

# 博士論文

論文題目 脂肪組織移植後の組織再構築に関する研究

氏名 土居 健太郎

脂肪組織移植後の組織再構築に関する研究

指導教官 光嶋 勲

東京大学院医学系研究科

医学博士課程 外科学専攻

平成22年4月入学

土居 健太郎

## 目次

略語	3
要旨	4
序文	5
方法	
マウス交換移植モデル	9
マウス骨髄移植モデル	10
マウス骨髄移植-自家脂肪移植モデル	10
ホールマウント染色	11
免疫組織化学	11
間質血管細胞群の分離	12
フローサイトメトリーと結果の評価	12
SVF 細胞からの ASCs 培養	13
統計解析	14

## 結果

交換移植モデルの安定性	15
脂肪移植におけるホスト由来細胞の挙動	17
移植後成熟脂肪細胞の由来	24
移植後血管壁構造の由来	26
移植後毛細血管及び血管内皮細胞の由来	28
移植後 ASCs の由来	35
考察	38
参考文献	43
謝辞	49

## 略語

ASCs	Adipose derived Stem Cells	(脂肪由来幹細胞)
B6 マウス	C57BL/6 マウス	
B6→GFP	交換移植モデルのうち B6 マウスの脂肪を GFP マウスへ移植したもの	
BMT	Bone Marrow Transplant model	(骨髄移植モデル)
BMT-LT	Bone Marrow Transplanted-auto Lipo Transfer model	(骨髄移植-自家脂肪移植モデル)
GFP	Green Fluorescence Protein	
GFP マウス	C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウス	
GFP→B6	交換移植モデルのうち GFP マウスの脂肪を B6 マウスへ移植したもの	
Lectin	Isolectin GS-IB <sub>4</sub>	
SDF-1	Stromal cell derived factor 1	
SVF	Stromal Vascular Fraction	(間質血管細胞群)

## 要 旨

脂肪移植生着過程におけるドナー細胞・ホスト骨髄／非骨髄細胞の役割を解明するために実験を行った。ホスト細胞は初期に90%以上、12週では約60%がマクロファージであった。最終的にドナー細胞は成熟脂肪細胞、血管壁細胞、血管内皮細胞、ASCsに、ホスト骨髄細胞は血管壁細胞、血管内皮細胞、ASCsに、ホスト非骨髄細胞は血管壁細胞、ASCsを構成していた。本研究により脂肪移植は移植物に含まれる体性幹細胞のみならず、ホストの骨髄／非骨髄由来の体性幹細胞を遊離、定着させていることが判明した。今後更に研究を進める事で脂肪移植に関わる体性幹細胞の挙動をコントロールできれば、本研究結果は様々な組織再生治療へ応用可能と考える。

## 序 文

形成外科領域の軟部組織再建方法には主に脂肪移植術、血管吻合を伴う遊離組織移植術、人工物を用いた再建術が挙げられる。血管吻合を伴う遊離組織移植術に比べ手術時間が短く、比較的簡便で、ドナー部・レシピエント部共に侵襲が少ないことなどから、また人工物に比べより生理的であり、長期の合併症が少ないことなどから、脂肪移植は有力な再建方法として注目されている。実際に 2009 年には世界で 50 万件以上の脂肪移植が行われた(1)。しかし、現在の術式では生着率・効果や合併症といった手術結果のばらつきが大きく、手術者の技量による差も大きい。そのため脂肪移植術のさらなる改良、標準化が望まれている。

脂肪組織は多種多様な細胞により構成されているが、脂肪由来幹細胞(Adipose derived stem/progenitor cells) (以下 ASCs) を含む事が知られている。ASCs は成人組織に存在する体性幹細胞の一種である。これまでの研究によって ASCs は成熟脂肪細胞を含む間葉系細胞への多分化能を持つばかりでなく、内胚葉・外胚葉系への分化能が有ること、傍分泌による免疫調整能が有ることなどが報告されている (2-6)。また、間葉系幹細胞の代表例である骨髄由来幹細胞と比べ、ASCs は比較的採取が容易で、含まれる幹細胞の割合が高い事が知られている (7)。こうした理由から ASCs は再生医療における細胞源として形成外科領域以外でも注目を集めている。実際に、脂肪移植術としては放射線障害、声帯障害、慢性潰瘍など、軟部組織増大という従来の目的を超えて治療適応を拡大し(8-11)、ASCs を細胞利用した臨床応用として骨欠損、軟骨欠損、慢性潰瘍、放射線

潰瘍、クローン病、多発性硬化症、移植片対宿主病、尿失禁、心筋梗塞などの報告がみられる(12, 13)。

これまでの研究から ASCs が分裂・遊走・分泌・分化することにより脂肪組織のリモデリング過程に深く関与する事がわかっており(14-16)、ASCs による脂肪移植術の改善の試みも行われている。脂肪組織は通常脂肪吸引術で採取されるが、この吸引脂肪中の ASCs は正常組織と比較して約半数と少ない(7)。そこで、吸引脂肪中の ASCs を増やし、生理的な状態に近づける事による脂肪移植の改善が検討されている。吸引脂肪を遠心分離することで ASCs を濃縮する方法や、脂肪の酵素処理によって得られる ASCs を含む間質血管細胞群を培養後もしくは培養せずに付加する方法などが、基礎実験及び臨床試験において検証されている(17-20)。

当研究室ではこれまでに脂肪移植術における細胞動態一部を明らかにしてきた。脂肪組織中の細胞はその種類によって虚血に対する耐性が異なり、ASCs、血管内皮細胞、脂肪細胞、血球系細胞を比較すると、ASCs が最も虚血に対して強い(16)。細胞種による虚血耐性の違いは移植脂肪組織の生着過程にも関わっており、細胞の生着様式により移植脂肪は3つの領域に分けられる事が判明した(16)。外表から順に生着領域、再生領域、壊死領域である(図1)。



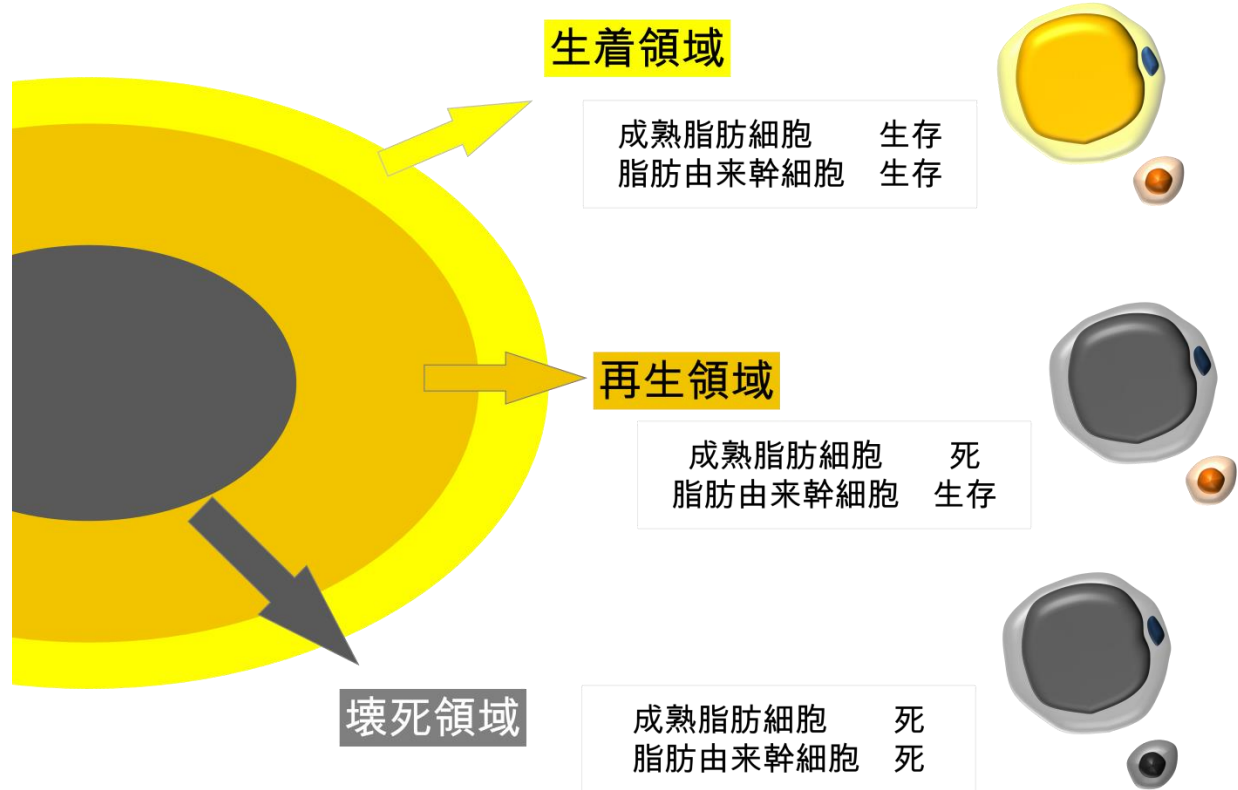


図 1 : 移植脂肪の生着過程に関する 3 領域

成熟脂肪細胞及び脂肪由来幹細胞の生死によって移植後の生着過程が異なる。これらの領域は移植後数日で決定される。生着領域は移植脂肪組織の中で最も環境の良い領域であり、成熟脂肪細胞を含めて多くの細胞が生存している。再生領域は移植床の状態によって範囲が大きく変化する。表層より 300 $\mu$ m から 500~1500 $\mu$ m を占める。成熟脂肪細胞は細胞死し、脂肪由来幹細胞は生存している。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。幹細胞も細胞死しているために組織再生は行われない

生着領域は最も外表で、移植した脂肪細胞及び ASCs が共に生存する。続く再生領域は脂肪細胞が死に至り、ASCs が生存する領域である。再生脂肪細胞と考えられる小型脂肪細胞 (<30 μm) が最も多く観察されるのがこの再生領域である。再生脂肪細胞は移植4週をピークに8週で一定になる(21)。つまり、移植後12週の時点では移植脂肪細胞の再生過程は完了していると考えられる。最も内側が壊死領域で、ここでは脂肪細胞、ASCs 共に死に至り、組織再生は行われぬ。

以上の様に移植脂肪の生着過程には多様な細胞が関わっているが、それぞれの細胞の起源（細胞腫、ドナー・ホストの別）について詳細に解析した研究はない。ASCs を細胞として用いた局所注入治療が骨髄由来細胞（骨髄由来幹細胞、血管内皮前駆細胞、他）のモビライゼーション及びホーミングを促すことが指摘されており(22)、脂肪移植後のリモデリングにおいても骨髄由来細胞が深く関与している可能性も否定できない。実際に生理的状態や高脂肪食下では骨髄由来 ASCs が少数(<5%)存在することが報告されており(23, 24)、脂肪組織内の ASCs は骨髄由来幹細胞などの骨髄から供給されている可能性がある(25)。

本研究では、脂肪移植の動物モデルを作成し、そのリモデリング過程に関わる細胞の起源、細胞腫と機能の解明を試みた。ホスト骨髄由来、ホスト非骨髄由来、ドナー由来の3種類の起源に分類し、脂肪組織中の成熟脂肪細胞、血管壁細胞、血管内皮細胞、ASCs についてその細胞の由来の検討を行った。脂肪移植後の治癒リモデリング過程における細胞動態を詳細に解明することが、脂肪移植術及び脂肪組織由来の細胞を用いた治療の最適化、適応拡大や新規治療法の開発につながると思われる。

