbiochem, La Jolla, CA) を FGF-2 (10 ng/ml) と共に添加し、増殖、および遺伝子発現に対する影響を評価した。阻害剤の濃度 (10 μM) は過去の文献 [19] を参照した。

JNK 活性の測定：

Cell-based ELISA kit (CASE Kit, SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD) を用いて c-Jun リン酸化の程度を測定することにより JNK 活性を評価した。ヒト ASCs を 96-well プレートに 2×10⁴ 個/well の濃度で播種し、無血清培地で 24 時間培養した。各種阻害剤 (U0126, SB202190, SP600125) で 15 分間前処置した後、FGF-2 (10 ng/ml) および HGF (10, 100 ng/ml) に 15 分間暴露した。その後、抗リン酸化 c-Jun (Ser 73) 抗体と抗総 c-Jun 抗体によりリン酸化の程度を評価した。

マウス脂肪組織虚血再灌流障害モデルの作成：

動物の管理は東京大学が定めるガイドラインに沿って行われた。6週齢、オスのICRマウスをペントバルビタール（50 mg/kg 体重）で麻酔し、右鼠径部に2 cmの皮膚切開を置いた。鼠径部皮下脂肪を、大腿動静脈からの栄養血管を温存したまま剥離挙上した。皮膚との交通枝は電気凝固した。栄養血管を血管クリップで3時間遮断した後、再灌流した。再灌流後1, 3, 7, 14日後に検体を回収し、flow cytometry, real-time RT-PCR, Western blotting, 組織学的検索（ヘマトキシリン-エオジン染色, アザン染色, 免疫組織化学）を行った。シャム手術（虚血再灌流なし）の検体をコントロールとした。また、反対側（左, 非手術側）の鼠径部脂肪には変化がないことも確認した。

In vivo 阻害実験：

100 μ l の薬剤を 0.5 μ l/hour で約7日間持続的に放出できる浸透圧ポンプ（model 1007D, ALZET, Cupertino, CA）を皮下に移植した。薬剤としては、JNK 阻害剤（SP600125, 10 μ M）, ヤギ抗マウス FGF-2 抗体（50 μ g/ml, R&D Systems）, ヤギ抗マウス HGF 抗体（50 μ g/ml, R&D Systems）, およびコントロールとして PBS を用いた。

アポトーシスおよび細胞増殖の組織学的検出：

虚血再灌流障害後のアポトーシスを検出するために、*In-Situ* Cell Death Detection Kit（Roche Diagnostics, Mannheim, Germany）を用いて terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling（以下 TUNEL）染色を行った。増殖細胞の検出には、BrdU *In-Situ* Detection Kit（BD Biosciences）を用いた。その際、検体回収の6時間および3時間前に BrdU を 1 mg 腹腔内投与した。TUNEL 陽性細胞数および BrdU 陽性細胞数の測定は、無作為に抽出した3視野（200倍）で行った。

免疫組織化学：

採取した脂肪組織は亜鉛固定 (IHC zink fixative, BD Biosciences) の後、パラフィンに包埋した。6 μm の厚さで切片を用意し、下記の 1 次抗体で免疫染色を行った。1 次抗体：ヤギ抗マウス FGF-2 抗体 (R&D Systems), ヤギ抗マウス HGF 抗体 (R&D Systems), ヤギ抗マウス CD68 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), ヤギ抗マウス CD34 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), ラット抗マウス CD31 抗体 (BD Biosciences), ビオチン化マウス抗 BrdU 抗体 (BD Biosciences)。Diaminobenzidine (DAB) による可視化には、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体 (Nichirei, Tokyo, Japan) およびストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ複合体 (BD Biosciences) を用いた。蛍光二重染色には、Alexa Fluor 488 標識ウサギ抗ラット IgG 抗体, Alexa Fluor 488 および 568 標識ロバ抗ヤギ IgG 抗体, Alexa Fluor 568 標識ストレプトアビジン (いずれも Molecular Probes, Eugene, OR) を用いた。アイソタイプ抗体を陰性コントロールとして用いた。

Western blotting：

脂肪組織の検体を 1 ml の lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology) 中でホモジェナイズした後、15,000 rpm で 2 分間遠心し、上清を回収した。Bicinchoninate (BCA) Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL) を用いて蛋白濃度を測定し、等量の蛋白 (10 μg) をゲルに泳動した。Polyvinylidene difluoride (PVD) 膜に転写後、ヤギ抗マウス FGF-2 抗体 (R&D Systems), ヤギ抗マウス HGF 抗体 (R&D Systems), ヤギ抗マウス GAPDH 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて免疫染色を行った。GAPDH のシグナルを内部標準とし、Photoshop 7.0 (Adobe Systems) を用いてバンドの定量化を行った。

Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (以下 GPDH) 活性の測定：

脂肪細胞特異的酵素である GPDH の活性を, GPDH Assay Kit (Primary Cell, Ishikari, Japan) を用いて測定した (文献 [27] 参照)。脂肪組織の検体に 0.25 M ショ糖溶液を加え (計 5 ml), ホモジェナイズした後に遠心処理し, 上清を回収した。酵素抽出液で 10 倍に希釈した後, 96-well プレートで吸光度を測定した (340 nm, 10 分間)。下記の公式により GPDH 活性を求めた。
$$\text{GPDH activity (U/ml)} = \text{吸光度変化率/分} \times 0.482 \times 10$$

新鮮脂肪組織の 3 次元画像解析:

Nishimura ら [28] の方法を用いて, 新鮮脂肪組織の 3 次元画像解析を行った。脂肪組織の検体を未固定のまま 3 mm 大に細切し, 下記の蛍光色素と 30 分間反応させた。蛍光色素: BODIPY 558/568 もしくは BODIPY-FL (Molecular Probes) (脂肪細胞染色), Alexa Fluor 488 標識 isolectin GS-IB₄ (以下 Lectin) (Molecular Probes) (血管内皮細胞染色), Hoechst 33342 (Dojindo, Kumamoto, Japan) (全細胞核染色), Propidium iodide (以下 PI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, IL) (死細胞核染色)。検体を洗浄後, 共焦点顕微鏡 (TCS SP2, Leica, Heerbrugg, Switzerland) を用いて画像解析を行った。

統計解析:

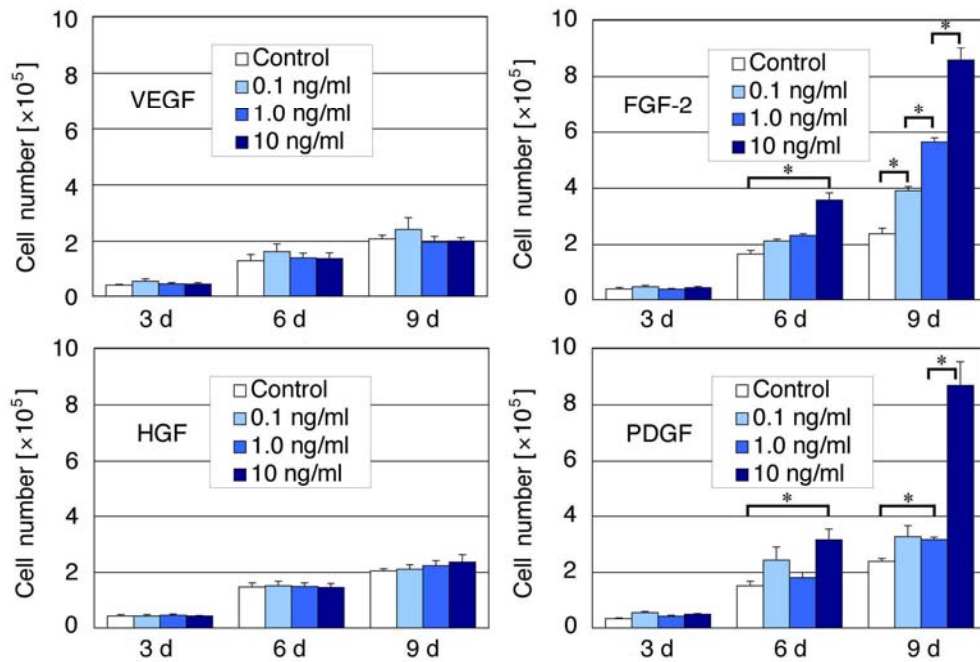
結果は平均±標準誤差で表記した。2 群間の比較には Welch の t 検定を用いた。多群間の比較には多群比較補正を伴う分散分析を用いた。p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意とした。

結果

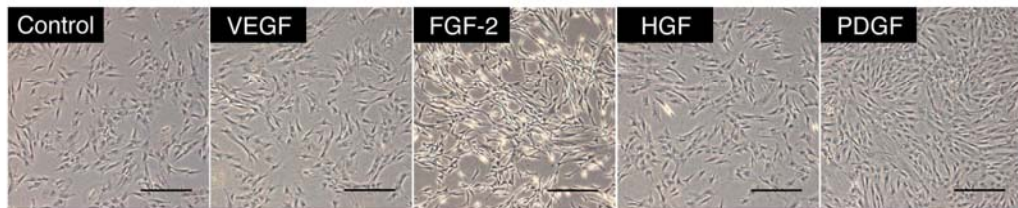
創傷関連細胞増殖因子がヒト ASCs の増殖に及ぼす影響：

FGF-2 および PDGF は濃度依存的にヒト ASCs の増殖を促進した。VEGF および HGF は増殖に対する影響はなかった（図 1A）。形態的には、FGF-2 と共に培養した ASCs は、他の細胞増殖因子と共に培養した ASCs よりも明らかに小型であり、FGF-2 が細胞骨格へも影響を及ぼしていることが示唆された（図 1B）。FGF-2 および PDGF の増殖促進効果は、BrdU 取り込みアッセイでも同様に認められた（図 1C）。

A



B



C

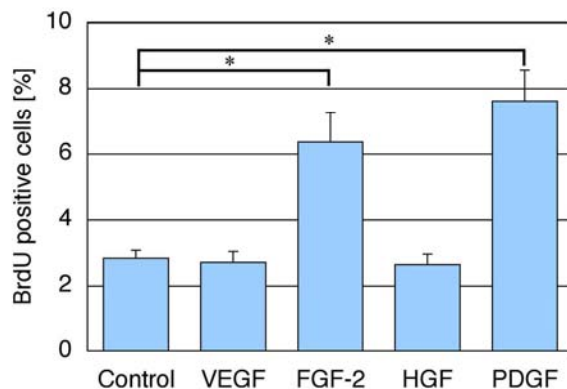


図 1：創傷関連細胞増殖因子が増殖に及ぼす影響

(A) VEGF, FGF-2, HGF, PDGF 添加後 3, 6, 9 日目の細胞数。FGF-2 と PDGF は濃度依存的に ASCs の増殖を促進していた。VEGF と HGF は効果が見られなかった。(n = 4, * p < 0.05) (B) それぞれの細胞増殖因子と共に 6 日間培養した後の光学顕微鏡像。FGF-2 と共に培養した細胞は小型であった。Scale bars = 200 μm. (C) BrdU 取り込みアッセイ。FGF-2 と PDGF を添加することにより, BrdU 陽性細胞の割合が増加した。(n = 3, * p < 0.05)

創傷関連細胞増殖因子がヒト ASCs の形質発現に及ぼす影響：

Flow cytometry の結果，創傷関連細胞増殖因子を投与しても，ヒト ASCs における血管内皮細胞特異的な表面抗原（CD31，CD34，Flk-1，Tie-2）の発現に大きな変化は認められなかった（図 2A, B）。ASCs を細胞外器質と共に培養したり，マウスの虚血下肢に投与したりすると血管内皮細胞に分化するという報告はあるものの [8, 9]，通常の培養条件で細胞増殖因子を単独投与するだけでは血管内皮細胞への分化には不十分であることが示唆された。

