

博士論文

論文題目 組織傷害に起因する脂肪組織由来幹細胞活性化に関する研究

氏名 久野 慎一郎

目次

略語	3
要旨	4
序文	5
方法	
ヒト脂肪組織由来幹細胞(hASC)の単離・培養	9
Adipose tissue soaked buffer (ATSB) の作成	9
潰瘍上皮化モデルの作成	10
虚血-再灌流モデルの作成	10
Adipose tissue soaked buffer(ATSB)含有物質の評価	11
Proliferation assay	12
Migration assay	12
Capillary network formation assay	13
免疫染色	13
生存脂肪組織割合の定量化	14
組織内有核細胞、マクロファージの定量化	14
Flow cytometry	15
統計学的解析	15

結果	
(1)Adipose tissue socked buffer 作成と至適実験条件の検討	16
(2)ATSB による hASCs 活性化経路の検索	18
① : hASC における CXCR4/7 を介したシグナル伝達	20
② : ATSB に含有される脂肪組織傷害関連因子の検索	22
③ : IL-17 検出の試み	24
④ : TREM1 検出の試み	25
⑤ : ATSB に含まれる HMGB1 と、hASC 上の受容体発現	26
⑥ : HMGB1 を介する hASC の活性化	28
(3)脂肪組織由来傷害関連因子によるマクロファージ、ASCs への作用	30
① : 虚血による脂肪組織傷害と組織再生過程への CXCR4、CXCR7 の関与	30
② : 虚血傷害後の脂肪組織とマクロファージ遊走	33
③ : 難治性創傷における組織傷害因子と CXCR4、CXCR7 の役割	35
④ : 潰瘍上皮化モデルにおける組織検討	37
⑤ : 虚血による脂肪組織傷害と組織再生過程への HMGB1 の関与	40
考察	46
参考文献	53
謝辞	62

略語

HMGB1	High Mobility Group Box 1	
ATM	Adipose Tissue resident Macrophages	(脂肪組織常在マクロファージ)
ASCs	Adipose derived Stem Cells	(脂肪組織由来幹細胞)
ATSB	Adipose Tissue Socked Buffer	
PBS	Phosphate Buffered Saline	(リン酸緩衝生理食塩水)
SVF	Stromal Vascular Fraction	(間質血管細胞群)
FBS	Fetal Bovine Serum	(ウシ胎児血清)

要旨

傷害脂肪組織における脂肪組織由来幹細胞の活性化、局所免疫の変化を調べるために、組織傷害関連因子に着目して実験を行った。脂肪組織傷害関連因子は脂肪組織由来幹細胞を活性化することが判明した。また、動物実験において、虚血傷害下の脂肪組織での組織幹細胞活性化、M2 マクロファージ遊走に CXCL11、CXCL12、HMGB1 を介したシグナルが関与していることが判明した。これらの結果から、傷害を受けた脂肪組織は CXCL11、CXCL12、HMGB1 を組織傷害関連因子として放出し、傷害部位の修復やリモデリングをコントロールしていると考えられた。

序文

軟部組織の再建や増大手段として、吸引脂肪組織移植が挙げられる。脂肪吸引による脂肪組織採取は比較的侵襲性が低く、必要な組織量を容易に確保できるため、形成外科領域で多用されている。また、自己組織の移植であるため拒絶反応の心配がないという利点もある。脂肪移植術の問題点として、術者の技量や採取脂肪組織の質により症例間で組織生存率に差があり、軟部組織の増大効果にも差が発生してしまうことが挙げられる(1)。組織生存率や軟部組織増大効果の向上を目指して術式やデバイスの開発・改良が進んでおり(2)、望ましい成果を挙げているものもある(3)。そのため、臨床的転機は大幅に改善されつつある。

しかし、移植した脂肪組織は程度の差はあるが、ある程度吸収され、組織増大効果が時間とともに減退する。移植した吸引脂肪は虚血状態に置かれ、酸素や栄養の供給が滞る。そのため、組織壊死や組織リモデリングが発生し、移植組織の収縮に至ると考えられている。