## 方 法

### マウス 交換移植モデル

以下全ての動物は日本 SLC (静岡)より購入した。また、動物実験の際の動物管理は東  
京大学が定めるガイドラインに沿って行われた (承認番号 : 医 P11-002、医 P10-045、  
医 P10-046) 。

9 週齢メスの C57BL/6 マウス (B6 マウス) と 9 週齢メスの C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)  
mice (GFP マウス) をペントバルビタールの腹腔内投与 (50 mg/kg 体重) で麻酔し、  
鼠径脂肪を採取した。採取した鼠径脂肪を相互に交換移植を行った。後頭部に 3mm 皮  
膚切開し、移植範囲を剥離、鼠径脂肪を挿入後に 7-0 ナイロン糸で皮膚縫合を行った。  
同モデルは当研究室ですでに確立されている ICR マウスを用いた自家脂肪移植モデル  
に準ずるものである(16)。また、B6 マウスと GFP マウスは同系統であり、免疫反応は  
無視することができる。B6 マウスの鼠径脂肪を GFP マウスへ移植したモデルを  
B6→GFP、GFP マウスの鼠径脂肪を B6 マウスへ移植したモデルを GFP→B6 と命名し  
た。移植後 0,1,4,12 週後にマウスの総体重を測定後、移植検体を回収した。検体は重量  
測定、免疫組織化学染色、ホルマウント染色により解析した。また、12 週の検体に  
ついては更に stromal vascular fraction (SVF : 間質血管細胞群) を採取し、フローサイト  
メトリー及び接着培養を行った。

## マウス骨髄移植モデル(Bone marrow transplant model: BMT)

骨髄由来細胞の挙動を明らかにするため、すでに報告されている方法に準じてマウス骨髄移植モデルを作成した(23)。6週齢、メスの GFP マウスの脛骨及び大腿骨をリン酸緩衝液により洗浄し、GFP 陽性骨髄細胞懸濁液を得た。この GFP 陽性骨髄細胞懸濁液は、赤血球溶血溶液 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) を用いて溶血し、リン酸緩衝液により洗浄を行った。別に用意した6週齢メスの B6 マウスへ致死量(10Gy)の  $\gamma$  線全身照射を行った後、GFP 陽性骨髄細胞懸濁液を尾静脈より注入した ( $2 \times 10^6$  個/マウス)。骨髄移植後6週後に末梢血中の白血球(CD45+細胞)をフローサイトメトリーにより解析し、骨髄変換率 90%以上であることを確認し、次の実験へ使用した。

## マウス骨髄移植-自家脂肪移植モデル

### Bone marrow transplanted auto-lipotransfer model (BMT-LT) :

骨髄移植後8週のマウスをペントバルビタールの腹腔内投与 (50 mg/kg 体重) で麻酔し、鼠径脂肪を採取した。マウス交換移植モデルと同様の手技で、鼠径脂肪を後頭部皮下へ自家移植した。移植後12週にて検体を採取し、免疫組織化学、ホールマウント染色、フローサイトメトリー解析を行った。骨髄移植後に処置を行っていないマウスの鼠径脂肪を骨髄移植後20週にてコントロールとして採取 (BMT)、採取検体より SVF を採取後、フローサイトメトリー解析を行った。

## ホールマウント染色

ホスト由来の毛細血管及び成熟脂肪細胞の評価をホールマウント染色により行った(15, 26)。検体を 3 mm 角の立方体に細切し、下記の蛍光色素と 30 分間室温にて反応させた。蛍光色素：Alexa Fluor 568 もしくは 647 標識の Isolectin GS-IB<sub>4</sub> (Lectin: Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) (血管内皮染色)、Hoechst 33342 (同人科学研究所, 熊本) (核染色)。また、GFP 蛍光は追加染色なしで検出可能であった。検体を洗浄後、TCS SP2 共焦点顕微鏡(Leica, Heerbrugg, Switzerland)を用いて画像解析を行った。1 $\mu$ m 毎の連続画像を撮影し、3 次元画像を再構成した。

## 免疫組織化学

免疫組織化学的手法により成熟脂肪細胞、血壁構造及びマクロファージの評価を行った。採取した脂肪組織は固定後(Zinc Fixative; BD Biosciences, San Diego, CA)、パラフィンに包埋した。6 $\mu$ m の厚さで切片を用意し、下記の一次抗体で免疫染色を行った。一次抗体：ラビット抗 GFP 抗体 (Novus Biologicals, Littleton, CO)、ギネアピッグ抗-Perilipin 抗体 [生きた脂肪細胞マーカー] (PROGEN, Heidelberg, Germany)、ラット抗 MAC-2 抗体(PROGEN, Heidelberg, Germany)、ラット抗 MAC-2 [マクロファージマーカー] (CEDARLANE Laboratories, Burlington, Ontario, Canada)。それぞれの抗体についてアイソタイプ抗体を陰性コントロールとして用いた。一次抗体に合わせて以下の蛍光二次抗体を用いた：Alexa Fluor 488 標識ゴート抗ラビット抗体、Alexa Fluor 568 標識ゴート抗ギネアピッグ抗体、Alexa Fluor 568 標識ゴード抗ラット抗体。血管内皮細胞は

Alexa Fluor 647 標識 Isolectin GS-IB<sub>4</sub> (Lectin: Life Technologies Corporation)を用いた。核染色は Hoechst 33342 を用いた。撮影には蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) もしくは TCS SP2 共焦点顕微鏡(Leica)を用いた。

#### 間質血管細胞群(Stromal vascular fractions: SVF)の分離

採取した脂肪組織を 1mm 角に細切し、0.075% コラゲナーゼ (和光、大阪) 含有のリン酸緩衝液に 30 分間 37°C にて恒温振盪した (15)。細胞溶液は PBS にて洗浄、フィルター処理(100、30 $\mu$ m)、遠心分離(800g、5 分)、赤血球溶血溶液 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) を用いて溶血した。

#### フローサイトメトリーと結果の評価

SVF 細胞の表面抗原についてフローサイトメトリー解析を行い、ドナー/骨髄以外のホスト細胞/骨髄由来細胞の割合を内皮細胞・ASCs について評価を行った。鼠径脂肪 3 個相当量进行处理することで多重染色に必要な細胞量を得ることができ、各 3 回の解析を行った。SVF 細胞はラット抗 CD34 ビオチン抗体 (eBioscience, San Diego, CA) 4°C で 30 分間反応させた。リン酸緩衝液にて洗浄後、次の 2 次抗体及び蛍光標識されたモノクロナル抗体と 4 °C にて 30 分間反応させた。抗体：ラット抗ストレプトアビジン Allophycocyanin (APC)抗体、ラット抗 CD31 fluorescein phycoerythrin (PE) 抗体 (BD Bioscience, San Jose, CA)、ラット抗 CD45 phycoerythrin Cy7 (PE-Cy7) 抗体 (eBioscience)。

GPF の信号は追加染色無しに検出することが可能であった。染色後の細胞は LSR II flow cytometry system (BD Biosciences)を用いて解析を行った。過去の当研究室の結果より、血管内皮細胞は CD45-/CD34±/CD31+、ASCs は CD45-/CD34+/CD31-とした(15, 27)。

コントロールとして実験動物と同週齢の手術操作を行っていない GFP マウス及び B6 マウスの鼠径脂肪を採取し、SVF 細胞について同様の解析を行った。GFP マウス由来の SVF 細胞は本来 GFP 信号が 100%陽性であり、B6 マウス由来の SVF 細胞は本来 GFP 信号が 0%陽性である。本実験で内皮細胞及び ASCs の解析を行った所、それぞれ偽陰性、偽陽性が認められた。下記の計算により結果の補正を行った：

$$\text{最適化データ \%} = 100 \times \frac{(\text{元データ\%} - \text{B6 マウスのGFP\%})}{(\text{GFP マウスのGFP\%} - \text{B6 マウスのGFP\%})}$$

#### SVF 細胞からの ASCs 培養

SVF 細胞をコーティング無しのプラスチック製 6-well プレートに  $8 \times 10^4$  個/well の濃度で播種し、37°C、5%二酸化炭素、湿潤環境で培養した。培養液には M199(GIBCO Invitrogen, Carlsbad, CA)に 10%の fetal bovine serum (FBS)、100 IU ペニシリン、100 mg/ml のストレプトマイシン、5 µg/ml のヘパリン 2 ng/ml の fibroblast growth factor (FGF)-1 を加えたものを使用した。SVF は ASCs の他に白血球や血管内皮細胞等を含むが、継代操作により次第に ASCs 以外の細胞が駆逐される (27, 28)。本研究では 2 継代目の SVF 細胞を ASCs とし、GFP 信号を蛍光顕微鏡下 (Keyence)を用いて観察した。

## 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 Student's t テストを用いた。多群間の比較には Kruskal-Wallis テストにおいて有意差があるものについて Bonferroni 補正を伴う Mann-Whitney U テストを用いた。P 値が 0.05 未満のものについて統計学的に有意とした。



## 結 果

### 交換移植モデルの安定性

交換移植モデルマウスの体重増加は GFP マウスおよび B6 マウスにおいて同様に統計学的に有意な差は認めなかった。検体の重量は成長による変化を補正するために全体重との比（検体重量/全体重）を計算し、検体の生着率の指標とした。検体重量/全体重は B6→GFP、GFP→B6 の両モデル間の差を認めなかった（図 1）。

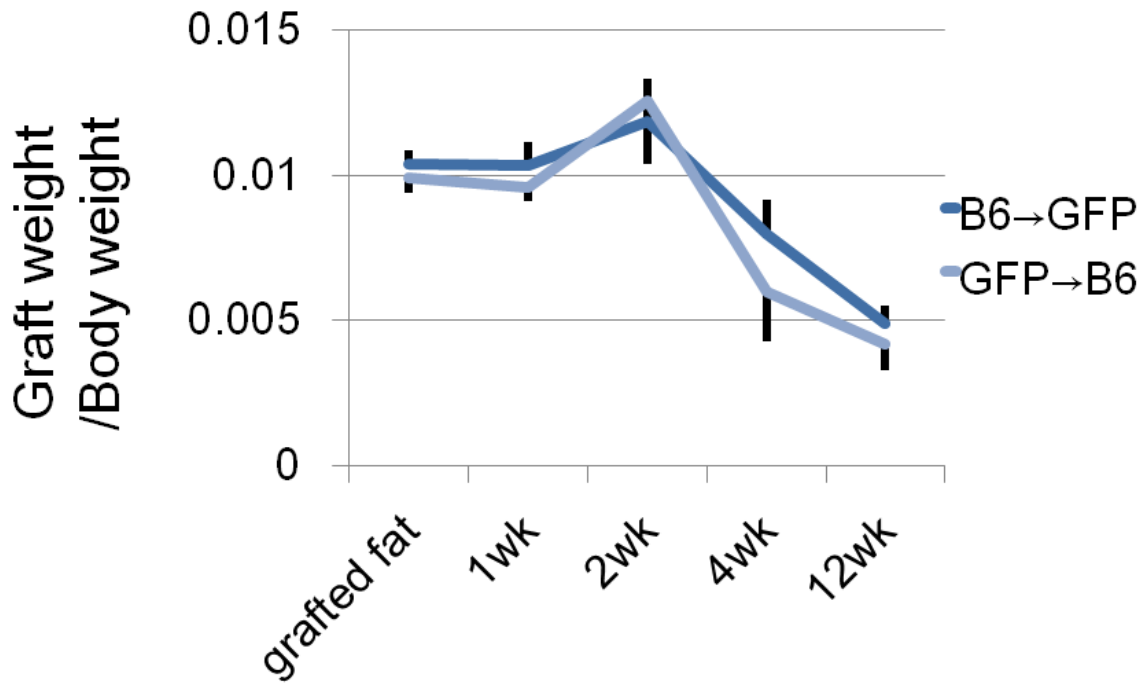


図 1 : 交換移植モデルによる検体重量/全体重の経時的変化

検体重量/全体重を図示する。B6→GFP、GFP→B6の両モデル間の差を認めなかった。(n=3)