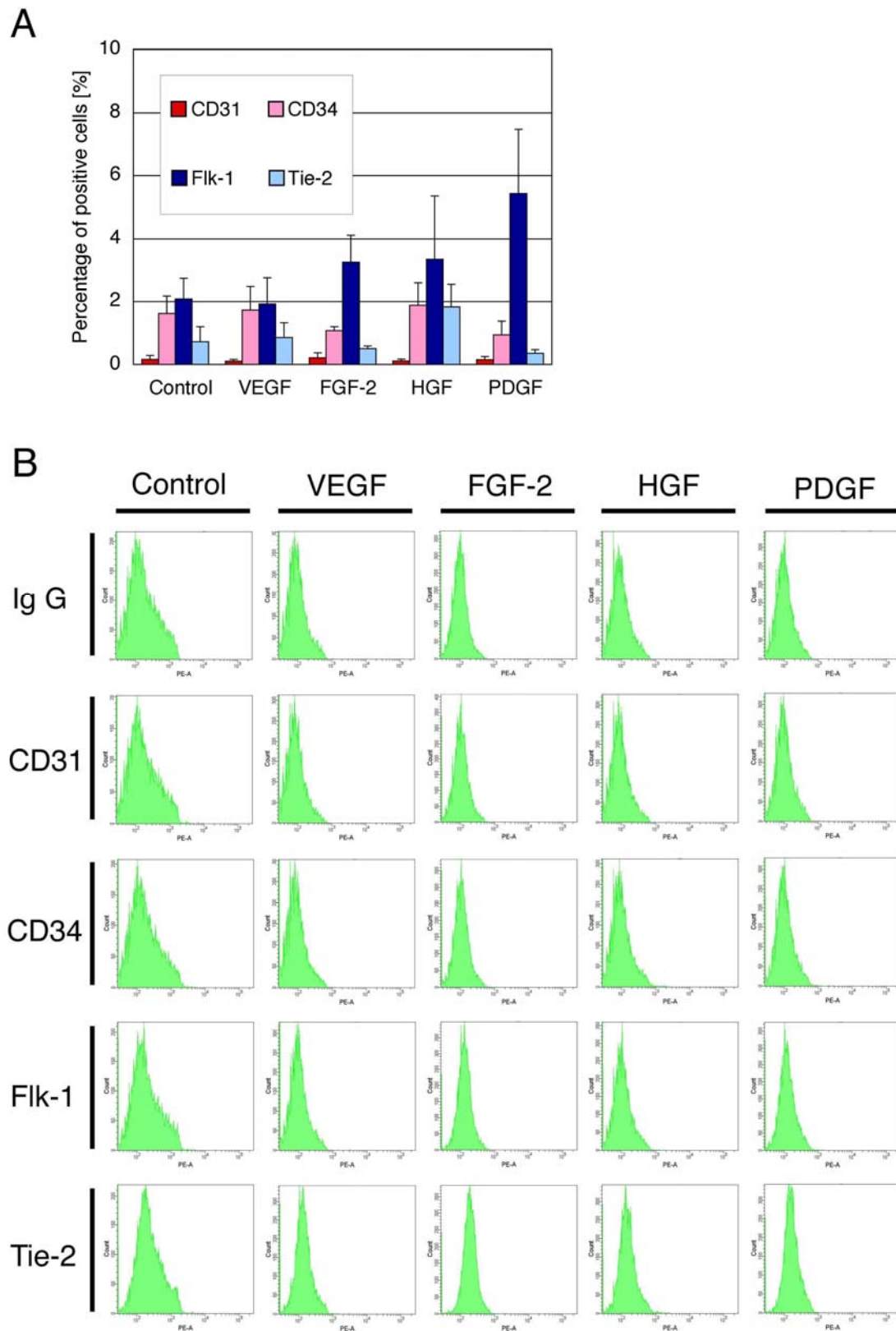


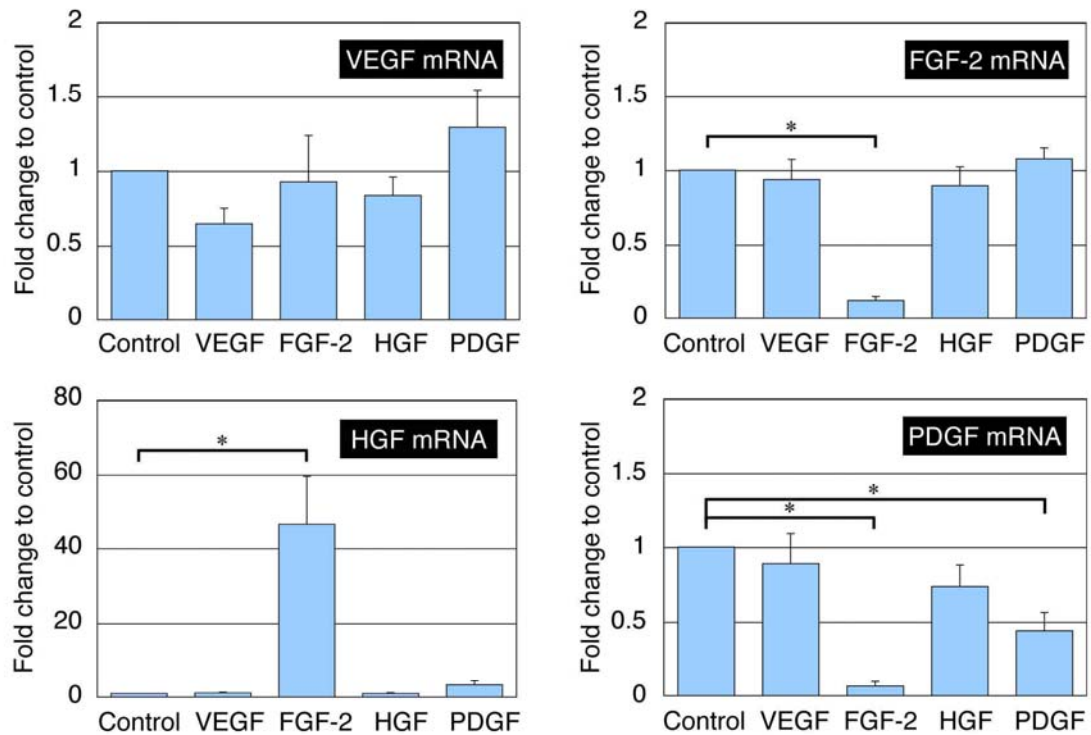
図 2：創傷関連細胞増殖因子が表面抗原の発現に及ぼす影響

(A) VEGF, FGF-2, HGF, PDGF と共に 7 日間培養した後の Flow cytometry 結果。血管内皮細胞特異的な表面抗原 (CD31, CD34, Flk-1, Tie-2) の発現に大きな変化は認められなかった。(B) 代表例。

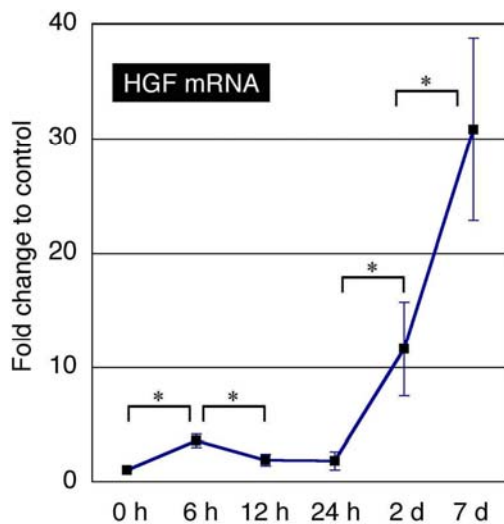
創傷関連細胞増殖因子がヒト ASCs 自らの細胞増殖因子発現に及ぼす相互作用：

PDGF はヒト ASCs による PDGF mRNA 発現を、FGF-2 はヒト ASCs による FGF-2 および PDGF mRNA 発現をそれぞれ抑制していた。最も興味深いことには、FGF-2 がヒト ASCs による HGF mRNA 発現を著明に促進していた（図 3A）。FGF-2 添加後の時間経過を詳細に調べたところ、HGF mRNA の発現亢進は二峰性であり、最初のピークが 6 時間後に見られた後に 24 時間後から更なる発現亢進が認められた（図 3B）。また、ELISA による培養上清の解析により、蛋白レベルでも FGF-2 による HGF 発現亢進が示された（図 3C）。

A



B



C

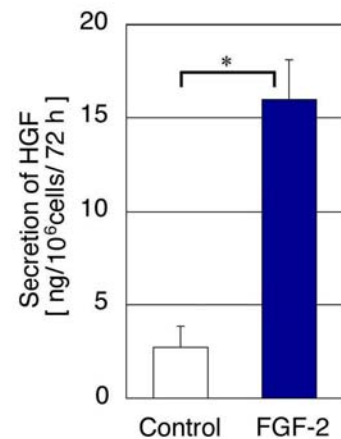


図 3：創傷関連細胞増殖因子の相互作用

(A) VEGF, FGF-2, HGF, PDGF と共に 7 日間培養した後の mRNA 発現。FGF-2 は HGF mRNA 発現を著明に促進していた。また、PDGF は PDGF mRNA 発現を、FGF-2 は FGF-2 および PDGF mRNA 発現をそれぞれ抑制していた。(n = 7, * p < 0.05) (B) FGF-2 添加後の HGF mRNA 発現の時間経過。HGF mRNA の発現亢進は二峰性であった。(n = 6, * p < 0.05)

(C) ELISA による HGF 蛋白定量。FGF-2 によってヒト ASCs からの HGF 蛋白分泌が亢進していた。(n = 4, * p < 0.05)

ヒト ASCs に対して FGF-2 が及ぼす効果の細胞内シグナル伝達経路：

ヒト ASCs に対する FGF-2 の増殖促進効果は、JNK 阻害剤（SP600125）によって有意に抑制された。ERK 阻害剤（U0126）および p38 阻害剤（SB202190）による阻害効果は認められなかった（図 4A）。また、FGF-2 による HGF 発現亢進も、JNK 阻害剤によって有意に抑制された（図 4B）。統計学的に有意ではなかったものの、ERK 阻害剤や p38 阻害剤でも HGF 発現亢進は多少の阻害を受けており、JNK 経路と他の経路とのクロストークが示唆された。JNK 経路の主要な転写因子である c-Jun のリン酸化は、FGF-2 によって増加し、このリン酸化の増加は JNK 阻害剤によって完全に抑制されていた（図 4C）。一方、HGF は c-Jun のリン酸化にはまったく影響を及ぼさなかった。これらの結果から、FGF-2 は主に JNK 経路を介して増殖および HGF 発現を促進しているということが示された。

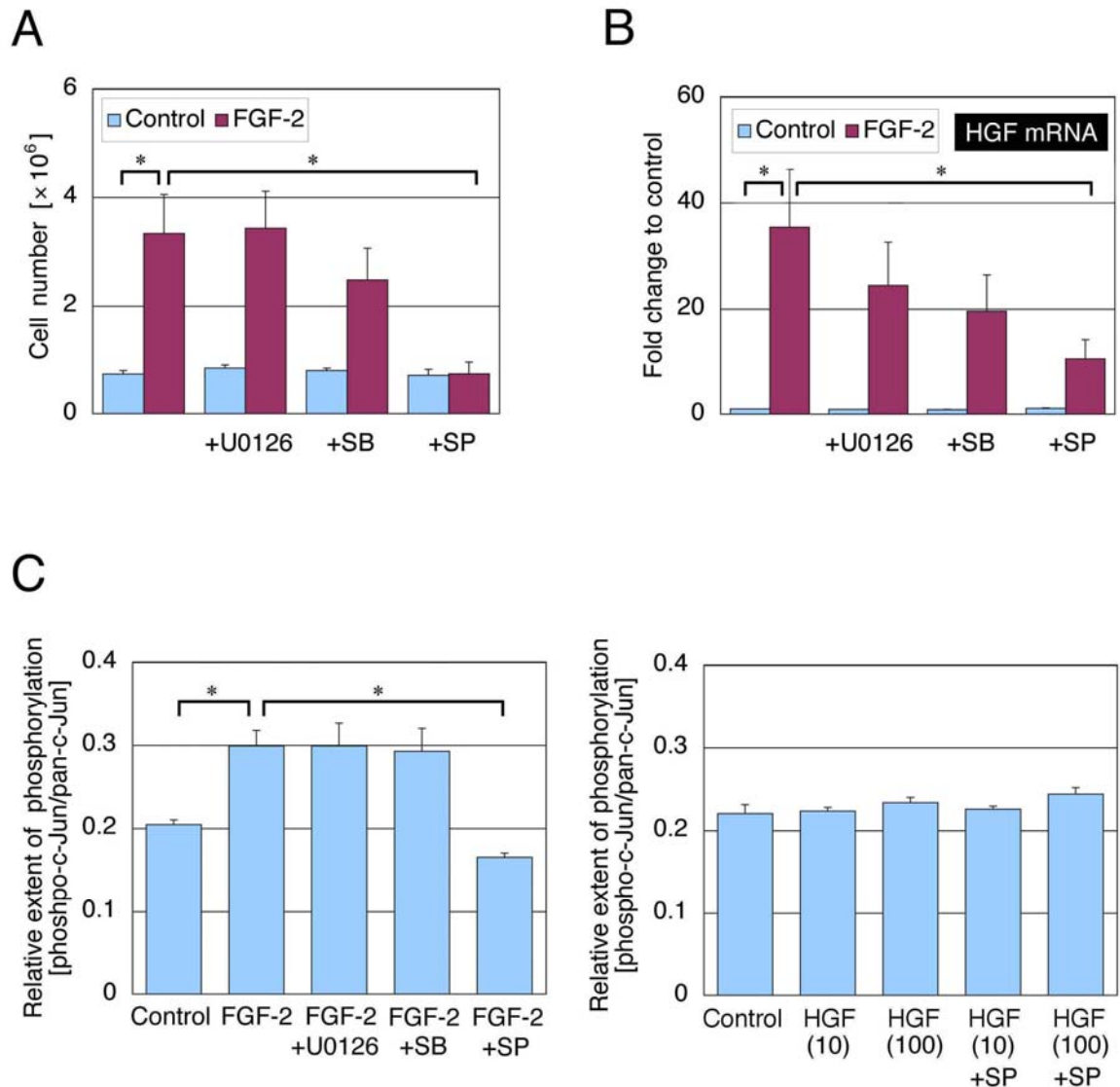


図4：シグナル伝達経路の阻害実験

(A) FGF-2 の増殖促進効果に対する各種阻害剤の影響。JNK 阻害剤によって FGF-2 の増殖促進効果が有意に抑制された。(n = 5, * p < 0.05) (B) FGF-2 による HGF 発現亢進に対する各種阻害剤の影響。JNK 阻害剤によって HGF 発現亢進が有意に抑制された。(n = 5, * p < 0.05) (C) c-Jun リン酸化による JNK 活性の評価。左：FGF-2 によって c-Jun のリン酸化が増加し、このリン酸化の増加は JNK 阻害剤によって完全に抑制された。(n = 4, * p < 0.05) 右：HGF は高濃度 (100 ng/ml) で添加しても c-Jun のリン酸化に影響を及ぼさなかった。