この移植組織リモデリング過程を解明するために、我々の研究室では同種脂肪移植モデルマウスを用いた検討を行い、移植後、虚血環境に置かれた脂肪組織のリモデリングの経過を明らかにし、その過程にマクロファージの遊走が強く関連していることを報告した(4)。昨今、マクロファージに大きく分けて M1 と M2、2 つの代表的フェノタイプが存在し、M1 マクロファージが炎症反応の誘導、M2 マクロファージが組織修復やリモデリングに関与していることが多数の研究論文で報告されている(5)(6)。

さらに、マクロファージには、循環血液中でなく組織に常在する Tissue-resident macrophage が存在することが知られており(7)、我々は脂肪組織の中に M2 マクロファージ Adipose derived stem cells(ASCs)双方に近い性質のある Adipose tissue resident macrophage(ATM)が存在していることを確認した(8)。この ATM が ASC と近縁関係にある細胞であることが示唆される結果も得ている(8)。

これらの先行研究や他家の報告から、傷害環境に置かれた脂肪組織においては、M1 マクロファージによる傷害・壊死組織のスキャベンジング、M2 マクロファージによるリモデリングプロセスとともに ATM の関与が示唆されている。さらに、ATM と ASC が近縁関係にある細胞種ではないかとも推測している(8)。他家からも、ATM による血管新生を観察した報告があり(49)、我々の推測と矛盾しない。

また、臨床症例における検討として、ヒト吸引脂肪組織を用いた胸部への脂肪移植術の長期経過の中で、移植脂肪の一部が嚢胞化・石灰化した症例を取り上げ、移植組織の壊死、石灰化嚢胞の形成といった移植脂肪組織のリモデリングプロセスにマクロファージが関わっており、中でも M2 マクロファージの働きが大きいことを確認した(9)。ATM はリモデリングプロセスにおいて、表現型として M2 マクロファージと同様の抗原を発現している(8)ことから、移植脂肪組織のリモデリングには、遊走 M1/M2 マクロファージに加えて、ドナー組織の ATM、ASCs が関与していることが示唆される。

ASC も含めた間葉系幹細胞には、前述のようなマクロファージを含めた傷害組織の

局所免疫反応をコントロールする能力があることが最近の研究で示されている(10)(11)(12)。また、傷害組織から放出される様々な組織傷害関連因子が組織幹細胞の活性化、局所免疫の制御に関与していることも示唆されている(13)。特に自然免疫機構の活性化が強調されており、傷害され、壊死に陥ったり傷害の度合いが大きい組織のスカベンジングを活性化していると考えられている(13)。昨今の報告では、特に ASC には炎症反応を抑制する因子の放出能力があることが示唆されており(51)、マクロファージのような自然免疫系細胞と ASCs とのクロストーク経路の存在も想起される。

これらの知見と我々の研究室での先行研究の結果を合わせ、虚血・低栄養環境に置かれる、移植された吸引脂肪組織は自ら組織傷害関連因子を放出し、これらが組織幹細胞の活性化とともに循環血中のマクロファージ遊走促進、ATM の活性化といった反応を惹起することで組織傷害後のリモデリングプロセスをコントロールしているのではないかという仮説を立てた。

そこで我々は、傷害脂肪組織から放出される傷害関連因子に着目し、脂肪組織傷害関連因子による ASCs の活性化経路について検討し、さらに同様のシグナル経路による傷害組織における ASCs の活性変化、マクロファージ活性の変化や表現型の変化、について検討することにした。

本論文では、まず脂肪組織由来傷害関連因子の混合物を adipose tissue socked buffer(ATSB)として回収し、human adipose derived stem cells(hASCs)を活性化することを示し、ATSB を用いた実験条件についての検討を行う。

次に、ATSB が hASCs を活性化する経路について検討する。

最後に虚血再灌流マウスモデル、皮膚潰瘍マウスモデルを用いて、脂肪組織由来傷害関連因子とその構成成分が虚血傷害を受けた脂肪組織のリモデリングプロセスや難治性皮膚潰瘍の上皮化過程においてどのように作用しているかを、傷害部位に誘導されるマクロファージと局所の ASC の活性に着目して検討する