## 脂肪移植におけるホスト由来細胞の挙動

B6→GFP モデルの免疫組織化学的検査を行った。このモデルではホスト細胞の局在や性質を GFP 陽性細胞として検出することができる。まず、Perilipin との共染色によりホスト由来の浸潤細胞の局在を明らかにした。移植後 1 週目で Perilipin 陰性領域である最中心部にまで浸潤が認められた。ホスト由来細胞は全期間にわたり主に Perilipin 陰性の領域（再生領域及び壊死領域）に存在していた（図 2）。

1週

B6→GFP

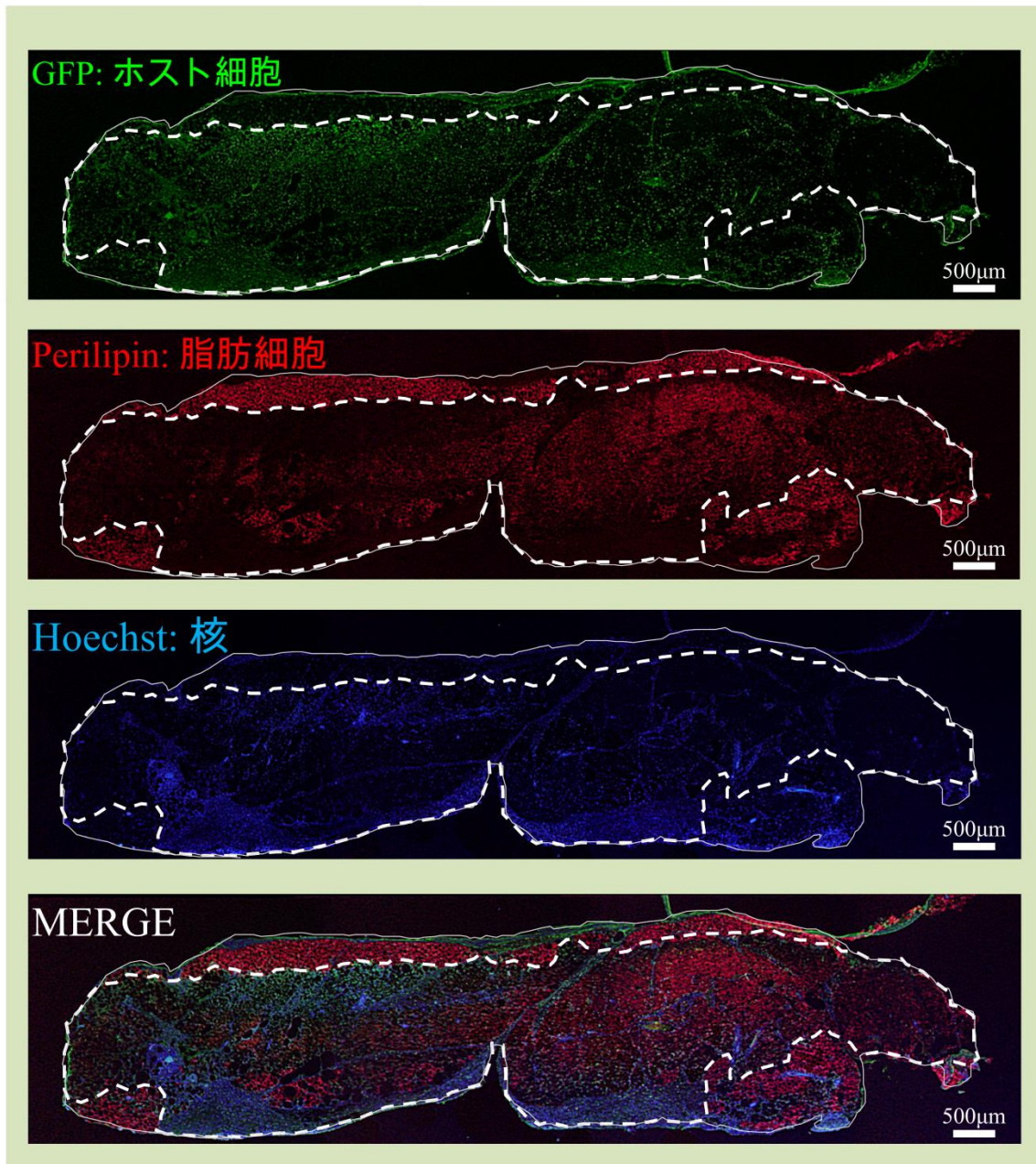



図2：交換移植モデルにおけるホスト由来細胞の浸潤

交換移植モデルのうち B6→GFP モデルについて免疫組織化学的検討を行った。代表的写真を提示する。GFP (ホスト)、Perilipin (生きた脂肪細胞) Hoechst (核染色) の多重染色である。Perilipin 染色の輝度により、生着領域及びそれ以外 (再生領域と壊死

領域)を区別することが可能であった(点線)。ホスト細胞の浸潤は主に **Perilipin** 陰性の再生領域及び壊死領域に観察された。

浸潤した宿主細胞の性質を明らかにするため、移植後 1 週の連続切片についてマクロファージマーカーである Mac2 で染色した。宿主由来細胞は主に Mac2 陽性のマクロファージであった (図 3)。また、死脂肪細胞を取り囲むマクロファージ貪食像である、Crown like structure (29)を観察した (図 3 星印)。生着領域には新生脂肪と考えられる 30 $\mu$ m 以下のドナー由来脂肪細胞が認められ、移植後 1 週でリモデリングが起きている事が確認された (図 3 矢印)

1週  
  
 B6→GFP

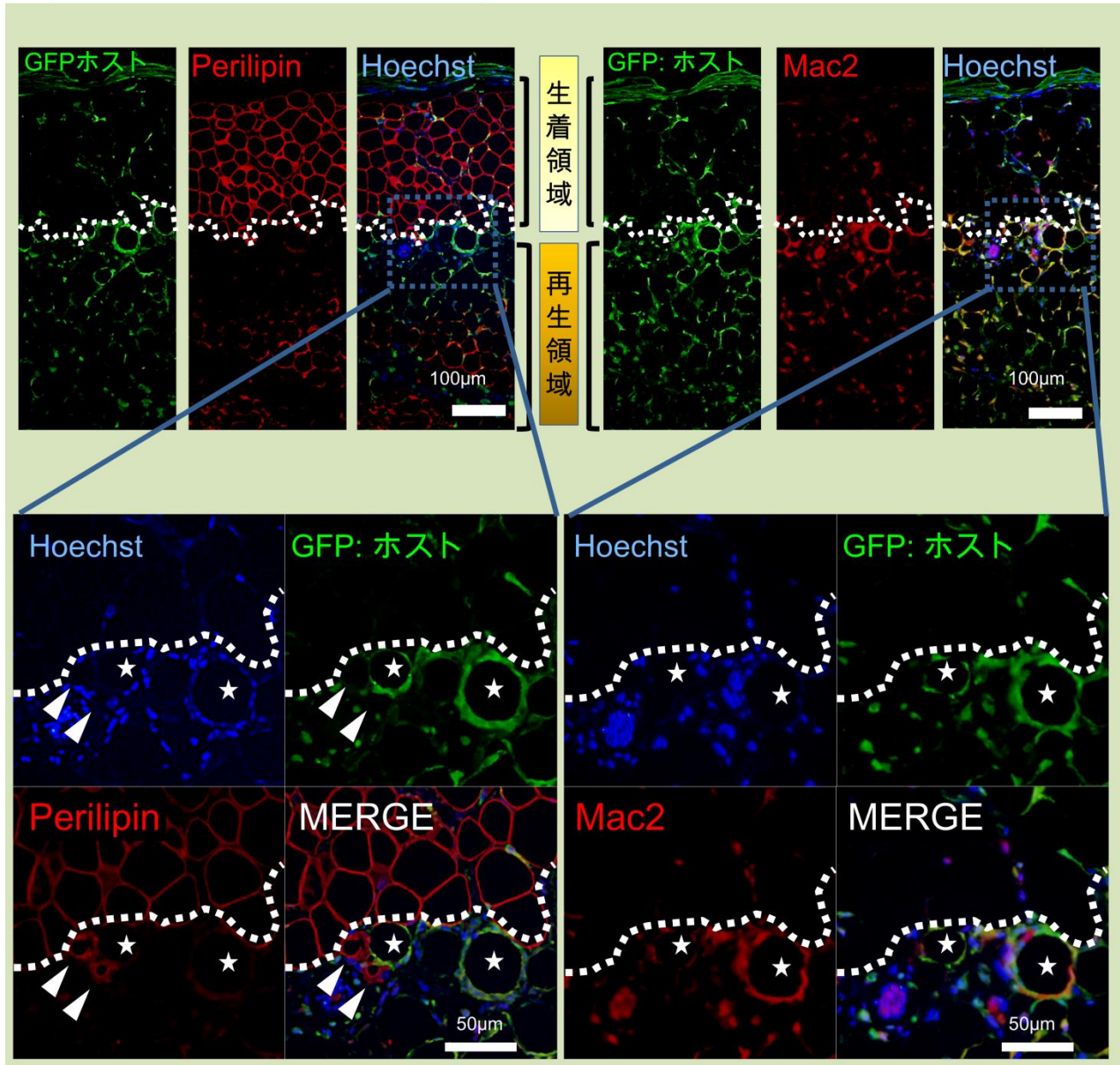


図3：交換移植モデルにおける宿主由来マクロファージの浸潤

交換移植モデルのうち B6→GFP モデルについて免疫組織化学的検討を行った。連続切片染色の代表的写真を提示する。Hoechst（核染色）および GFP 染色に加え、左側は Perilipin、右側は Mac2 の多重染色である。宿主細胞（GFP 陽性細胞）はほとんど Mac2 陽性であった。点線＝生着領域と再生領域の境界。星印=Crown like structure。矢頭：ドナー由来再生脂肪細胞。