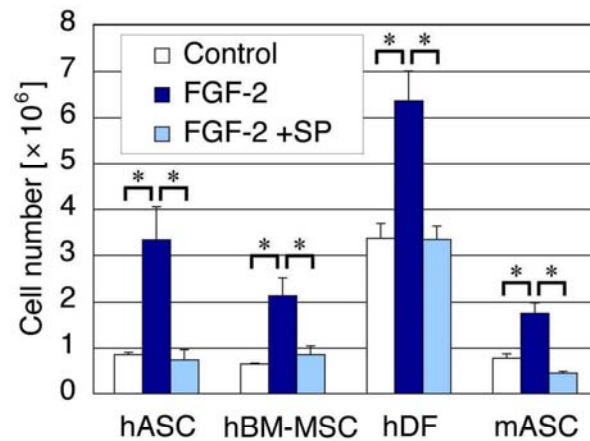
(n = 3, * p < 0.05)

略号：U0126 = ERK 阻害剤, SB = p38 阻害剤 SB202190, SP = JNK 阻害剤 SP600125

その他の細胞種における FGF-2 の影響：

実験を行った 4 種類の細胞全て（ヒト ASCs, ヒト皮膚線維芽細胞, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞, マウス ASCs）において, 細胞増殖が FGF-2 によって促進されていた（図 5A）。また, この FGF-2 による増殖促進は, 全ての細胞種において JNK 阻害剤によって有意に抑制されていた。HGF mRNA 発現についても, 全ての細胞種において FGF-2 による発現亢進が認められた（図 5B）。ヒト ASCs, ヒト皮膚線維芽細胞, マウス ASCs では, この FGF-2 による HGF 発現亢進が JNK 阻害剤によって有意に抑制された。しかし, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞では JNK 阻害剤の効果が認められず, 他のシグナル伝達経路の関与が示唆された。

A



B

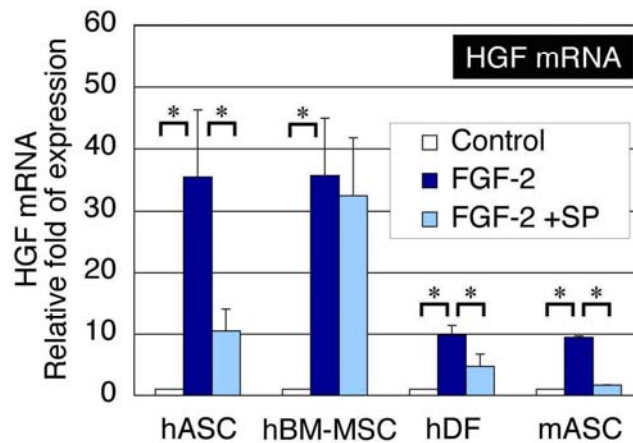


図5：各種細胞における FGF-2 の影響

(A) FGF-2 の増殖促進効果。全ての細胞種において、FGF-2 によって増殖が促進され、その効果は JNK 阻害剤によって抑制された。(n = 5, * p < 0.05) (B) FGF-2 による HGF 発現亢進。すべての細胞種において、FGF-2 によって HGF の発現が促進されていた。ヒト骨髓由来間葉系幹細胞以外では、その HGF 発現亢進が JNK 阻害剤によって有意に抑制されていた。(n = 5, * p < 0.05)

略号：h = ヒト，m = マウス，BM-MSC = 骨髓由来間葉系幹細胞，DF = 皮膚線維芽細胞，SP = JNK 阻害剤 SP600125

マウス単徑部脂肪組織における虚血再灌流障害：

続いて、実際の生体における創傷治癒過程を調べるため、脂肪組織の虚血再灌流障害モデルをマウスで確立させた。マウスの単徑部脂肪には、大腿動静脈からの栄養血管が安定して認められ、解剖学的な変異はなく、再現性のある実験が可能であった（図 6A）。脂肪組織の重量は1日目で増加しており、組織損傷による浮腫が示唆された（図 6B）。一方、成熟脂肪細胞の数と比例する GPDH 活性は、実験期間を通して変化が認められなかった（図 6C）。組織学的には、血球細胞の間質への浸潤が1日目から認められ、それは3日目をもっとも顕著であった。直径 50 μm 以下の小型脂肪細胞が1日目から出現し、3日目にはその数が増大していた。これは破壊された脂肪細胞あるいは新たに分化した脂肪細胞であると考えられた。7日目には赤血球や小型脂肪細胞の減少が認められたが、脂肪細胞の間にはまだ多数の有核細胞が存在していた。14日目には線維性組織の増加が見られるのみで、創傷治癒がおおむね完了していると考えられた（図 6D）。同様の傾向は3次元画像解析でも認められた。JNK 阻害剤を投与した群では小型脂肪細胞の消失が遅れる傾向にあり、創傷治癒過程の遅延が示唆された（図 6E, F）。また、3日目に多く見られる小型脂肪細胞の周囲には、毛細血管の増生が認められた（図 6G）。これらの結果から、虚血再灌流障害後の脂肪組織では、脂肪細胞の破壊や細胞浸潤などの炎症性変化が起こる一方で、新たな脂肪新生も起こっており、そのような再生変化によって最終的には脂肪組織のボリュームが保たれることが示唆された。

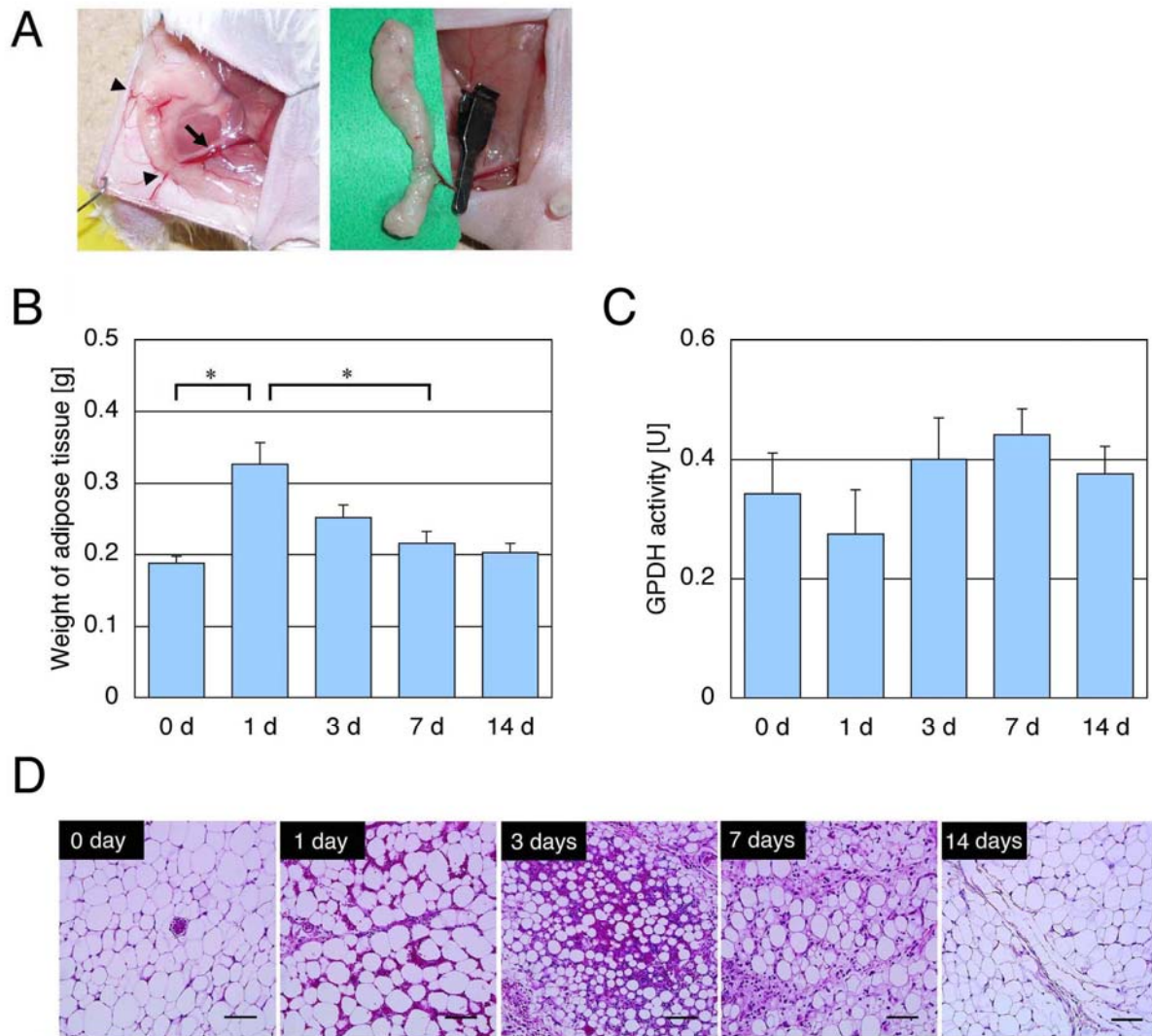


図6：脂肪組織の虚血再灌流障害およびその後の再生変化

(A) マウスの単徑部脂肪組織。左：矢印は大腿動静脈からの栄養血管を示す。矢印の頭は皮膚との交通枝を示す。右：栄養血管を温存したまま脂肪組織を挙上し、血管クリップで栄養血管を3時間遮断した後に再灌流した。(B) 脂肪組織の重量変化。1日目に重量の増加が認められた。(n = 3, * p < 0.05) (C) GPDH 活性の変化。14日の間で有意な変化は認められなかった。(D) ヘマトキシリン - エオジン染色。創傷の早期から、血球細胞の浸潤および小型脂肪細胞の出現が認められた。これらは徐々に減少し、14日目には創傷治癒が完了していた。Scale bars = 100 μ m.