方法

ヒト脂肪組織由来幹細胞(hASC)の単離・培養：

健康成人から脂肪吸引で採取した脂肪組織片をリン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、同体積の 0.075% コラゲナーゼ(和光純薬)溶液と混和。恒温振盪器で 200rpm、37°C、30 分間処理した。処理した溶液を 760g で 5 分間遠心し、ペレットを回収。回収したペレットを PBS で洗浄し、100 μ m のセルストレーナーに通した後、10%血清入り DMEM 培地で培養した。培養経過で接着・増殖してくるものを hASC とし、Passage2 で実験に使用した。尚、我々の研究室で行われた先行研究により、passage2 の培養 hASC が自己増殖し、3 胚葉分化能を維持し、間葉系幹細胞としての性質を保持していることが確認されている(52)。

Adipose tissue soaked buffer (ATSB) の作成：

ヒト吸引脂肪組織検体を使用するにあたり、東京大学倫理委員会の承認を得て実験を開始した。

吸引脂肪組織を等量の PBS に漬け、恒温振盪器内 37°C で振盪した。振盪時間は 1 時間、24 時間、48 時間とした。振盪後、500 μ m、100 μ m、70 μ m、40 μ m、0.22 μ m のフィルターで順に濾過滅菌を行った。-80°C で凍結保存した。

予備実験において反応のばらつきが大きかったため、1 検体から作成した ATSB を 1 ロットとしてプールし、10 ロット分を混和して実験に用いた。3 系列実験を行う場

合には、異なる 30 ロットを解凍し、10 ロットずつ混和して 3 系列とした。

動物実験：

全ての動物実験・動物の管理は、東京大学の定めたガイドラインに従って行った(承認番号 医-P13-128、医-P13-129)。実験動物は全て日本 SLC(静岡)から購入して使用した。

(1)潰瘍上皮化モデルの作成

8 週齢の db/db マウスを、エスカイン(マイラン、大阪)を用いた吸入麻酔で入眠させ、背部 2 か所に直径 6 mm の全層皮膚欠損潰瘍を作成した。潰瘍作成には 6 mm のスキンパンチ(カイインダストリー、東京)を用い、潰瘍の拘縮を予防するため、直径 9 mm のシリコンリング(共和、埼玉)を縫着した。潰瘍の辺縁に次に挙げる薬品を 50 μ l/回で皮下注射した。①PBS 群(コントロール)、②ATSB、③100ng/ml CXCL11 群、④100ng/ml CXCL12 群、⑤ ATSB+5 μ M AMD3100(CXCR4 antagonist)群、⑥ ATSB+5 μ M CCX771(CXCR7 antagonist)群。薬剤の注射投与は潰瘍作成 day0 と day7 の 2 回行い、day0、day5、day10 の 3 回創部の写真をデジタルカメラ(Nikon 1 J2, Nikon, 日本)で撮影した。撮影した画像を用いて潰瘍の上皮化面積を ImageJ を用いて測定した。

Day10 の撮影後に潰瘍組織の採取を行った。

(2)虚血-再灌流モデルの作成

8 週齢の ICR マウスをエスカイン(マイラン、大阪)を用いた吸入麻酔で入眠させ、

鼠径脂肪を剥離し、大腿動静脈遠位部からの分枝 1 本を血管茎として残し、その他の皮膚や周辺組織からの穿通枝血管を切離した。血管クリップを用いて血管茎を 3 時間遮断し、鼠径脂肪を虚血状態にし、3 時間後に 30 μ l の PBS、ケモカイン、阻害剤を鼠径脂肪に注射した。薬剤注射は虚血操作 day0 と day1 に行った。投与する薬剤の内容別に次の実験群を作成した。①PBS 群(コントロール)、②100ng/ml CXCL11 群、③100ng/ml CXCL12 群、④5 μ M AMD3100(CXCR4 antagonist)群、⑤5 μ M CCX771(CXCR7 antagonist)群、⑥20ng/ml anti-HMGB1 antibody 群、⑦20ng/ml anti-RAGE antibody 群、⑧20ng/ml anti-TLR2 antibody 群、⑨20ng/ml anti-TLR4 群。Day14 に鼠径脂肪検体を採取した。①、⑥、⑦、⑧、⑨群については、虚血再灌流処置前と day14 の検体摘出時に脂肪組織の体積を楕円体に近似して求め、記録した。