宿主由来細胞における Mac2 陽性細胞の割合について定量し、経時的に観察した (図 4)。2 週目をピークに宿主由来細胞の 90% 以上が Mac2 陽性マクロファージであり、次第に減少するものの 12 週においても  $60.2 \pm 4.5\%$  の宿主由来細胞が Mac2 陽性マクロファージであった。以降の実験では 12 週のサンプルを使用し、成熟脂肪細胞、血管壁細胞、毛細血管 (血管内皮細胞)、ASCs についてその由来を検討した。



## MAC2陽性細胞 / 全宿主細胞

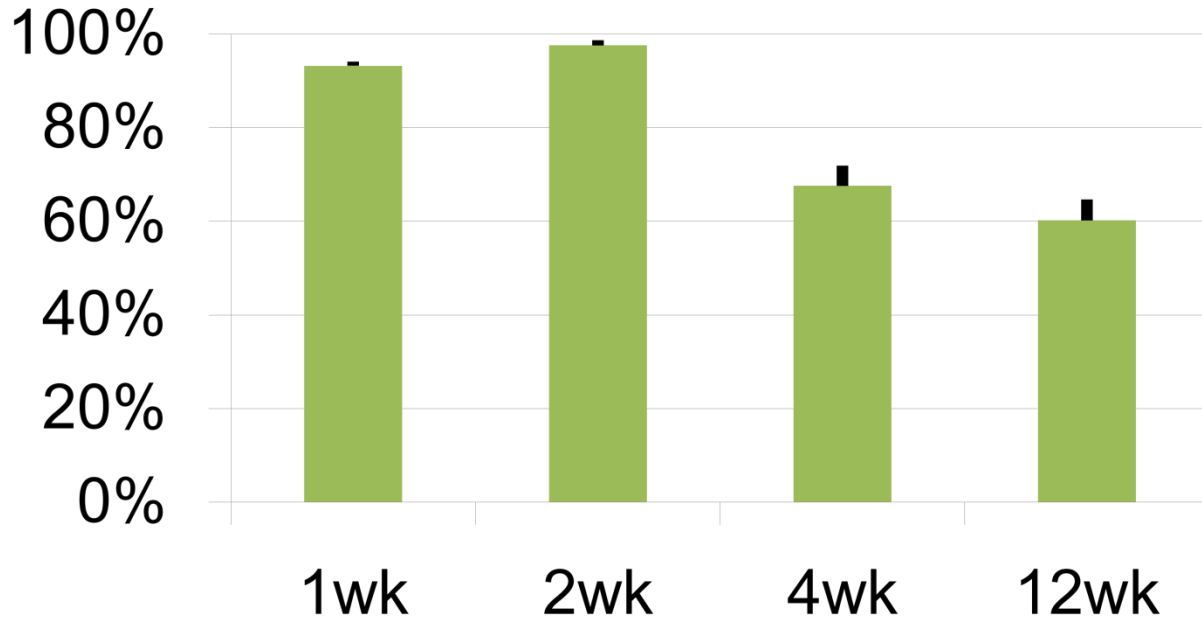


図4：宿主由来細胞中の Mac2 陽性細胞の割合を

宿主由来細胞は主にマクロファージであるが、経時的に減少した。エラーバー：標準誤差。(n=9)

## 移植後成熟脂肪細胞の由来

免疫組織化学染色により、生きた成熟脂肪細胞の評価を行った。Perilipin は生きた成熟脂肪細胞の油滴膜を構成する蛋白である (15)。本研究では Perilipin 信号が強く、円形を呈し、外周のみが陽性の細胞を成熟脂肪細胞とした。

B6→GFP モデルではホスト由来の GFP 陽性細胞は Perilipin の信号とほとんど重ならず (図 5 A)、GFP→B6 モデルではドナー由来の GFP 陽性細胞と Perilipin の信号がほぼ全て重なった (図 5 B)。つまり、両モデルにおいて同様にドナー由来の成熟脂肪細胞が大多数を占めることが示された。ホスト由来の成熟脂肪細胞も稀ではあるが存在したが (図 5 C、D)、提示した画像以外の細胞は検出できなかった。検出頻度が非常に少ないため定量は難しかった。B6→GFP モデルにおいては GFP 陽性の球状構造物をホールマウント染色で検出することが可能であった (図 5 E)。

骨髄移植-自家脂肪移植モデルでは GFP 陽性の骨髄由来細胞が Perilipin 信号と重なる事はなかった (図 5 F)。また、ホールマウント染色においても GFP 陽性の球状構造物は検出することができなかった。

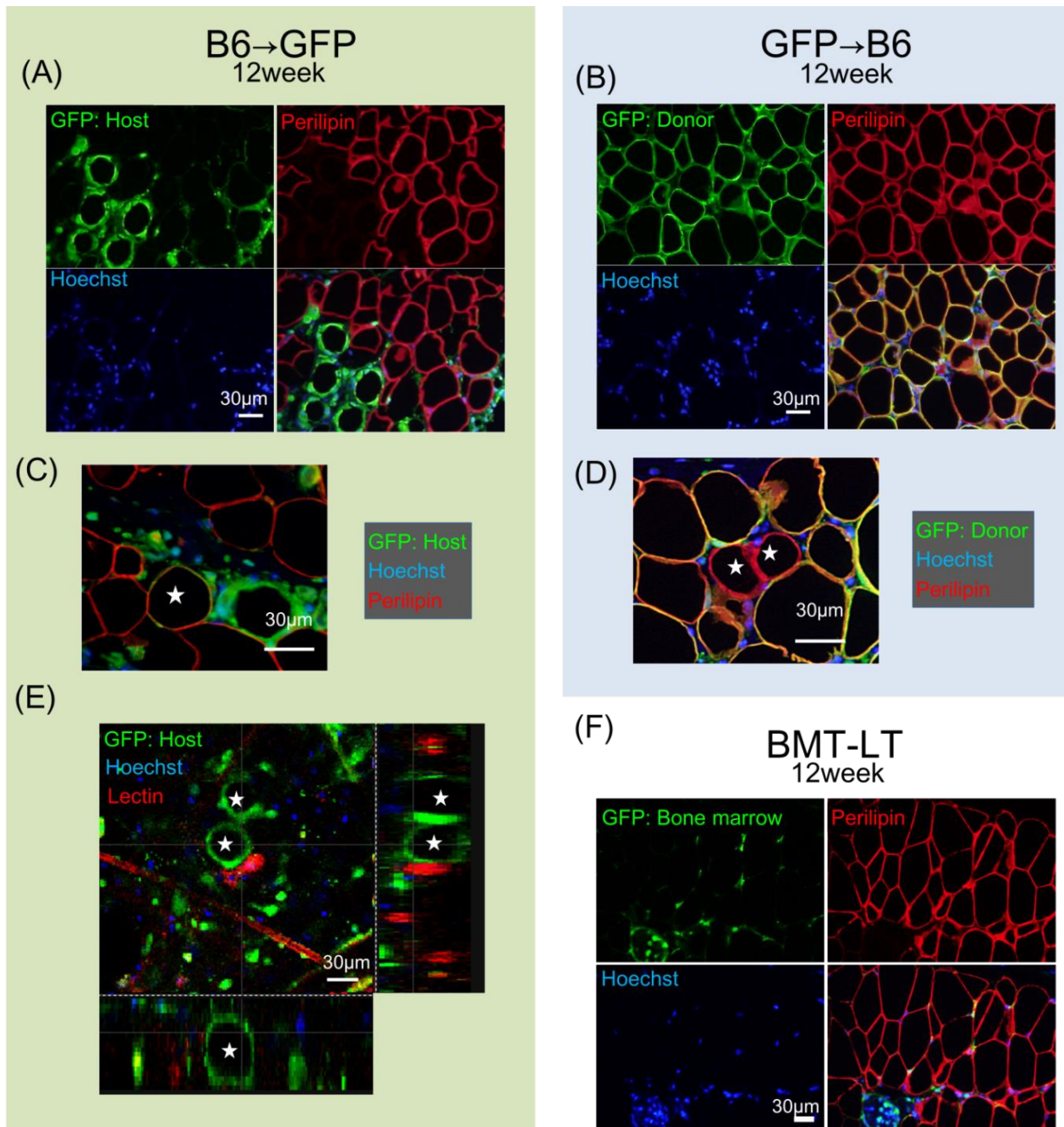


図5：移植後成熟脂肪細胞の由来

免疫組織化学染色の代表的写真を提示する。A~D及びFがパラフィン切片による免疫組織化学染色、Eがホルマウント染色である。全て移植後12週のサンプルで、A、C、Eが交換移植モデルのB6→GFP、B、Dが交換移植モデルのGFP→B6、Fが骨髄移植-自家脂肪移植モデル（Bone marrow transplant-lipo transfer: BMT-LT）である。ほとんどの移植後成熟脂肪細胞はドナー由来であった（A、B）。非常に稀なホスト由来の成熟脂肪細胞も観察可能であった（C、D、E）（星印：ホスト由来成熟脂肪細胞）。しかし、骨髄由来の成熟脂肪細胞は観察できなかった（F）。Bar=30μm。

## 移植後血管壁構造の由来

脂肪移植後の血管壁はフェーズコントラスト像により同定した。免疫組織化学染色と併用することにより GFP 信号を検出した (図 6 A、B)。Hoechst (核染色) 陽性細胞中の GFP 陽性細胞の割合からドナー及びホスト細胞の割合を算出した。ホスト由来細胞の移植後血管壁内構成割合は B6→GFP モデルで  $15.8 \pm 2.0\%$  (n=9)、GFP→B6 モデルで  $35.3 \pm 3.4\%$  (n=9)であった。B6→GFP モデルにおいてホスト由来の血管壁構成細胞は統計学的に有意に少なかった (図 6 C)。マウス骨髄移植-自家脂肪移植モデルにおいても同様の染色を行ったが、血管構造を認めず、骨髄由来細胞の血管構造の定量には至らなかった。