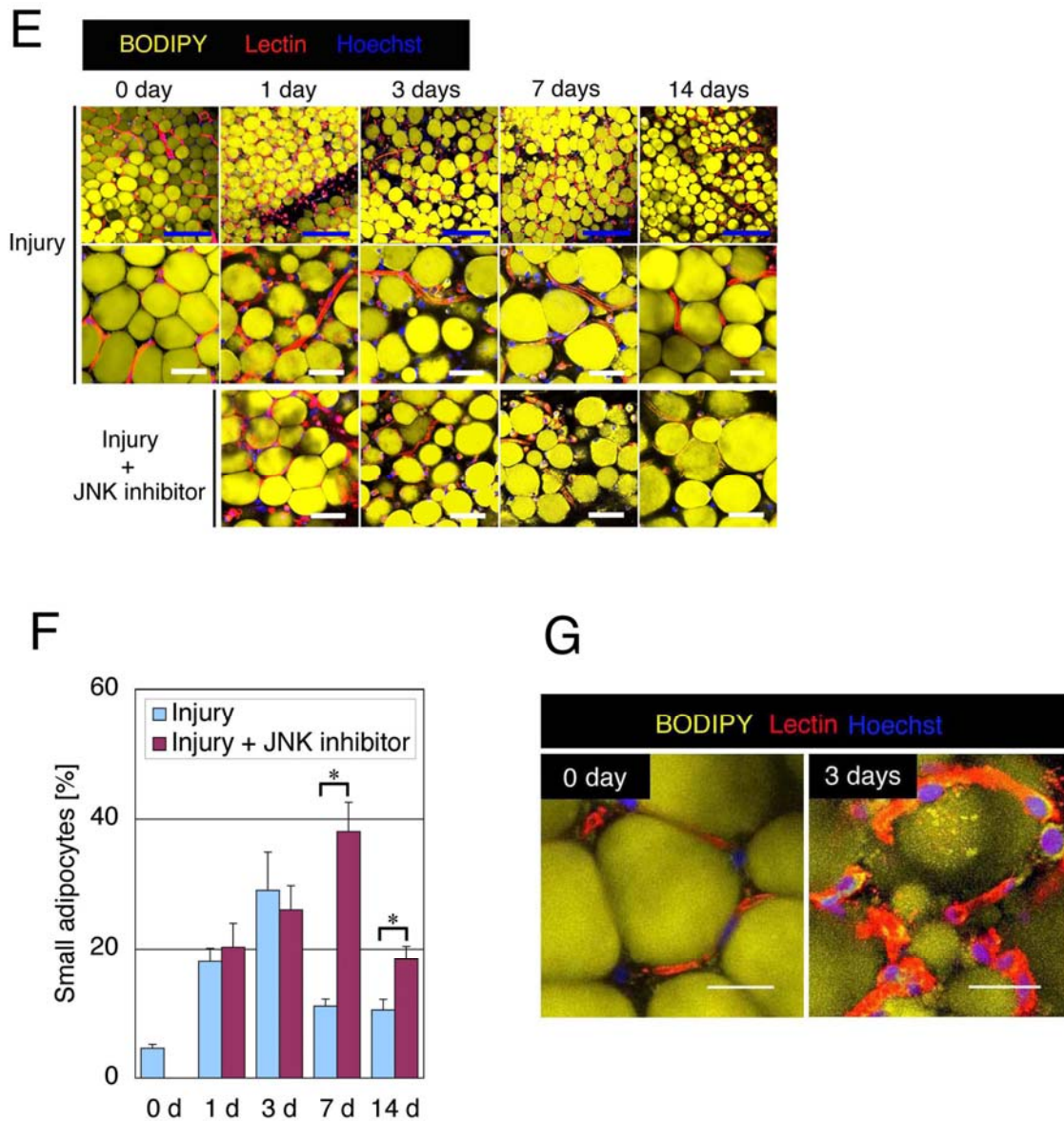


図 6：続き

(E) 新鮮脂肪組織の 3 次元画像解析。脂肪細胞が BODIPY (黄), 血管が Lectin (赤), 核が Hoechst 33342 (青) で染色されている。虚血再灌流障害後 1 日目から 3 日目にかけて有核細胞や小型脂肪細胞の数が増加していた。また, JNK 阻害剤を投与した群では, 小型脂肪細胞の消失が遅れる傾向にあった。Scale bars = 200 μm (青), 50 μm (白)。(F) 小型脂肪細胞 (直径 50 μm 以下) の定量化。JNK 阻害剤を投与した群では, 7 日目および 14 日目の小型脂肪細胞の割合が有意に高かった。(n = 3, * $p < 0.05$) (G) 3 次元画像の拡大像。3 日目に見られる小型脂肪細胞の周囲では, 毛細血管が多く認められた。Scale bar = 20 μm .

脂肪組織の創傷治癒過程における FGF-2 および HGF の発現：

免疫組織化学の結果、FGF-2 は 1 日目から間質に認められ、その発現のピークは 3 日目であった (図 7A)。7 日目以降では FGF-2 はあまり検出されなかった。Western blotting でも同様の傾向が認められた (図 7B)。一方、HGF はそれよりやや遅れる形で、3 日目から発現亢進が認められ、そのピークは 7 日目であった (図 7C, D)。興味深いことに、FGF-2 mRNA の発現は損傷直後から一貫して抑制されており (図 7E)、これは、FGF-2 が細胞から新たに産生されるのではなく、細胞外基質や死細胞にストックされていたものが組織損傷により一気に放出されることを示唆していた。また、*in vitro* の実験で示されたように、創傷の刺激で放出された FGF-2 は ASCs 自らの FGF-2 mRNA 発現をむしろ抑制してしまうと考えられた。対照的に、HGF mRNA の発現は 3 日目に促進されていた (図 7F)。これらの結果から、創傷治癒の過程ではまず FGF-2 が早期に細胞外基質や死細胞から放出され、それに刺激をされる形で、HGF が遅れて発現されるということが示された。また、その過程では、*in vitro* の実験で示されたように、FGF-2-JNK-HGF という一連のシグナル伝達経路が関与していることが強く示唆された。血管新生作用を持つ VEGF の発現についても調べたが、VEGF mRNA は創傷の直後からその発現が抑制されていた (図 7G)。

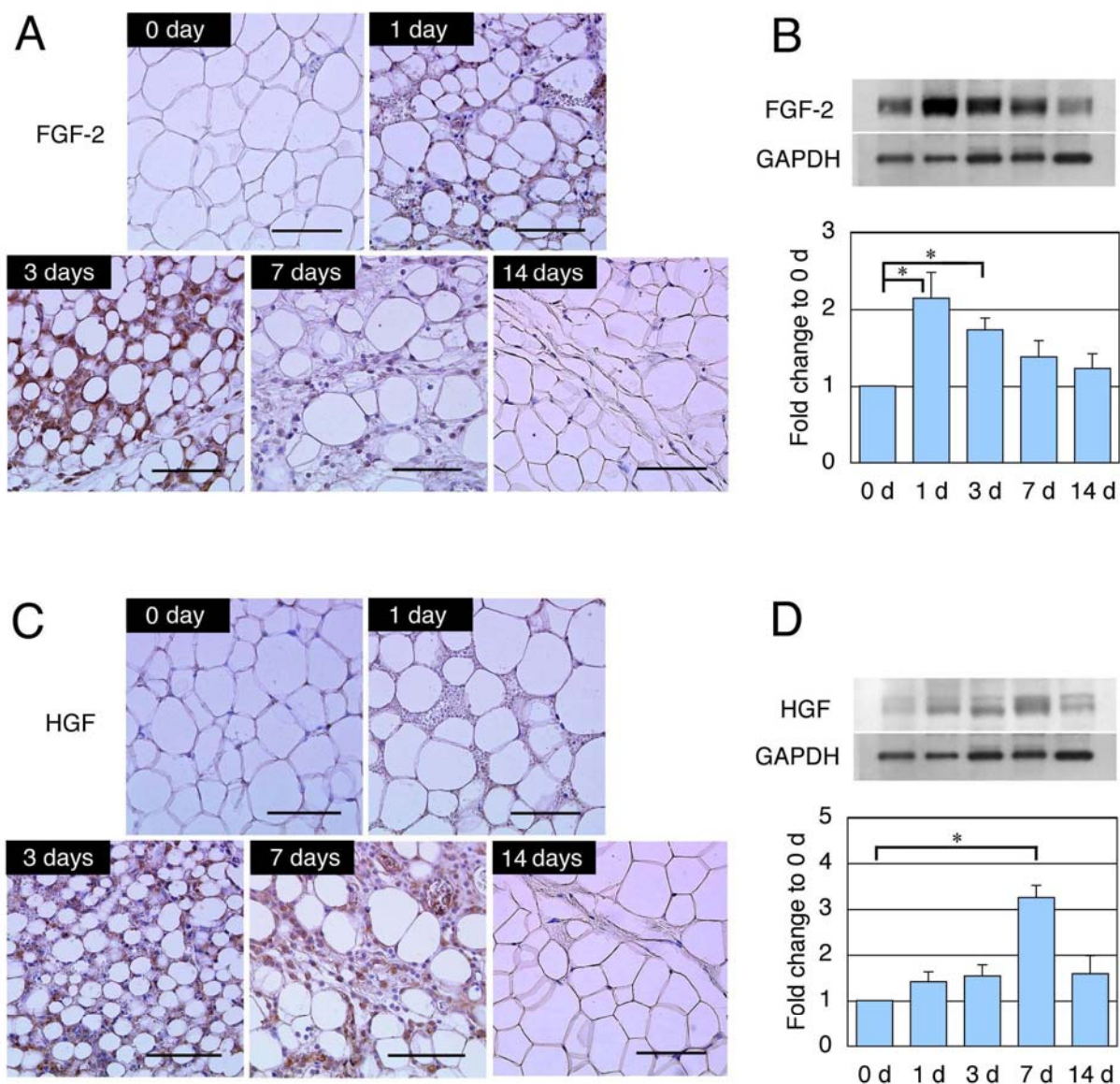


図7：創傷治癒過程における FGF-2 および HGF の発現変化

(A) FGF-2 に対する免疫組織化学。FGF-2 は創傷後 1 日目から認められ、そのピークは 3 日目であった。Scale bar = 100 μ m. (B) FGF-2 に対する Western blotting。1 日目と 3 日目で FGF-2 の有意な増加が認められた。(n = 3, * p < 0.05) (C) HGF に対する免疫組織化学。創傷後 1 日目には HGF はほとんど検出されなかった。HGF は創傷後 3 日目から認められ、そのピークは 7 日目であった。Scale bar = 100 μ m. (D) HGF に対する Western blotting。7 日目で HGF の有意な増加が認められた。(n = 3, * p < 0.05)

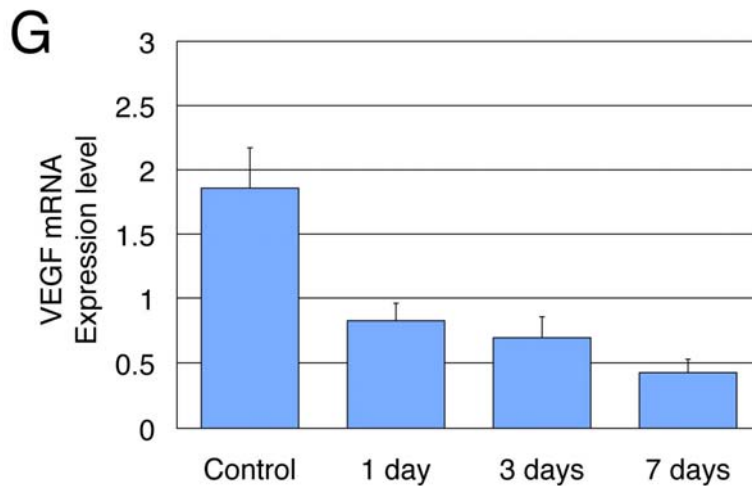
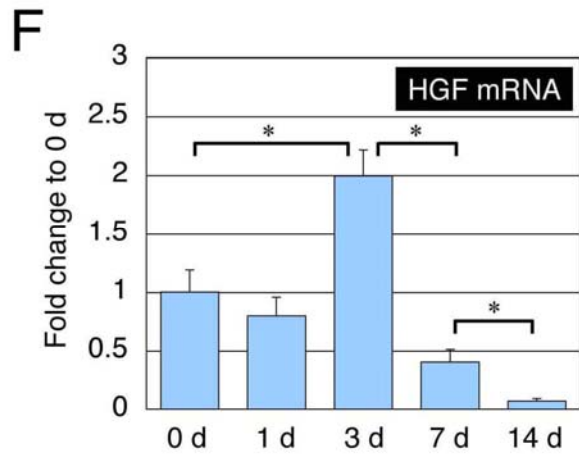
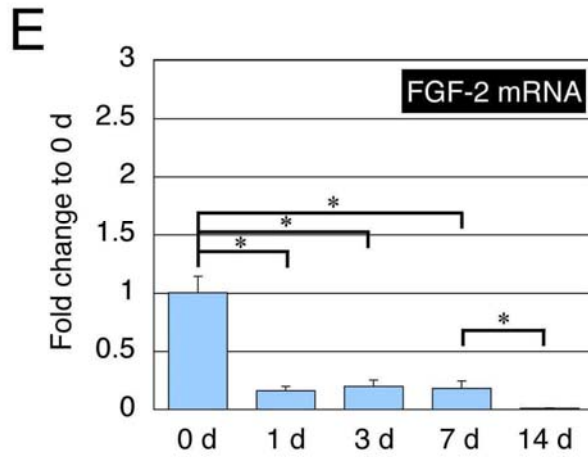


図 7 : 続き

(E) 虚血再灌流障害後の FGF-2 mRNA 発現。FGF-2 mRNA は直後からその発現が抑制されていた。(n = 5, * p < 0.05) (F) 虚血再灌流障害後の HGF mRNA 発現。HGF mRNA は 3 日目にその発現が促進されていた。(n = 5, * p < 0.05) (G) 虚血再灌流障害後の VEGF mRNA 発現。VEGF mRNA は直後からその発現が抑制されていた。(n = 5, * p < 0.05)