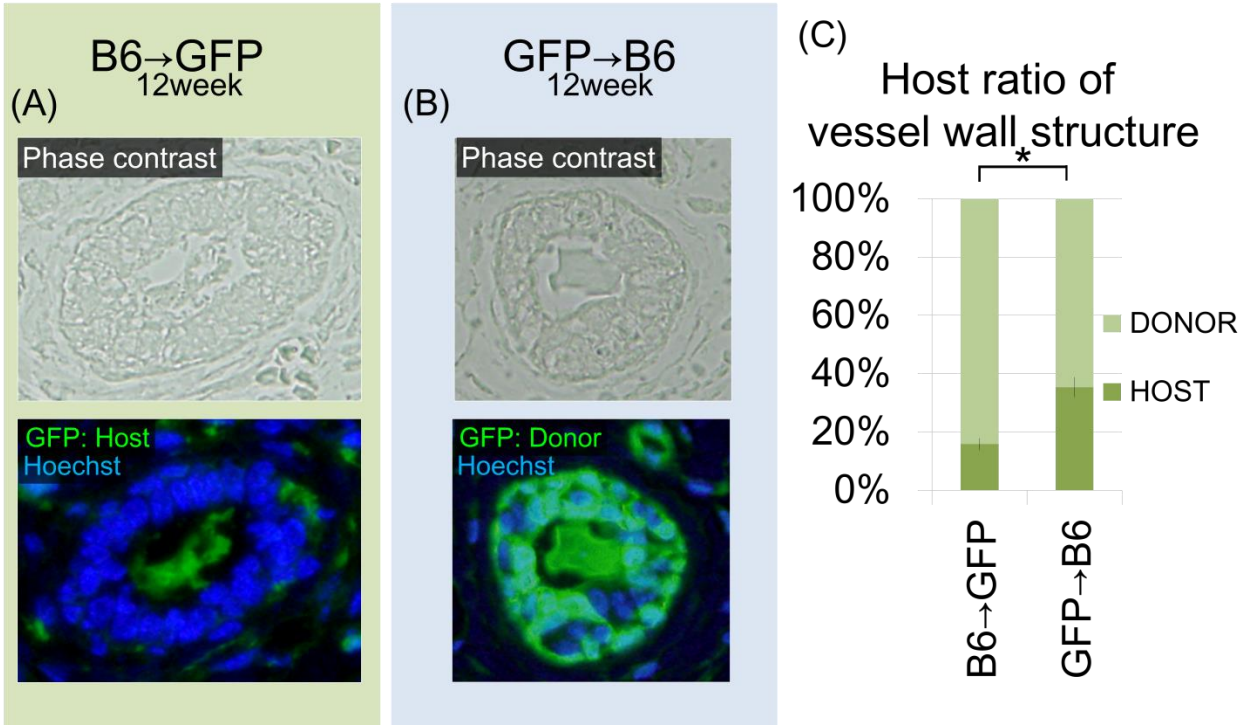


図6：移植後血管壁構造の免疫組織化学染色

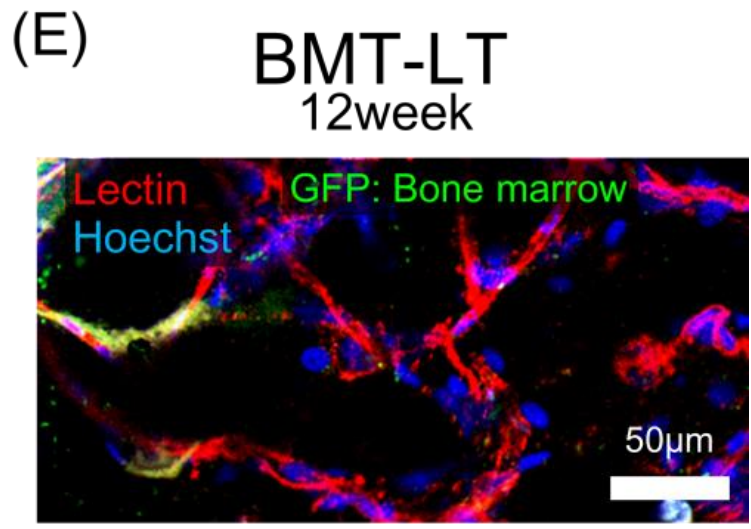
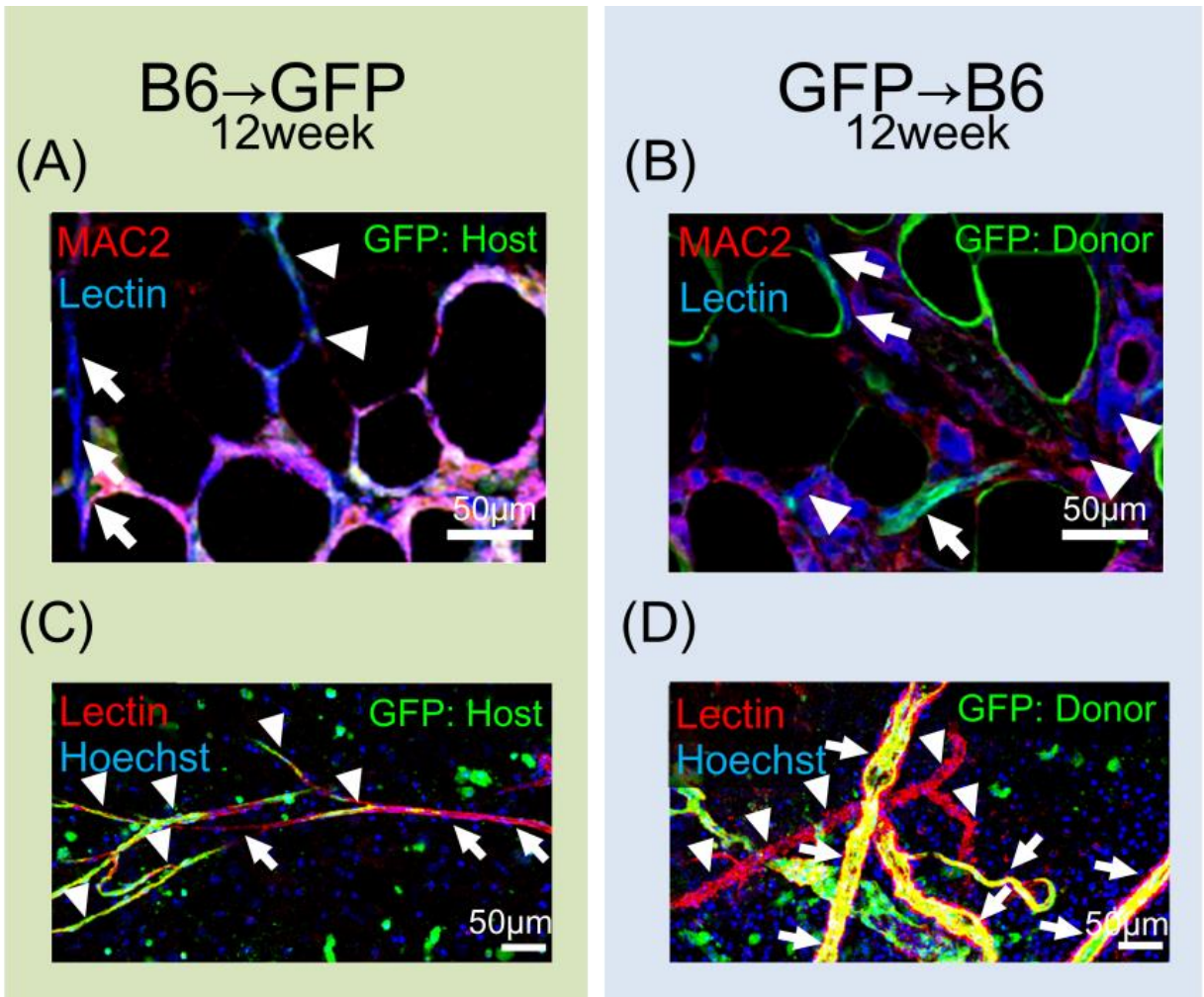
交換移植モデルの脂肪移植後12週検体の免疫組織化学染色像(A、B)。フェーズコントラスト像により同定した血管について、ドナーとホストの割合を算出した(C、n=9)。両モデルにおいてホスト由来細胞が血管壁構造を構成しているが、B6→GFPモデルにおいてその割合が有意に少なかった。エラーバー：標準誤差。\*： $p<0.05$ 。

## 移植後毛細血管及び血管内皮細胞の由来

免疫組織化学染色により交換移植モデルの毛細血管を評価した。Lectin は広く血管内皮のマーカーとして使用されているが、本実験系ではマクロファージにも陽性反応が確認された。マクロファージを除外するため、Mac2 との共染色を行った。B6→GFP モデルでは宿主由来であるシアン色の毛細血管（宿主緑色+Lectin 青色）とドナー由来である青色の毛細血管（図 7 A）を認めた。緑（宿主）、青（Lectin）、赤（Mac2）の重合像としてマクロファージは白色に観察された。GFP→B6 モデルにおいても同様の結果で、宿主由来である青色の毛細血管とドナー由来であるシアン色の毛細血管（ドナー緑色+Lectin 青色）が観察された（図 7 B）。マクロファージは青色（Lectin）と赤色（Mac2）の重合色である紫色に観察された。

ホールマウント染色により交換移植モデル及び骨髄移植-自家脂肪移植モデルの毛細血管の評価を行った。交換移植モデルでは免疫組織化学染色の結果と同様に、ドナー及びホストの Lectin 陽性の毛細血管構造を認めた。また、ドナー及びホスト細胞が入り乱れたキメラ様毛細血管も観察された（図 7 C、D）。Lectin 陽性マクロファージは形態的に容易に除外することができた。

骨髄移植-自家脂肪移植モデルのホールマウント染色では骨髄由来、非骨髄由来の両方の Lectin 陽性毛細血管様構造を認め、骨髄細胞の毛細血管新生への貢献が示唆された（図 7 E）。



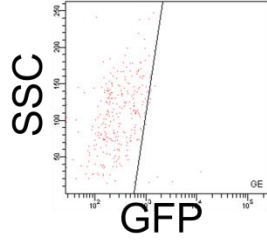
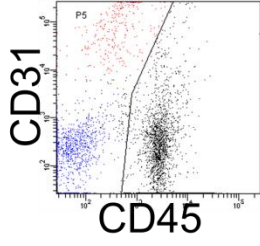
## 図 7 : 毛細血管の組織染色

脂肪移植後 1 2 週の検体の免疫組織化学染色 (A、B) 及びホルマウント染色 (C-E) の代表的な画像を提示する。交換移植モデル (A-D) では B6→GFP 及び GFP→B6 共に両染色法においてドナー由来、ホスト由来の毛細血管を認めた。骨髄移植後-自家脂肪移植(Bone marrow transplant-lipo transfer: BMT-LT)のホルマウント染色では骨髄由来-非骨髄由来の毛細血管を認めた。Bar=50 $\mu$ m。矢印：ドナー毛細血管、矢頭：ホスト毛細血管。

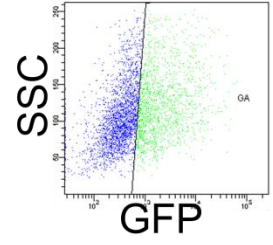
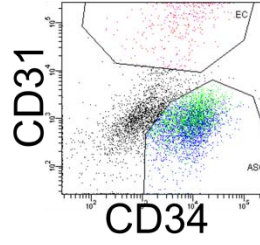
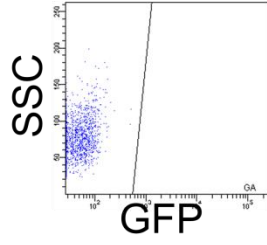
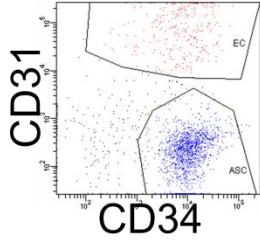
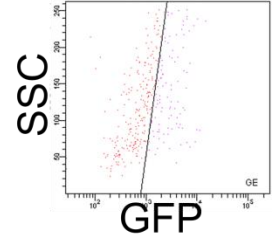
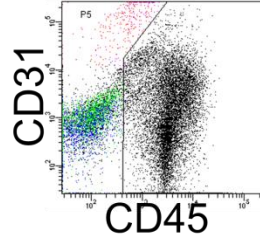