脂肪組織の創傷治癒過程における細胞の挙動：

TUNEL 陽性のアポトーシス細胞は1日目にもっとも多く（有核細胞の 6-9%），その後は減少した（図 8A, B）。Flow cytometry の結果，1日目に見られるアポトーシス細胞の多く（ $90.1 \pm 3.0\%$, $n = 3$ ）は CD45 陽性の血球由来細胞であることが判明した（図 8C）。また，PI 陽性の死細胞も1，3日目に多く認められ，その一部（1日目： $10.7 \pm 5.7\%$ ，3日目： $4.4 \pm 0.5\%$, $n = 3$ ）は脂肪細胞であった。7日目以降はPI 陽性の死細胞は減少した。JNK 阻害剤を投与した群ではPI 陽性細胞の消失が遅れる傾向にあり，創傷治癒過程の遅延が示唆された（図 8D, E）。さらに，PI と Lectin の組み合わせによる染色では，PI 陽性細胞の一部（ $17.2 \pm 5.5\%$, $n = 3$ ）が Lectin 陽性であり，血管内皮細胞も壊死していることが示された（図 8F）。

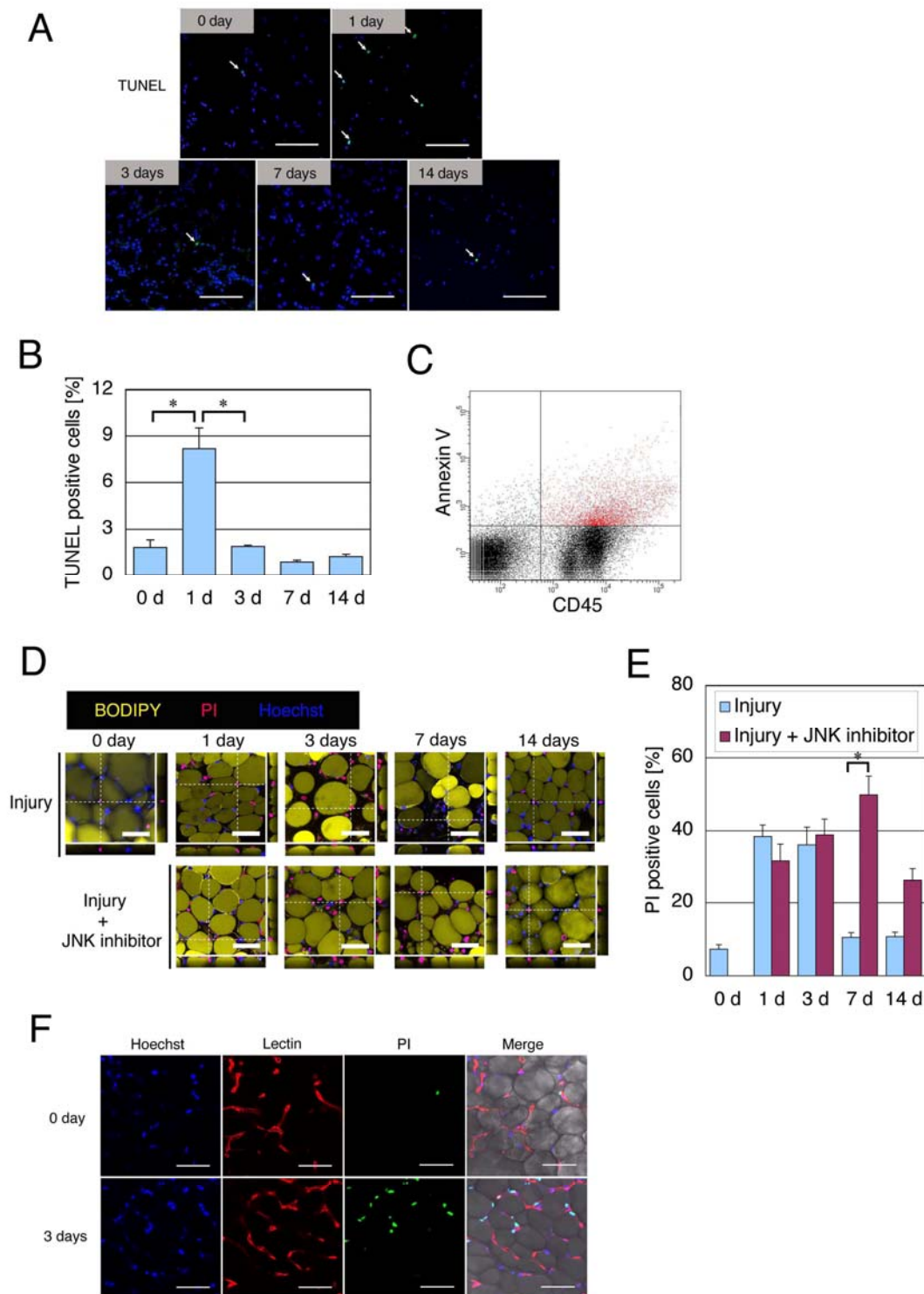


図 8：虚血再灌流障害後の細胞死

(A) TUNEL 染色。TUNEL 陽性細胞（矢印）は 1 日目に多く認められた。Scale bars = 100 μ m. (B) TUNEL 陽性細胞の定量化。($n = 4$, * $p < 0.05$) (C) Flow cytometry によるアポトーシス細胞（1 日目）の解析。Annexin V 陽性のアポトーシス細胞の多くは CD45 陽性であった。(D) PI 染色。PI 陽性の死細胞は 1 日目と 3 日目に多く認められ、その一部は BODIPY 陽性（黄）の脂肪細胞であった。また、JNK 阻害剤を投与した群では、死細胞の消失が遅れる傾向にあった。Scale bars = 50 μ m. (E) PI 陽性細胞の定量化。($n = 3$, * $p < 0.05$) (F) PI 染色。PI 陽性細胞の一部は Lectin 陽性（赤）の血管内皮細胞であった。Scale bars = 100 μ m.

一方、BrdU 陽性の増殖細胞は 3 日目をピークに増加していた (図 9A, B)。Flow cytometry による解析の結果、3 日目に見られる BrdU 陽性細胞は CD45 陽性細胞と CD45 陰性細胞に分けられ、その中の CD45 陰性細胞の多く ($88.2 \pm 4.2\%$, $n = 3$) は CD34 陽性/CD31 陰性の ASCs であることが判明した (図 9C)。また、CD45 陽性細胞も含めた SVF 細胞数が 7 日目をピークに増加していくこと、CD34 陽性/CD31 陰性の ASCs は 3 日目が細胞数のピークであることも確認された (図 9D)。

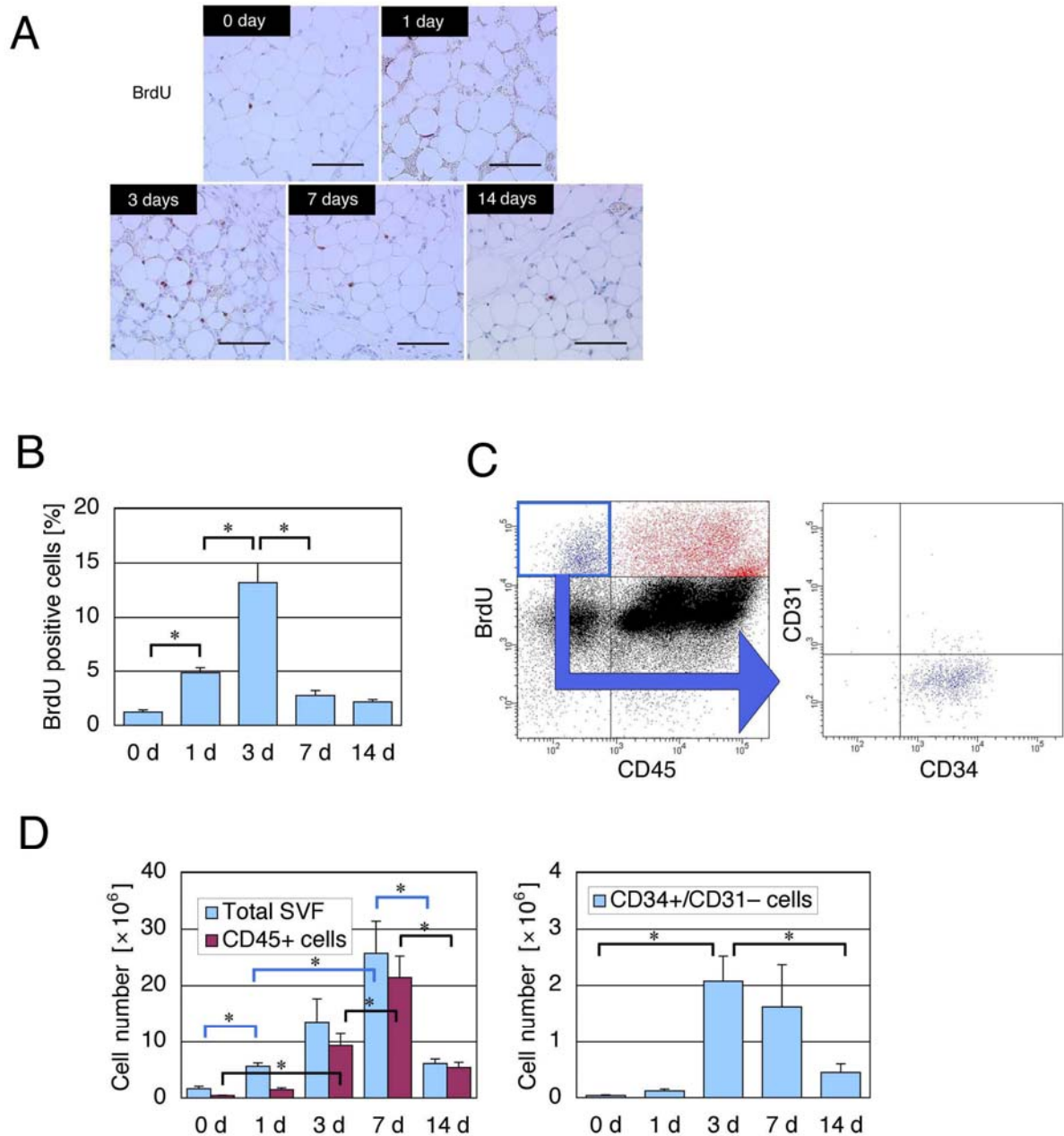


図 9：虚血再灌流障害後の細胞増殖

(A) BrdU 染色。BrdU 陽性細胞は 3 日目をピークとして徐々に増加していた。Scale bars = 100 μ m. (B) BrdU 陽性細胞の定量化。(n = 4, * p < 0.05) (C) Flow cytometry による増殖細胞 (3 日目) の解析。BrdU 陽性の増殖細胞は CD45 陽性細胞と CD45 陰性細胞に分けられ、BrdU 陽性/CD45 陰性細胞 (青) の多くは CD34 陽性/CD31 陰性であった。(D) Flow cytometry による SVF 細胞の解析。(左：総細胞数および CD45 陽性細胞数。右：CD34 陽性/CD31 陰性細胞数。) CD45 陽性細胞も含めた SVF 細胞数が 7 日目をピークに増加していた。CD34 陽性/CD31 陰性の ASCs は 3 日目が細胞数のピークであった。

免疫組織化学の結果から、CD34 陽性／CD31 陰性の ASCs は平常時にも脂肪組織に広く分布しており、特に、血管周囲に多く存在することが確認された（図 10A）。また、創傷治癒過程で増加する増殖細胞（BrdU 陽性）の多くが CD34 陽性であること、その CD34 陽性細胞は Lectin 陰性であることも分かり（図 10B）、創傷治癒過程では CD34 陽性／Lectin 陰性の ASCs が増殖しながら重要な働きをしていることが示唆された。JNK 阻害剤を投与した群では、本来なら 3 日目から 7 日目にかけて増加してくる CD34 陽性／Lectin 陰性の ASCs が少ないことが確認された（図 10C）。また、マクロファージのマーカーである CD68 についても調べたところ、平常時の脂肪組織では CD68 陽性のマクロファージはまばらに散見されるのみであったが、創傷後には 3 日目をピークとして小型脂肪細胞の周囲に集簇している像が認められ、壊死した脂肪細胞をマクロファージが貪食していると考えられた（図 10D）。CD31 に対する免疫組織化学により血管密度を評価したところ、虚血再灌流障害の前後では血管密度に有意な差は認められなかった（図 10E）。また、JNK 阻害剤の影響も認められなかった。

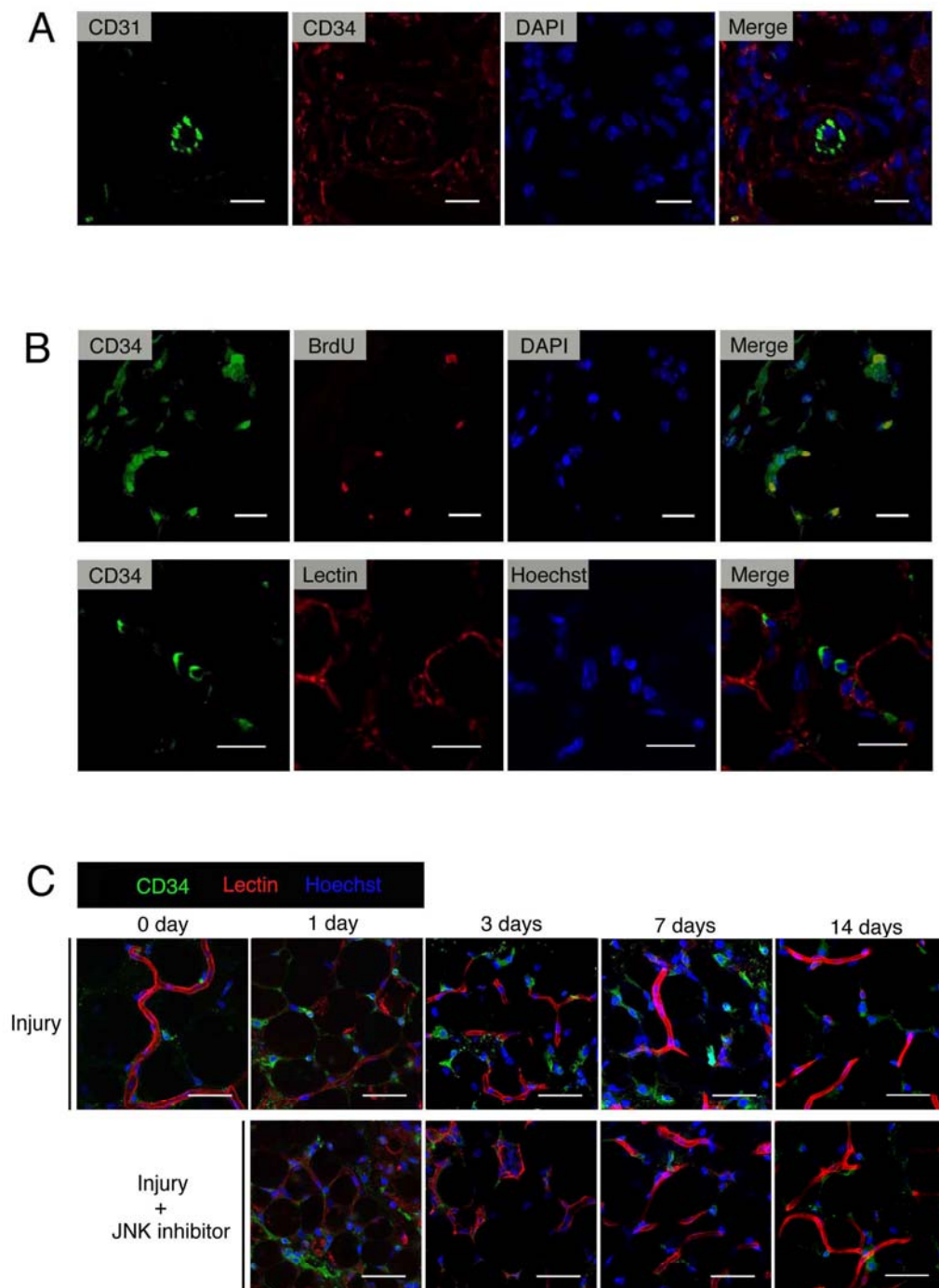


図 10：創傷治癒過程における各種細胞の挙動

(A) 平常時の脂肪組織における CD34 (赤) および CD31 (緑) に対する免疫組織化学。CD34 陽性/CD31 陰性の ASCs は脂肪組織に広く分布しており、特に、血管周囲に多く存在していた。Scale bars = 20 μ m. (B) 虚血再灌流障害後 3 日目の脂肪組織における免疫組織化学。BrdU (赤) 陽性細胞の多くが CD34 (緑) 陽性であり、その CD34 陽性細胞は Lectin (赤) 陰性であった。Scale bars = 20 μ m. (C) CD34 (緑) 陽性/Lectin (赤) 陰性細胞の挙動。JNK 阻害剤を投与した群では、本来なら 3 日目から 7 日目にかけて増加してくる CD34 陽性/Lectin 陰性の ASCs が少なかった。Scale bars = 50 μ m.

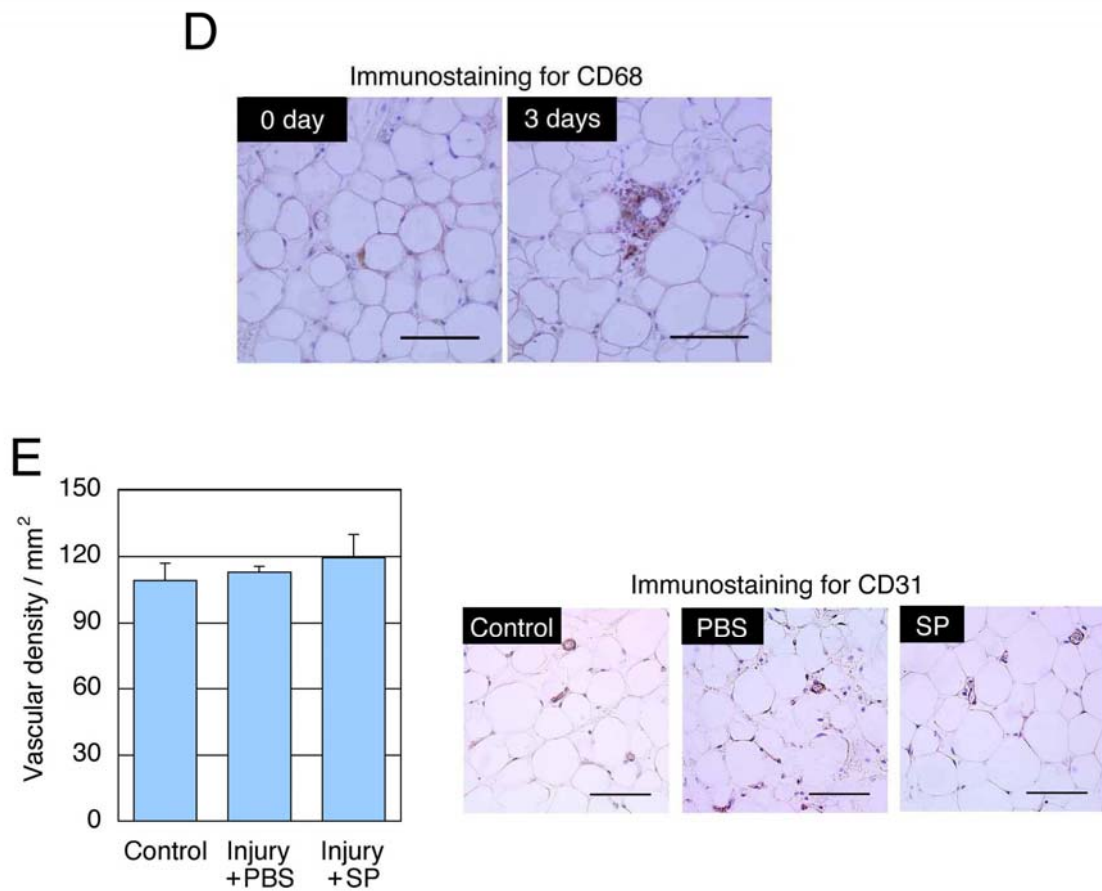


図 10 : 続き

(D) CD68 に対する免疫組織化学。平常時の脂肪組織では CD68 陽性のマクロファージはまばらに散見されるのみであったが、創傷後には 3 日目をピークとして小型脂肪細胞の周囲に集簇している像が認められた。Scale bars = 100 μ m. (E) CD31 に対する免疫組織化学。平常時 (Control) および虚血再灌流障害後 2 週間 (Injury) との間には、血管密度の差は認められなかった。また、JNK 阻害剤の影響も認められなかった。Scale bars = 100 μ m.

創傷治癒過程における HGF 発現および線維化に対するシグナル阻害の影響：

これまでの実験結果から、実際の生体における創傷治癒過程でも、*in vitro* で確認されたように、FGF-2 に刺激を受けた ASCs が JNK 経路を介して増殖および HGF 発現を促進していることが強く示唆された。これを更に確かめるため、*in vivo* でのシグナル阻害実験を行った。JNK 阻害剤および FGF-2 中和抗体により、創傷 3 日目に増加する BrdU 陽性増殖細胞の割合が有意に抑制された（図 11A）。HGF 中和抗体ではこのような抑制は認められなかった。また、JNK 阻害剤および FGF-2 中和抗体は、創傷 3 日目の HGF mRNA 発現亢進も有意に抑制していた（図 11B）。JNK 阻害剤および FGF-2 中和抗体による HGF 発現の抑制は、免疫組織化学（図 11C）や Western blotting（図 11D）によって蛋白レベルでも確認された。さらに、脂肪組織の線維化をアザン染色によって評価したところ、虚血再灌流障害によって線維化面積が平常時の 10% から 1 4 日後には 23% に増加していた。この線維化の程度が、JNK 阻害剤および FGF-2 中和抗体により有意に増加していた（図 11E）。線維化の増加は、HGF 中和抗体によって HGF を直接阻害した場合でも同様に認められた。これらの結果から、脂肪組織の創傷治癒過程では HGF によって線維化が抑制されていること、また、この HGF は JNK を介して FGF-2 によって誘導される形で主に ASCs から分泌されていることが確認された。

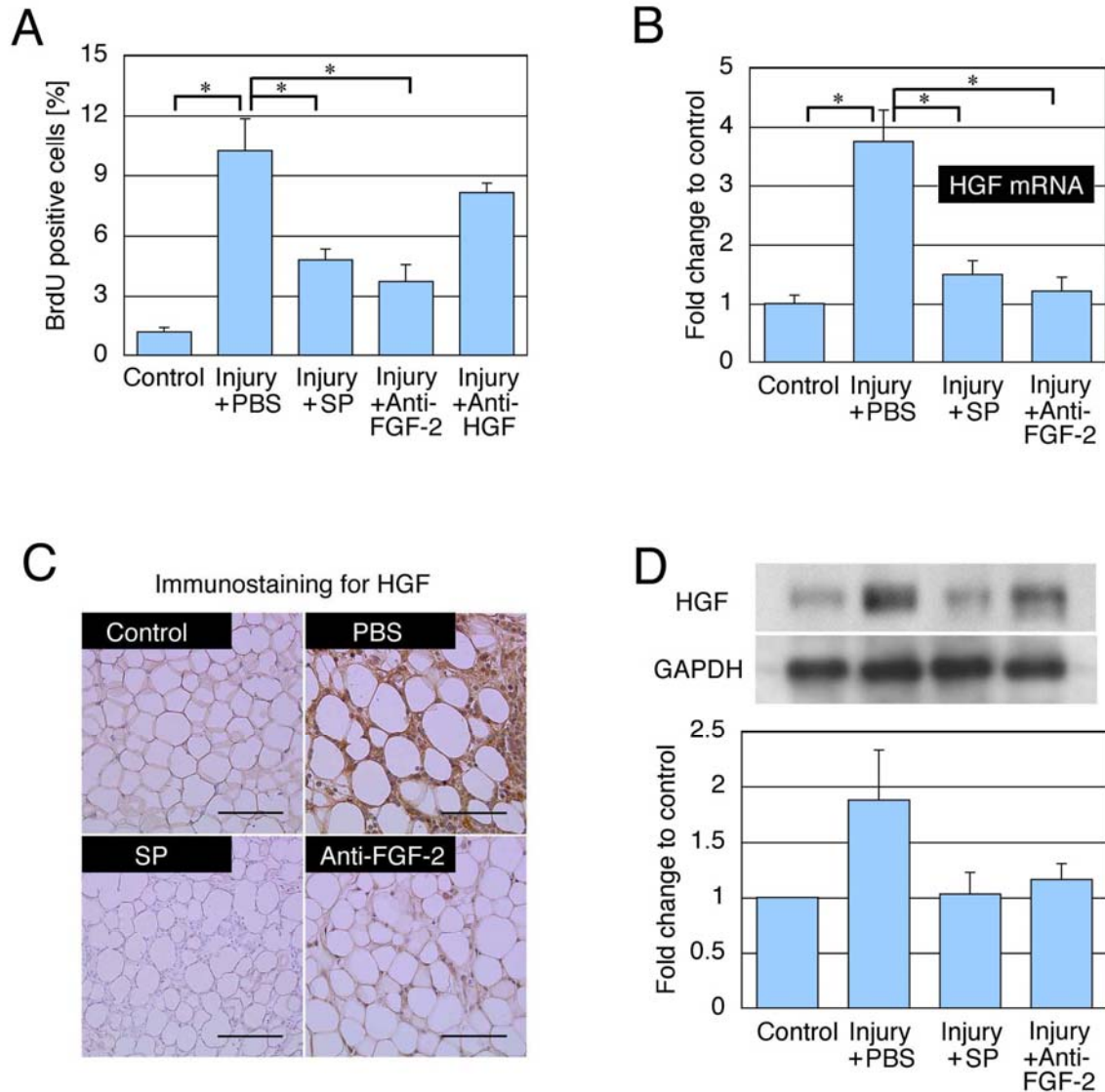


図 1 1 : 創傷治癒過程におけるシグナル阻害の影響

(A) 創傷 3 日目の増殖細胞 (BrdU 陽性) の割合。JNK 阻害剤および FGF-2 中和抗体により増殖細胞の割合が有意に抑制された。(n = 4, * p < 0.05) (B) 創傷 3 日目の HGF mRNA 発現。JNK 阻害剤および FGF-2 中和抗体により HGF 発現亢進が有意に抑制されていた。(n = 5, * p < 0.05) (C) 7 日目の検体における HGF に対する免疫組織化学。JNK 阻害剤および FGF-2 中和抗体により HGF 蛋白の発現が抑制されていた。Scale bars = 100 μ m. (D) 7 日目の検体における HGF に対する Western blotting。JNK 阻害剤および FGF-2 中和抗体により HGF 蛋白の発現が抑制されていた。