血管内皮細胞の由来の定量をフローサイトメトリー解析で行った。B6マウス、GFPマウス、骨髄移植マウス (BMT)、骨髄移植後-自家脂肪移植モデル (BMT-LT)、交換移植モデル (B6→GFP 及び GFP→B6) について鼠径脂肪及び移植脂肪検体を採取し、SVF採取及びフローサイトメトリー解析を行った (図8)。CD45陰性、CD31陽性の細胞を血管内皮細胞とした (図9A)。B6マウス及びGFPマウスの鼠径脂肪の血管内皮細胞のGFP信号陽性率はそれぞれ、 $4.6 \pm 1.9\%$ 、 $76.0 \pm 1.1\%$ であった。これらは理論的には0%及び100%であるので、方法に示した補正を行った。また、GFP信号の陽性/陰性を交換移植モデルに関してはドナー/ホストの割合、BMT及びBMT-LTに関しては骨髄/非骨髄の割合にそれぞれ変換し図示した (図9B)。生着した脂肪中の血管内皮細胞はドナー由来・ホスト由来の細胞でほぼ均等に構成されていた。また、ホスト細胞は骨髄由来細胞の貢献が大きく、非骨髄細胞は少ないことが示唆された。

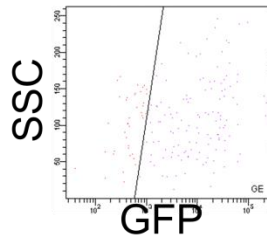
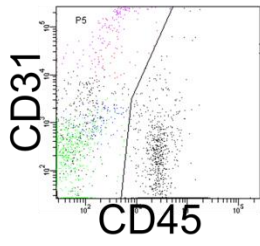
B6 mouse



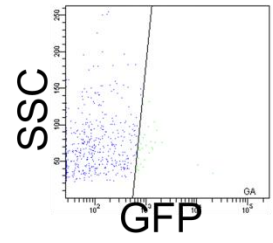
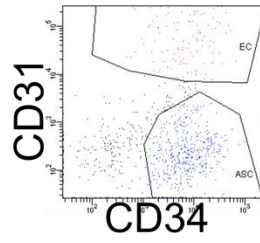
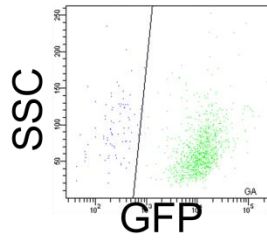
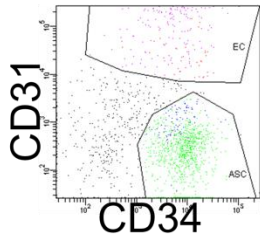
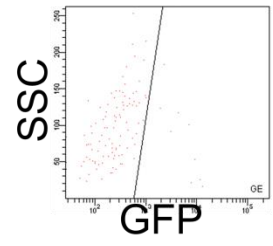
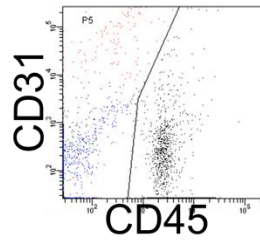
BMT-LT



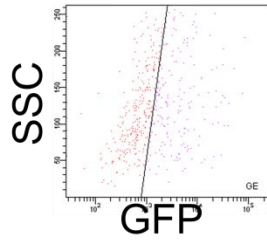
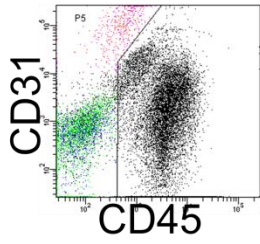
GFP mouse



BMT



B6 → GFP



GFP → B6

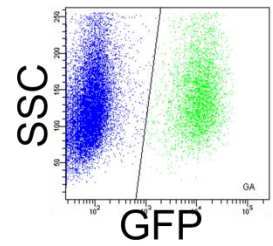
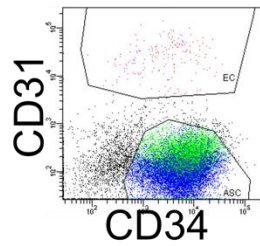
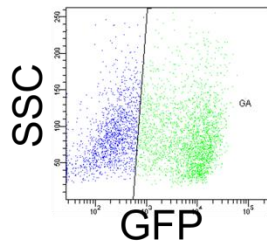
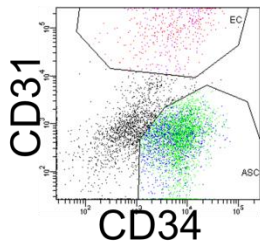
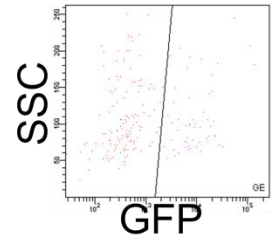
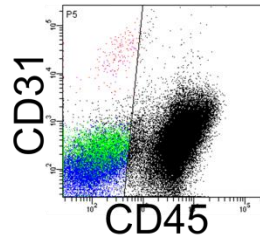


図 8 : 移植脂肪構成細胞のフローサイトメトリーによる解析

移植脂肪細胞及びコントロール鼠径脂肪のフローサイトメトリー解析代表データを提示する。血管内皮細胞は CD45 陰性、CD31 陽性細胞として、脂肪由来幹細胞は CD45 陰性、CD34 陽性、CD31 陰性細胞とした。

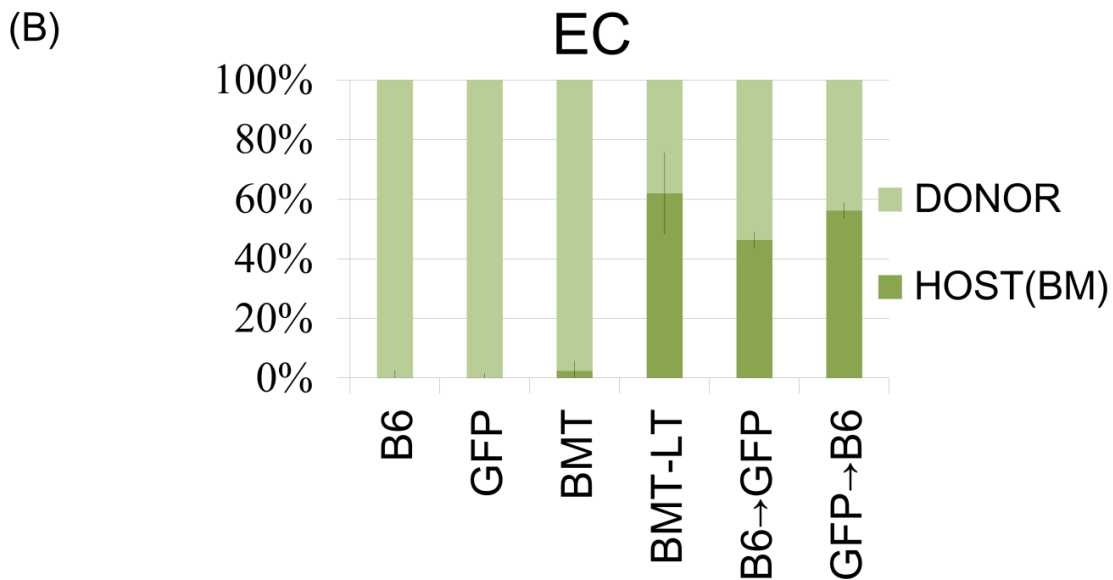
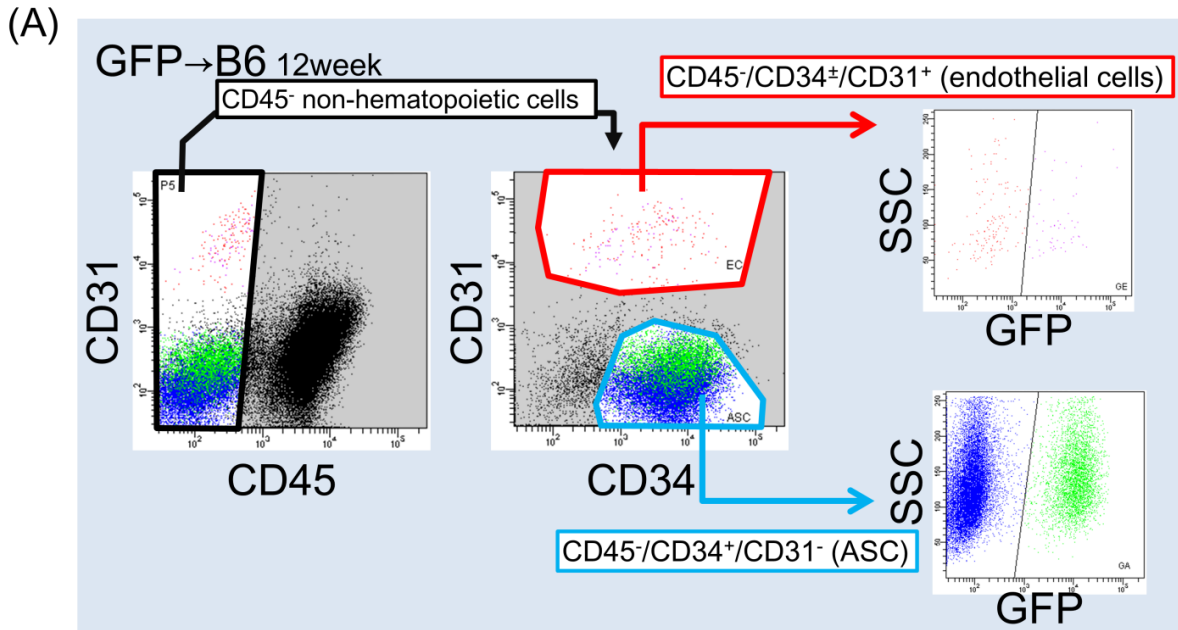


図9：血管内皮細胞の由来

血管内皮細胞について6種類の検体についてフローサイトメトリー解析を行った(n=3)。GFP→B6モデルのゲーティングを示す(A)。血管内皮細胞はCD45陰性、CD31陽性細胞として、ASCsはCD45陰性、CD34陽性、CD31陰性細胞とした。GFP信号の割合を最適化した後、血管内皮細胞のドナー・ホストもしくは骨髄・非骨髄の割合として示す(B)。SSC: side scatter、EC: vascular endothelial cells、BMT: bone marrow transplant、BMT-LT: bone marrow transplanted lipo-transfer、Error bar: 標準誤差。

## 移植後 ASCs の由来

フローサイトメトリー解析により血管内皮細胞と同様に ASCs について解析を行った。ASCs は CD45 陰性、CD34 陽性、CD31 陰性細胞とした (図 9 A)。血管内皮細胞と同様に方法の頁に有るように元データの補正を行い、ドナー・ホストもしくは骨髄・非骨髄の割合として解析結果を示す (図 10 A)。生着した脂肪中の ASCs はドナー由来、ホスト骨髄由来、ホスト非骨髄由来の細胞によりほぼ同じ割合で構成されていることが示された。

交換移植モデル検体の ASCs 培養実験において、ドナー・ホストの割合を観察することができた (図 10 B)。定量すると B6→GFP モデルでは  $67.0 \pm 7.4\%$ 、GFP→B6 モデルでは  $50.9 \pm 6.6\%$  の ASCs がホスト由来であった ( $p=0.088$ ) (図 8 C)。これは、フローサイトメトリー解析による結果に矛盾しないものであった。