略号 : SP = JNK 阻害剤 SP600125

E

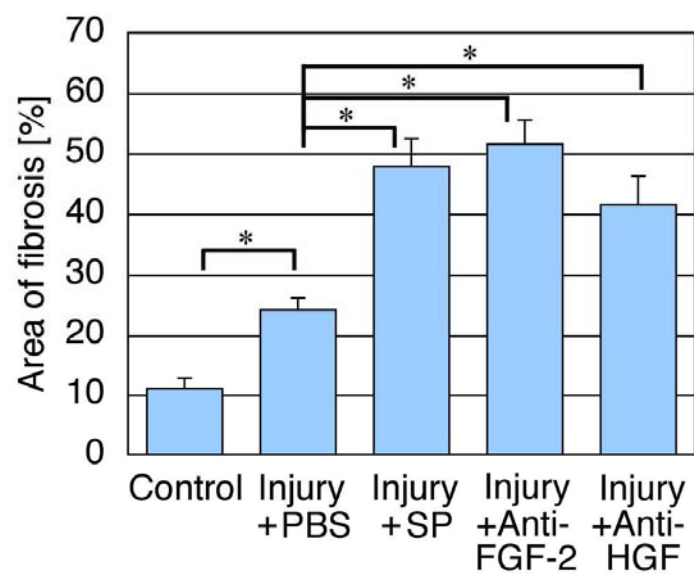
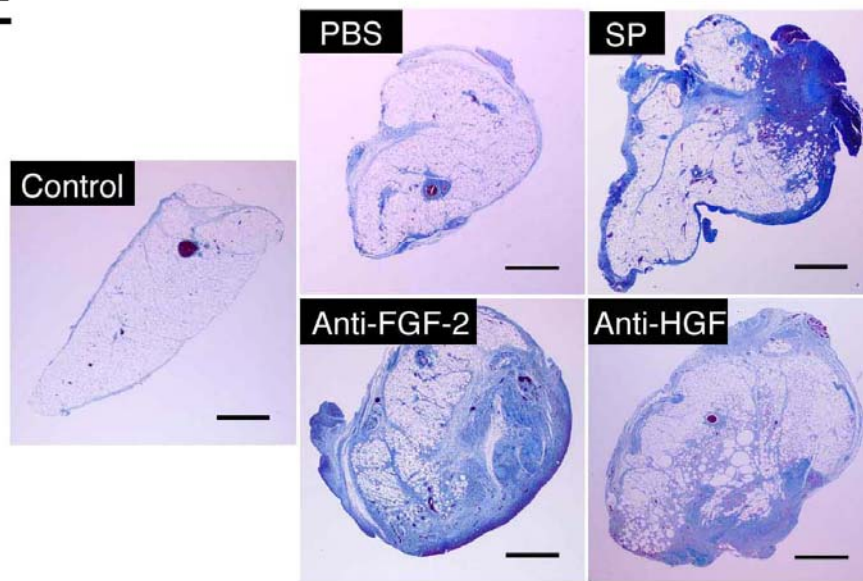


図 1 1 : 続き

(E) アザン染色による線維化の評価。虚血再灌流障害の治癒後（14日後），線維化面積は平常時の10%から23%に増加していた。この線維化の程度が，JNK 阻害剤，FGF-2 中和抗体，HGF 中和抗体により有意に増加していた。（ $n = 6$, $* p < 0.05$ ） Scale bars = 1 mm.

略号：SP = JNK 阻害剤 SP600125

考察

ヒトの脂肪組織に機械的な損傷が加わると、FGF-2、EGF、PDGF、形質転換増殖因子 β (transforming growth factor- β) (以下 TGF- β) がまず創傷治癒過程の早期に分泌される。そして、これらが徐々に減少するにつれて、VEGF や HGF が創傷後 1 週の間徐々に増加してくる [23]。今回の研究により、これらの創傷に関連した細胞増殖因子の中で、FGF-2 が主に JNK 経路を介して ASCs の増殖および HGF 分泌を促進することが判明した。FGF-2 は血管新生 [29] や細胞増殖 [30] を促進する重要な因子であり、創傷治癒においては早期の段階で放出されることが知られている [31, 32]。FGF-2 は創周囲の線維芽細胞 [33] や血管内皮細胞 [34] が崩壊するときに放出されるだけでなく、細胞外基質に結合していたものが様々な創傷関連蛋白分解酵素の働きによって放出されるという機序も報告されている [35, 36]。JNK 経路は、今回の研究で明らかになったように FGF-2 によって誘導される ASCs の増殖に関与しているだけでなく、PDGF によって誘導される ASCs の増殖および遊走にも関与していることが知られている [19]。したがって、今回の研究で使用した JNK 阻害剤が、FGF-2 と PDGF の両方の働きを抑制している可能性が高い。しかし、PDGF は ASCs の増殖こそ促進したものの、HGF の発現に関しては有意な効果を示さなかった。むしろ、HGF の発現に関しては、他家の報告にあるように、FGF-2 と EGF が促進効果を持つとされており [6]、EGF によって誘導される HGF 発現にも JNK 経路が関与している可能性がある。ASCs 以外の細胞を用いた研究では、JNK 経路が HGF のシグナル伝達にも関与しているという報告があるが [37, 38]、今回の研究では、HGF はたとえ高濃度であっても ASCs における JNK 経路を活性化していなかった。また、FGF-2 による HGF 発現亢進が二峰性であったことから示唆されるように、JNK 経路以外の経路が複雑なネットワークを形成しながら関与している可能性も否定できない。

興味深いのは、ASCs で認められた FGF-2 による増殖促進および HGF 分泌促進が、

骨髓由来間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞などにおいても認められたということである。他家の報告では、関与するシグナル伝達経路の解明こそなされていないものの、平滑筋細胞 [39]、肺組織由来線維芽細胞様細胞 [40]、骨芽細胞 [41] などにおいても FGF-2 による HGF の発現亢進が起こるとされている。また、HGF はインターロイキン 1 [42]、インターフェロン γ [43]、アスコルビン酸 [44] などの FGF-2 以外の因子によってもその産生が促進される。HGF は血管新生や創傷治癒の主要な仲介役として働いており、その発現は様々な細胞や組織において、多くの因子によって調整されているようである。

脂肪組織における創傷やその治癒過程についてはこれまであまり研究がなされてこなかったが、その原因として標準的な動物モデルが存在しなかったことが挙げられる。Coban らは我々とは別の動物モデル（上腹部皮弁）を用いて脂肪組織の虚血再灌流障害について観察し、浮腫や出血が認められたと、我々と同様の結果を報告している [45]。我々の開発したモデルも非常に再現性が高く、脂肪組織における創傷およびその治癒過程を研究する上で有用な動物モデルになりうると考えられた。しかし、今回用いたモデルはあくまで虚血再灌流障害のモデルであり、創傷治癒全般を体現できている訳ではないことは留意すべきである。損傷を受けた脂肪組織においては、浮腫や出血に引き続いてネクロシスやアポトーシスが早い段階で認められ、その後は貪食や細胞浸潤、細胞増殖などの炎症および再生変化が 1 週間を通して認められた。ネクロシスは血管内皮細胞や脂肪細胞において認められ、脂肪組織のリモデリングが起こっていると考えられた。また、その再生過程は JNK 阻害剤によって阻害を受けることから、JNK 経路の重要性が示唆された。一方、HGF は、損傷を受けた組織から放出される FGF-2 に遅れる形でその発現が上昇していた。脂肪組織に含まれる間葉系細胞の半分以上を ASCs が占める [26] ことを考えると、この HGF の発現亢進は、主に FGF-2 の刺激を受けた ASCs によって JNK 経路を介してもたらされていると考えられた。

脂肪組織においては、通常の状態でも、ASCs と考えられる CD34 陽性／CD31 陰性細胞が血管の周囲を中心に豊富に存在している。血管壁には内皮細胞に分化して毛細血管の伸長を形成できる CD34 陽性の前駆細胞が存在しているという報告 [46] や、ASCs には血管周細胞の性質があるという報告 [4] があることを考えると、ASCs は単なる脂肪の前駆細胞なのではなく、多様性を持った細胞集団であるといえる。そして、それがゆえに、*in vivo* における ASCs の性質や機能を解明していくのは複雑で難しい作業になる。以前から指摘されているように、脂肪新生と血管新生には密接な関係があり、ASCs はその両者の前駆細胞として働いている可能性がある [8]。また、肥満においては、ASCs が脂肪細胞、血球細胞、血管との相互作用を調整する役割を果たしているとされている [28]。今回の研究では、脂肪組織の創傷治癒過程において CD34 陽性／CD31 陰性細胞が通常よりも多く認められ、さらに BrdU 陽性の増殖細胞の多くが CD34 陽性／Lectin 陰性であることから、ASCs が増殖しながら創傷治癒過程で重要な働きをしていることが示唆された。また、このような ASCs の働きが JNK 阻害剤によって強く阻害され、その結果として治癒の遅延や線維化の増加が認められたことから、JNK 経路の重要性も示唆された。脂肪組織における重要な細胞としては、マクロファージも注目されている。肥満の脂肪組織においてはマクロファージの集積を伴う慢性炎症が認められ、これが動脈硬化や糖尿病などの肥満に関連する全身的な疾患につながっているとされている [28, 47-49]。今回の研究では、CD68 陽性のマクロファージが創傷後 3 日目をピークとして小型脂肪細胞の周囲に集簇している像が認められた。脂肪組織の創傷治癒過程におけるマクロファージの役割については更なる解明が待たれるが、壊死した脂肪細胞の貪食に関与していることが示唆された。

HGF は心臓 [25]、肝臓 [50]、腎臓 [51] などの様々な臓器において線維化抑制作用を持つことが知られている。近年の研究により、HGF の線維化抑制作用は、Smad シグナル伝達経路を阻害して TGF- β の働きを抑制することによってもたらされることが分か

ってきた [51, 52]。今回の研究では、FGF-2 や JNK を阻害することによって ASCs からの HGF 産生が抑制され、更に治癒後の線維化が増加した。また、この線維化の増加は、HGF を直接阻害した場合でも同様に認められた。これまではその重要性が指摘されてこなかったが、HGF は脂肪組織の創傷治癒過程において線維化を抑制する重要な働きをしているといえる。また、この HGF は、創傷部位から放出される FGF-2 が JNK を介して ASCs を刺激することによってその分泌が促進されているようである。FGF-2 は線維芽細胞や血管内皮細胞に対する直接的な作用によって創傷治癒を促進すると考えられてきたが [53]、今回の研究で明らかになったように、ASCs や線維芽細胞の HGF 分泌を促進するといういわば間接的な作用も重要と考えられる。HGF は線維化抑制作用のみならず血管新生作用も持っており [54]、ASCs から分泌される HGF が脂肪組織における血管新生 [55] や虚血下肢における血流の改善 [56] に貢献しているという報告がある。また、低酸素によって ASCs からの VEGF 分泌が促進されるという報告もある [5]。今回の研究でも、創傷治癒過程における血管新生の観点からいくつかの検討を行ったが、血管密度の変化や VEGF の発現亢進は認められなかった。その理由として、今回用いた動物モデルがあくまで創傷のモデルであり、血管新生を促すような虚血あるいは低酸素のモデルではないことが挙げられる。脂肪組織の血管新生を研究するには、慢性的な虚血あるいは低酸素を引き起こすような新たな動物モデルが必要になると思われる。

最後に、創傷治癒過程における ASCs の役割についてまとめる。創傷治癒過程においては、まず、血小板や炎症細胞から分泌された TGF- β が線維芽細胞に作用し、Smad を介して α アクチンを発現する筋線維芽細胞に形質転換させ、線維化を進める経路がある [23, 51]。一方で、今回の研究で明らかになったように、死細胞や細胞外基質から分泌された FGF-2 が ASCs に作用し、JNK を介して増殖や HGF 発現を促進させるという別の経路がある。HGF には上皮化や血管新生、アポトーシス抑制の作用があり、ASCs 自体は脂肪細胞

や血管内皮細胞に分化するため、後者は再生の経路といえる。そして、この再生の経路で分泌される HGF がもう一方の線維化の経路を抑制していると考えられる（図 12）。

今後の展望としては、ASCs から分泌される HGF の線維化抑制作用に期待して、ケロイド、肥厚性瘢痕、肺線維症、肝硬変、心筋梗塞などの多岐にわたる線維性疾患に対して ASCs を投与する細胞治療が想定される。そして、その際には、ASCs をあらかじめ FGF-2 で前処置したり、ASCs と同時に FGF-2 も投与したりすることにより、HGF を介した治療効果が高まることが期待される。ASCs は骨髄由来間葉系幹細胞と比較して、その採取が容易であり、また、採取できる細胞数も多く、細胞治療の細胞源としては大きなメリットを有している [57]。今後は、その投与方法、安全性などを検討しながら、実際の臨床応用へ向けた進歩がなされることが期待される。

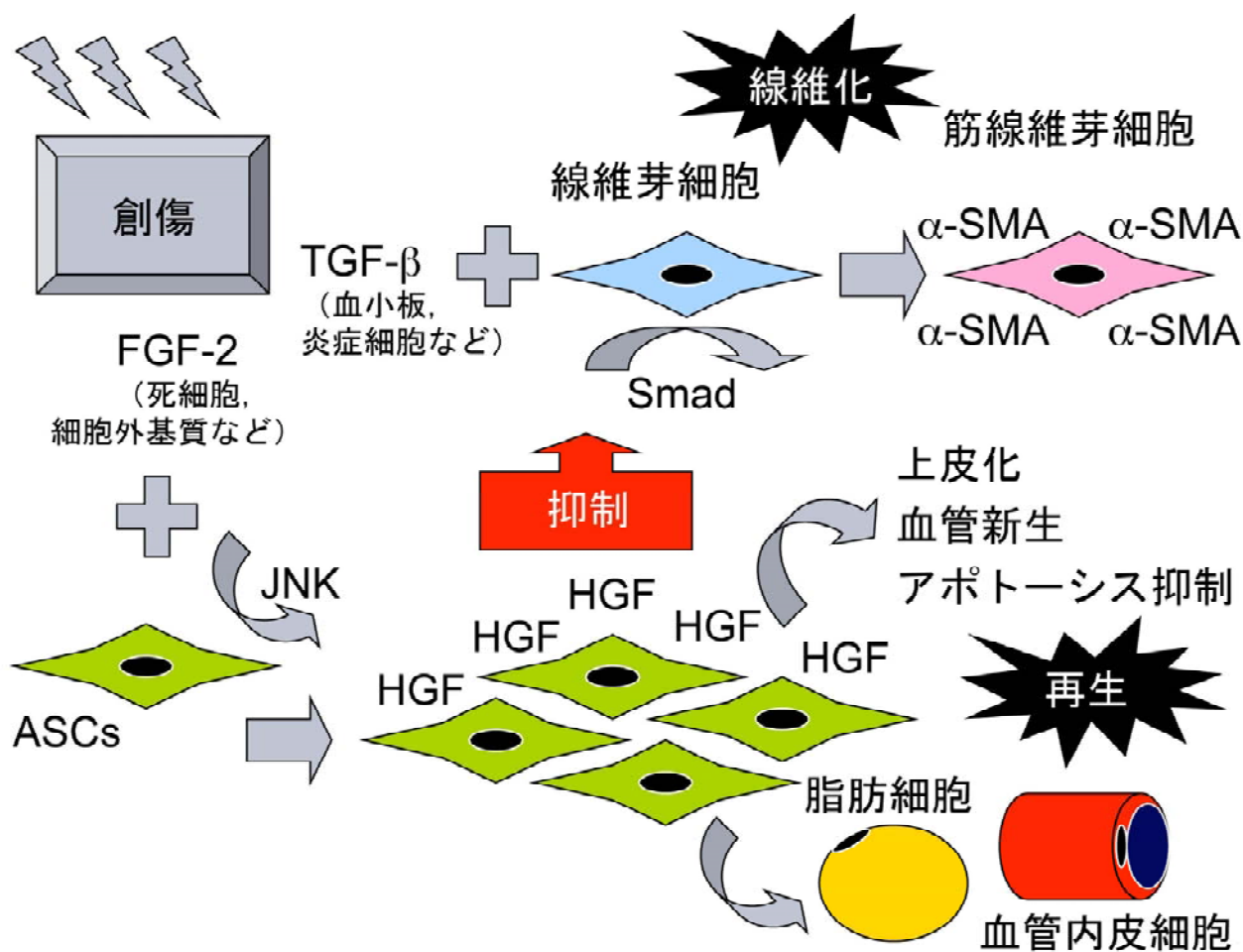


図 1 2 : 創傷治癒過程における ASCs の役割

TGF-βが線維芽細胞に作用し、Smad を介してαアクチンを発現する筋線維芽細胞に形質転換させ、線維化を進める経路がある。一方で、 FGF-2 が ASCs に作用し、JNK を介して増殖や HGF 発現を促進させるという再生の経路がある。そして、再生の経路で分泌される HGF がもう一方の経路である線維化を抑制している。

参考文献

1. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295, 2002.
2. Rodeheffer MS, K Birsoy and JM Friedman. Identification of white adipocytes progenitor cells in vivo. *Cell* 135: 240-249, 2008
3. Tang W, D Zeve, JM Suh, D Bosnakovski, M Kyba, RE Hammer, MD Tallquist and JM Graff. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322: 583-586, 2008.
4. Traktuev D, Merfeld-Clauss S, Li J, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 102: 77-85, 2008.
5. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292-1298, 2004.
6. Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* 212: 702-709, 2007.
7. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2542-2547, 2005.
8. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109: 656-663, 2004.
9. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110: 349-355, 2004.
10. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 12: 459-465, 2006.
11. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse.

J Exp Med 201: 1397-1405, 2005.

12. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng* 12: 3375-3382, 2006.
13. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg* 32: 370-373, 2004.
14. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D, et al. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 48: 1416-1423, 2005.
15. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, et al. Cell-assisted lipotransfer (CAL) for cosmetic breast augmentation –supportive use of adipose-derived stem/stromal cells–. *Aesthetic Plast Surg* 32: 48-55, 2008.
16. Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 644-652, 2006.
17. Quarto N, Longaker MT. FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state. *Tissue Eng* 12: 1-14, 2006.
18. Kakudo N, Shimotsuma A, Kusumoto K. Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 359: 239-244, 2007.
19. Kang YJ, Jeon ES, Song HY, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 95: 1135-1145, 2005.
20. Suga H, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. *Cytotherapy* 9: 738-745, 2007.
21. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 410: 37-40, 2001.

22. Wang M, Crisostomo PR, Herring C, et al. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-1 in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R880-R884, 2006.
23. Aiba-Kojima E, Tsuno NH, Inoue K, et al. Characterization of wound drainage fluids as a source of soluble factors associated with wound healing: Comparison with platelet-rich plasma and potential use in cell culture. *Wound Repair Regen* 15: 511-520, 2007.
24. Akita S, Akino K, Imaizumi T, et al. A basic fibroblast growth factor improved the quality of skin grafting in burn patients. *Burns* 31: 855-858, 2005.
25. Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, et al. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest* 106: 1511-1519, 2000.
26. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 208: 64-76, 2006.
27. Suga H, Matsumoto D, Inoue K, et al. Numerical measurement of viable and nonviable adipocytes and other cellular components in aspirated fat tissue. *Plast Reconstr Surg* 122: 103-114, 2008.
28. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 56: 1517-1526, 2007.
29. Montesano R, Vassalli JD, Baird A, et al. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7297-7301, 1986.
30. Nissen NN, Polverini PJ, Gamelli RL, et al. Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. *Surgery* 119: 457-465, 1996.
31. Cordon-Cardo C, Vlodavsky I, Haimovitz-Friedman A, et al. Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab Invest* 63: 832-840, 1990.
32. Schulze-Osthoff K, Risau W, Vollmer E, et al. In situ detection of basic fibroblast growth factor

- by highly specific antibodies. *Am J Pathol* 137: 85-92, 1990.
33. Takimiya M, Saigusa K, Aoki Y. Immunohistochemical study of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression for age determination of cutaneous wound. *Am J Forensic Med Pathol* 23: 264-267, 2002.
 34. Muthukrishnan L, Warder E, McNeil PL. Basic fibroblast growth factor is efficiently released from a cytosolic storage site through plasma membrane disruptions of endothelial cells. *J Cell Physiol* 148: 1-16, 1991.
 35. Bashkin P, Doctrow S, Klagsburn M, et al. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry* 28: 1737-1743, 1989.
 36. Ishai-Michaeli R, Eldor A, Vlodavsky I. Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. *Cell Regul* 1: 833-842, 1990.
 37. Mori S, Matsuzaki K, Yoshida K, et al. TGF- β and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* 23: 7416-7429, 2004.
 38. Rush S, Khan G, Bamisaiye A, et al. C-jun amino-terminal kinase and mitogen activated protein kinase 1/2 mediate hepatocyte growth factor-induced migration of brain endothelial cells. *Exp Cell Res* 313: 121-132, 2007.
 39. Onimaru M, Yonemitsu Y, Tanii M, et al. Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. *Circ Res* 91: 923-930, 2002.
 40. Roletto F, Galvani AP, Cristiani C, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates hepatocyte growth factor/scatter factor secretion by human mesenchymal cells. *J Cell Physiol* 166: 105-111, 1996.
 41. Blanquaert F, Delany AM, Canalis E. Fibroblast growth factor-2 induces hepatocytes growth factor/scatter factor expression in osteoblasts. *Endocrinology* 140: 1069-1074, 1999.

42. Matsumoto K, Okazaki H, Nakamura T. Up-regulation of hepatocyte growth factor gene expression by interleukin-1 in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 235-243, 1992.
43. Takami Y, Motoki T, Yamamoto I, et al. Synergistic induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by the inflammatory cytokines interleukin-1 and interferon- γ . *Biochem Biophys Res Commun* 327: 212-217, 2005.
44. Wu YL, Gohda E, Iwao M, et al. Stimulation of hepatocyte growth factor production by ascorbic acid and its stable 2-glucoside. *Growth Horm IGF Res* 8: 421-428, 1998.
45. Coban YK, Kurutas EB, Ciralik H. Ischemia-reperfusion injury of adipofascial tissue: An experimental study evaluating early histologic and biochemical alterations in rats. *Mediators Inflamm* 5: 304-308, 2005.
46. Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 133:1543-1551, 2006.
47. Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808, 2003.
48. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-1830, 2003.
49. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46: 2347-2355, 2005
50. Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 5: 226-230, 1999.
51. Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: Therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: 7-16, 2004.
52. Yang J, Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction. *Am J Pathol* 163: 621-632, 2003.
53. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, et al. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*

18: 26-45, 1997.

54. Conway K, Price P, Harding KG, et al. The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing. *Wound Repair Regen* 14: 2-10, 2006.
55. Bell LN, Cai L, Johnstone BH, et al. A central role for hepatocyte growth factor in adipose tissue angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E336-E344, 2008.
56. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, et al. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells* 25: 3234-3243, 2007
57. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100: 1249-1260, 2007.

謝辞

本研究において、研究の立案から、実験手技、論文執筆まで、様々な面においてご指導、ご鞭撻をいただきました東京大学医学部形成外科の吉村浩太郎先生に深く感謝の意を表します。また、東京大学医学部形成外科の光嶋勲先生には、当教室の教授として研究にご理解、ご支援をいただきました。東京大学医学部循環器内科の真鍋一郎先生および西村智先生には、実験手技や研究内容について貴重なご意見をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

研究室で共に仕事をしてまいりました東京大学医学部形成外科の権太浩一先生、小島恵美子先生、松本大輔先生、井上啓太先生、江藤ひとみ先生、青井則之先生、加藤晴之輔先生には、カンファランスや抄読会、そして実際の実験において様々なアドバイスやご協力をいただきました。また、株式会社バイオマスターの重浦智邦氏、実験助手の倉田綾子氏には、多岐にわたる実験において多大なるご協力をいただきました。改めて感謝の意を表したいと思います。