これまでの結果を図 11 にまとめる。

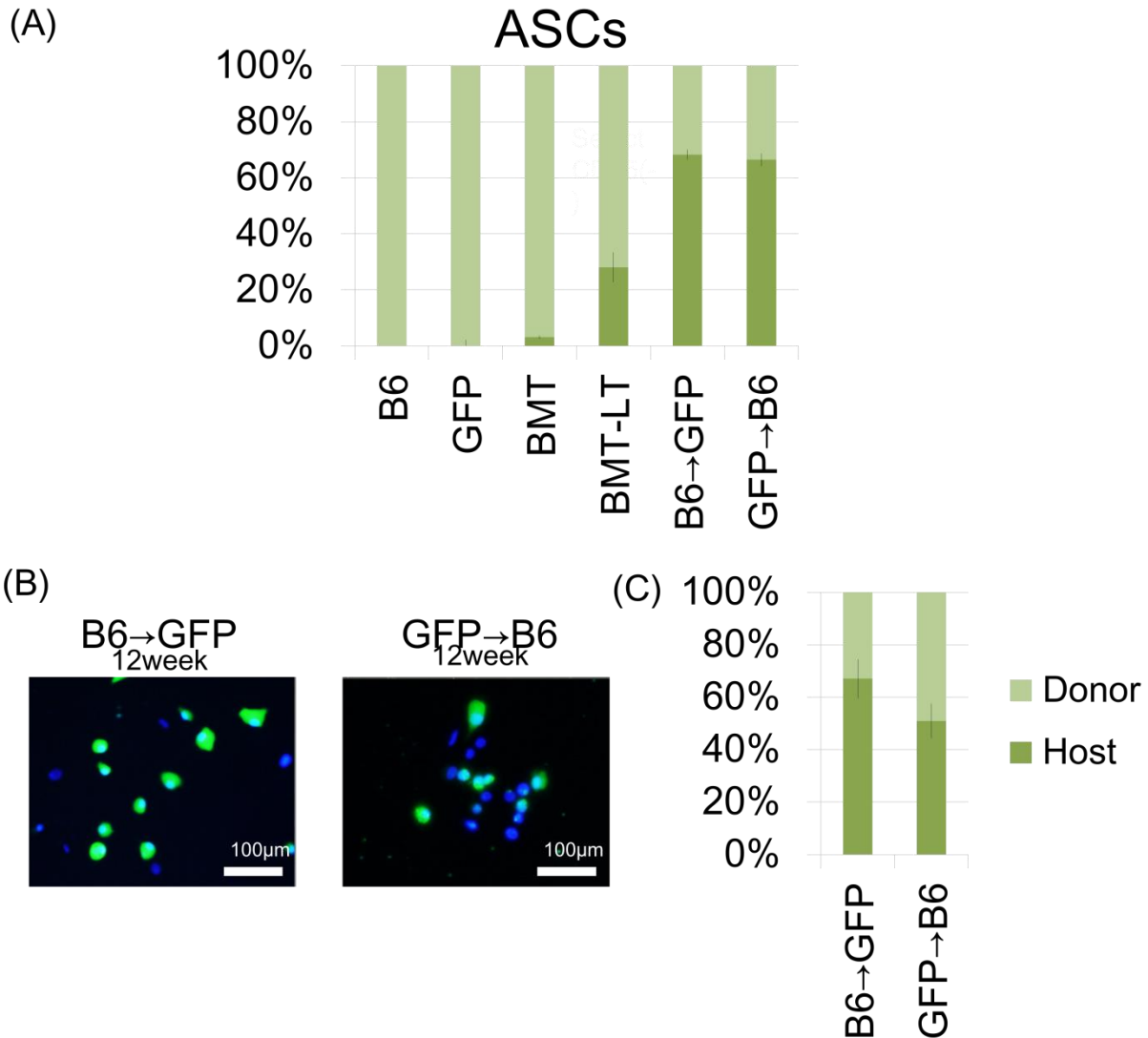


図 1 0 : ASCs の由来

6種類の検体についてフローサイトメトリー解析を行った。GFP信号の割合を最適化した後、ASCsのドナー・ホストもしくは骨髄・非骨髄の割合として示す(A)。ドナー・ホスト骨髄・ホスト非骨髄細胞がほぼ均等にASCsを構成している。

交換移植モデルのASCsを培養後、蛍光顕微鏡下で観察した(B)。定量した結果を示す(C)。フローサイトメトリーと同様の結果を得ることができた。Bar: 100µm、BMT: bone marrow transplant、BMT-LT: bone marrow transplanted lipo-transfer、Error bar: 標準誤差。

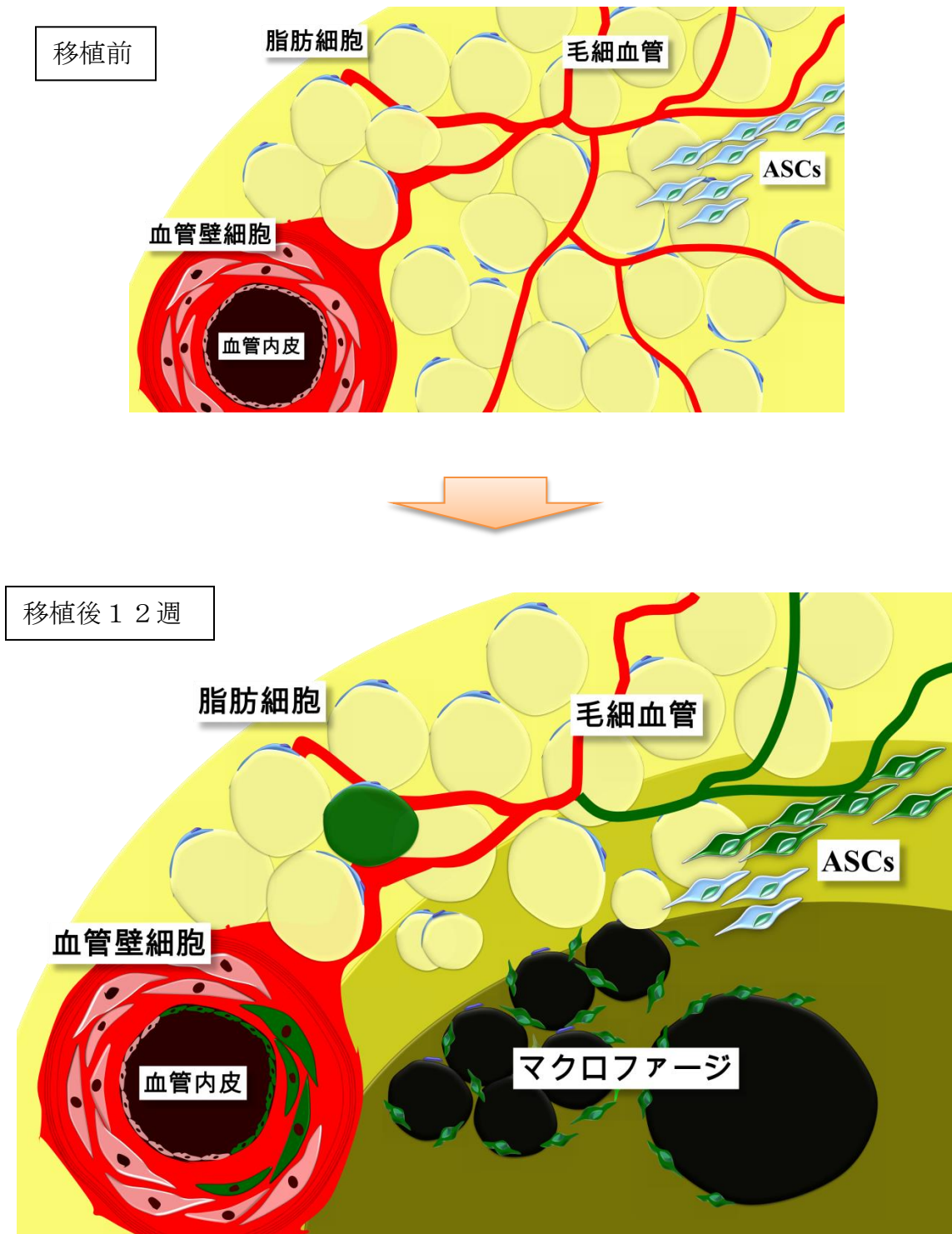


図 1 1 : 脂肪移植後構成細胞の起源

上段に移植前脂肪、下段に移植後12週の脂肪組織を図示する。ドナー細胞起源と思われるものは移植前と同色を使用し、ホスト起源細胞を緑色で着色した。

## 考 察

ホスト細胞は移植後 1 週で移植脂肪の中心部まで浸潤し、主に **Perilipin** 陰性の再生領域及び壊死領域に観察された。また、ホスト細胞はマクロファージとして死んだ脂肪組織を円周状に取り囲んでいた (**Crown like structure**)。マクロファージが脂肪組織の成長やリモデリングに深く関わっていることはすでに報告されている(30)。特に肥満との関連で研究が進んでおり、マクロファージのサブタイプによる役割の違いも指摘されている(31)。古典的な炎症性マクロファージは **M1** と呼ばれ、肥満により誘導され、炎症性シグナルを局所及び全身に引き起こすことでインスリン抵抗性の一因となる(32)。一方、抗炎症性の **M2** マクロファージは **PPAR $\gamma$**  に依存した経路によりインスリン抵抗性を改善すると報告されている(33)。今研究では **M1** 及び **M2** の分類は直接行っていないが、**Crown like structure** は肥満の脂肪組織に見られる脂肪貪食像であり、脂肪組織再構築にも **M1** マクロファージとして関与していることが示唆される。

本実験における動物モデルの元となった脂肪移植モデルでは、再生脂肪と考えられる小型脂肪細胞 (<30 $\mu$ m) が移植 4 週後をピークに 8 週後に一定になる(21)。つまり、移植後 1 2 週の時点では移植脂肪細胞の再生過程は完了していると考えられる。そこで本研究では移植後 1 2 週のサンプルを用い、生着した脂肪組織内のホスト由来細胞がどの細胞へ貢献しているのかを検討した。



免疫組織化学的検索によりホスト非骨髄細胞由来の脂肪細胞はまれに観察可能であったが、骨髄細胞由来の脂肪細胞は観察できなかった。先行の骨髄移植モデルを用いた研究では、正常脂肪組織もしくは高脂肪食下の脂肪組織にて骨髄由来の脂肪由来細胞が報告されている(23, 24)。先行研究においても骨髄由来の脂肪細胞の頻度は非常に少ないとされており、その希少性から当研究では観察できなかったものとする。一方、マウス脂肪チャンバーモデルや、皮下に細胞外基質を留置したモデルを用いた先行研究では、ホスト由来の細胞から新生脂肪細胞が形成されることが報告されている(34, 35)。移植脂肪組織内では新生脂肪と考えられる小型脂肪細胞が確認されており、脂肪細胞新生は活発に起きていると考えられるが、その起源はドナー由来の ASCs であると言える。脂肪移植の微細環境が脂肪新生に適していないために、ホスト由来細胞が脂肪細胞へ分化できない可能性がある。様々な要因が考えられるが、マクロファージの脂肪貪食周囲では骨髄由来の新生脂肪細胞が抑制されるという報告もあり(35)、移植脂肪組織内の炎症がホスト由来の脂肪新生を抑制している可能性がある。

血管壁構造及び血管内皮細胞の由来についても免疫組織化学染色及びフローサイトメトリーを組み合わせることで詳細に検討を行った。特に血管内皮細胞のマーカーとして一般的に使用される **Lectin** は血管内皮細胞だけでなく、マクロファージにも広く陽性であることを示し、多重染色によりそれを除外することに成功した。これまでの **Lectin** のみを用いた毛細血管の評価方法では血管数が過剰評価されている恐れがある。ホスト細胞は血管壁構造よりも毛細血管により関わり、ホスト骨髄細胞とドナー細胞が同程度に少数のホスト非骨髄細胞とともに毛細血管をキメラ状に構成していることが観察され

た。これは腎臓移植などで確認されたドナー／ホストのキメラ血管と類似している(36)。血管内皮細胞に関してはドナー細胞とホスト骨髄細胞がほぼ半数で貢献しており、ホスト非骨髄由来の細胞は少数であった。脂肪移植におけるホスト細胞の血管新生過程には **Angiogenesis** 型血管新生ではなく、**Vasculogenesis** 型血管新生が主体であることが示された。これまでの研究では、正常組織中の骨髄由来の **ASCs** は非常に稀であると報告されてきた(23, 24)。フローサイトメトリー解析及び検体の **SVF** 細胞培養実験の結果から、脂肪移植後にはこの割合は大きく増加し、ホスト骨髄細胞・ホスト非骨髄細胞・ドナー細胞がおおよそ均等に **ASCs** を構成していることが判明した。発見当初 **ASCs** は骨髄由来幹細胞と同様の性質を持つ細胞として報告された経緯があり、骨髄より骨髄由来幹細胞が移植脂肪へ遊走・定着したものと考えられる。骨髄由来幹細胞の創傷治癒や血管新生との関係は広く研究されている。**C-X-C chemokine receptor type 4** とそのリガンドである **Stromal cell derived factor 1 (SDF-1)** が重要な役割を果たしており、**SDF-1** のアゴニストの投与により体性幹細胞が末梢血中に遊離し、糖尿病性潰瘍などの創傷治癒を促進することが実験的に示されている (37, 38)。本研究において興味深いのは、脂肪移植においてホスト骨髄/非骨髄由来の **ASCs** が認められたのにもかかわらず、それらが成熟脂肪細胞へ分化しなかった事である。虚血脂肪組織から **SDF1** が産生される事はわかっており、それらがホスト由来の **ASCs** の機能を創傷治癒や血管新生へ誘導している可能性がある。また、血管新生と脂肪新生には大きな関わりがあり、胎生期では血管新生の後に脂肪新生が起きることがわかっている(39)。ホスト由来の血管壁・血管内皮細胞が本研究において認められた事から、より長期の観察や、創傷治癒の促進、炎症の抑制などによりホスト由来 **ASCs** を脂肪細胞へ分化させることが可能となるかもしれない。

本研究のみで ASCs となったホスト非骨髄細胞の起源を特定することはできない。ただし、ASCs には脂肪組織から遊走し、リンパ節へ定着する作用があることが報告されており(40)、ホスト非骨髄細胞由来の ASCs の起源は周囲の脂肪組織の可能性があると考える。脂肪組織が ASCs のリザーバーとして機能しており、脂肪移植術後 ASCs が骨髄由来幹細胞と同様に遊走・遠隔地へ定着することが本研究により示唆された。

本研究により脂肪移植の生着過程についてさらなる知見が得られた。壊死領域ではドナー細胞が死滅し、ホスト細胞により貪食・吸収される。生着領域や再生領域ではホスト骨髄細胞・ホスト非骨髄細胞・ドナー細胞それぞれが再構築に関わっていると考えられる。ホスト骨髄からは骨髄由来幹細胞・血管前駆細胞・ファイブロサイト等が遊走し、移植脂肪内の主に再生領域において血管壁や血管内皮細胞、ASCs となっている。ホスト非骨髄（隣接した脂肪組織など）からは脂肪由来幹細胞や脂肪局在マクロファージ等が遊走、移植脂肪内の主に再生領域へ定着し、血管壁や ASCs となる。また、ドナーの ASCs や脂肪局在マクロファージ等も生存領域・再生領域において脂肪細胞、再生脂肪細胞、血管壁、血管内皮、ASCs を構成していると考えられる。脂肪組織生着過程は複雑で、一つの単純化した理論では説明できない。微小環境や細胞の差によりその生死と由来は交錯し、ドナー及びホスト骨髄、骨髄細胞が部位によって様々な役割を持っていると考えられる。

これらの一連の体性幹細胞・前駆細胞の挙動には様々な液性因子が関わっていると予想される。移植脂肪は移植後 1 週以内のごく初期に生着領域以外の細胞の大部分が死ぬが(16)、今後はその際に脂肪組織から放出される液性因子に注目し、詳細な研究を進め

ていきたい。脂肪移植のリモデリングに関わる骨髄由来の細胞やそれ以外の部位に存在する体性幹細胞の挙動をコントロールすることができれば、治療目的に合わせた細胞の遠隔地からの誘導・定着・分化が可能となり、本研究があらゆる組織再生治療の礎になると考える。

## 参考文献

1. Gir P, Brown SA, Oni G, Kashefi N, Mojallal A, Rohrich RJ. Fat grafting: evidence-based review on autologous fat harvesting, processing, reinjection, and storage. *Plastic and reconstructive surgery*.**130**:249. 2012.
2. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and biophysical research communications*.**294**:371. 2002.
3. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*.**328**:258. 2005.
4. Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*.**272**:398. 2003.
5. Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Experimental neurology*.**187**:319. 2004.
6. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem cells*.**24**:2582. 2006.
7. Eto H, Suga H, Matsumoto D, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Yoshimura K. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. *Plastic and reconstructive surgery*.**124**:1087. 2009.

8. Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plastic and reconstructive surgery*.**118**:108s. 2006.
9. Rigotti G, Marchi A, Galie M, Baroni G, Benati D, Krampera M, Pasini A, Sbarbati A. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*.**119**:1409. 2007.
10. Cantarella G, Mazzola RF, Domenichini E, Arnone F, Maraschi B. Vocal fold augmentation by autologous fat injection with lipostructure procedure. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*.**132**:239. 2005.
11. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Diseases of the colon and rectum*.**52**:79. 2009.
12. Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem cell research & therapy*.**1**:19. 2010.
13. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World journal of stem cells*.**3**:25. 2011.
14. Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, Nishimura S, Manabe I, Gonda K, Yoshimura K. IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Stem cells*.**27**:238. 2009.
15. Suga H, Eto H, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, Higashino T, Yoshimura K. Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. *Plastic and reconstructive surgery*.**126**:1911. 2010.

16. Eto H, Kato H, Suga H, Aoi N, Doi K, Kuno S, Yoshimura K. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plastic and reconstructive surgery*.**129**:1081. 2012.
17. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Gonda K, Harii K, Yoshimura K. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plastic and reconstructive surgery*.**121**:1033. 2008.
18. Kolle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, Kastrup J, Kirchhoff M, Rasmussen BS, Talman ML, Thomsen C, Dickmeiss E, Drzewiecki KT. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*.**382**:1113. 2013.
19. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, Aiba-Kojima E, Iizuka F, Inoue K, Suga H, Yoshimura K. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue engineering*.**12**:3375. 2006.
20. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic plastic surgery*.**32**:48. 2008.
21. Kato H, Mineda K, 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. *Plastic and reconstructive surgery*. 2013.
22. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Frontiers in immunology*.**4**:201. 2013.

23. Tomiyama K, Murase N, Stolz DB, Toyokawa H, O'Donnell DR, Smith DM, Dudas JR, Rubin JP, Marra KG. Characterization of transplanted green fluorescent protein+ bone marrow cells into adipose tissue. *Stem cells*.**26**:330. 2008.
24. Crossno JT, Jr., Majka SM, Grazia T, Gill RG, Klemm DJ. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *The Journal of clinical investigation*.**116**:3220. 2006.
25. Hausman GJ, Hausman DB. Search for the preadipocyte progenitor cell. *The Journal of clinical investigation*.**116**:3103. 2006.
26. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes*.**56**:1517. 2007.
27. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of cellular physiology*.**208**:64. 2006.
28. Yang S, Eto H, Kato H, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, Tsai CH, Chou WT, Ma H, Yoshimura K. Comparative characterization of stromal vascular cells derived from three types of vascular wall and adipose tissue. *Tissue engineering Part A*. 2013.
29. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research*.**46**:2347. 2005.
30. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nature reviews Immunology*.**9**:259. 2009.



31. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation*.**121**:2094. 2011.
32. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*.**117**:175. 2007.
33. Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annual review of pathology*.**6**:275. 2011.
34. Stillaert F, Findlay M, Palmer J, Idrizi R, Cheang S, Messina A, Abberton K, Morrison W, Thompson EW. Host rather than graft origin of Matrigel-induced adipose tissue in the murine tissue-engineering chamber. *Tissue engineering*.**13**:2291. 2007.
35. Lee YH, Petkova AP, Granneman JG. Identification of an adipogenic niche for adipose tissue remodeling and restoration. *Cell metabolism*.**18**:355. 2013.
36. Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, van Kemenade FJ, van Es LA, Bruijn JA, van Krieken JH. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet*.**357**:33. 2001.
37. Tepper OM, Carr J, Allen RJ, Jr., Chang CC, Lin CD, Tanaka R, Gupta SM, Levine JP, Saadeh PB, Warren SM. Decreased circulating progenitor cell number and failed mechanisms of stromal cell-derived factor-1alpha mediated bone marrow mobilization impair diabetic tissue repair. *Diabetes*.**59**:1974. 2010.
38. Fiorina P, Pietramaggiori G, Scherer SS, Jurewicz M, Mathews JC, Vergani A, Thomas G, Orsenigo E, Staudacher C, La Rosa S, Capella C, Carothers A, Zerwes HG, Luzi L, Abdi R, Orgill DP. The mobilization and effect of endogenous bone marrow progenitor cells in diabetic wound healing. *Cell transplantation*.**19**:1369. 2010.

39. Hausman GJ, Richardson RL. Adipose tissue angiogenesis. *Journal of animal science*.**82**:925. 2004.
40. Gil-Ortega M, Garidou L, Barreau C, Maumus M, Breasson L, Tavernier G, Garcia-Prieto CF, Bouloumie A, Casteilla L, Sengenès C. Native adipose stromal cells egress from adipose tissue in vivo: evidence during lymph node activation. *Stem cells*.**31**:1309. 2013.

## 謝辞

本研究において、研究の立案、実験手技、論文執筆まで、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教授には、指導教官として本研究にご指導、ご支援を頂きました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

東京大学医学部形成外科の江藤ひとみ先生、青井則之先生、緒方英先生、加藤晴之輔先生、久野慎一郎先生、荒木淳先生、木下佳保里先生、峯田 一秀先生、金山 幸司先生には、カンファレンスや抄読会、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頂きました。また、実験助手の佐藤綾子氏、稗田麻記子氏には多岐にわたる実験において多大なるご協力を頂きました。改めて感謝の意を表したいと思います。