Adipose tissue socked buffer(ATSB)含有物質の評価：

Human Cytokine Array Panel A (R&D systems, Minneapolis, MN)を用いて、ATSB に含まれる物質のスクリーニングを行った。さらに、CXCL11、CXCL12、IL-17、HMGB1 の含有濃度を ELISA キットを用いて測定した(CXCL11、CXCL12、IL-17 : R&D systems / HMGB1 : シノテスト、東京)。ELISA に用いる ATSB は異なる 30 ロットを 10 ロットずつ混和し、3 系列の混和 ATSB を作成、測定して平均値を算出した。

Proliferation assay :

hASC を 10%FBS 入り DMEM 培地で培養し、P2 で実験に使用した。

96 ウェルプレートに hASC を 2×10^3 細胞/ウェルの濃度で播種し、6 時間培養した。

培養後、無血清培地に交換し、ATSB、ケモカイン、阻害剤を加えた。3 日感の培養後、

Cell Proliferation kit II (Roche, Basel, Switzerland)を用いて細胞活性の検討を行った。実

験系列は、ATSB の至適実験濃度検討のため、①PBS、②10% ATSB、③20% ATSB、④

30% ATSB の 4 系列、hASC のケモカインへの反応を検討するために④100ng/ml

CXCL11、⑤100ng/ml CXCL12 の 2 系列、ATSB の作用と CXCR4/CXCR7 の関連を検

討するために⑥20% ATSB+5 μ M AMD3100、⑦20% ATSB+5 μ M CCX771 の 2 系列、ATSB

作用と HMGB1 の関連性を検討するために⑧20% ATSB+20 μ g/ml anti-HMGB1 antibody、

⑨20% ATSB+20 μ g/ml anti-RAGE antibody、⑩20% ATSB+20 μ g/ml TLR2 antibody、⑪

20% ATSB+20 μ g/ml TLR4 antibody の 4 系列、合計 11 系列で施行した。

Migration assay :

hASC 遊走能への ATSB の影響を調べるために、Byden chamber assay を用いて

migration assay を行った。無血清 DMEM をコントロールとして、10% ATSB、20% ATSB、

30% ATSB 含有無血清 DMEM 600 μ l で under chamber を満たし、8 μ m pores の upper

chamber (Transwell; Coming Life Science, Lowell, MAS)に 2×10^5 個の P2 hASC 懸濁液

200 μ l を播種した。4 時間後に upper chamber を取り出し、メタノール固定、ギムザ染

色を経て 8 μ m pore 通過細胞をカウントした。

次に、hASC の遊走能と CXCR4/CXCR7、HMGB1 を介する経路の関連を検討するために Cytoselect 96-well cell migration assay(Cell Biolabs INC, San Diego, CA)を用いた migration assay を行った。実験手技は製品プロトコールに従って施行した。20%ATSB に以下に記載する阻害剤を加えた無血清 DMEM 150 μ l を under chamber 入れ、 3×10^5 個の P2 hASC を 100 μ l の無血清 DMEM 懸濁液を upper chamber に播種した。4 時間後に遊走細胞を計測した。

Capillary network formation assay :

P2 hASC を ATSB、ケモカイン、阻害剤を含む EBM で 24 時間培養、pretreatment した。薬剤の系列は、proliferation assay に順じて行った。 1.0×10^4 個ずつ 96well に満たしたマトリゲルの上に播種した。播種 4 時間後に顕微鏡で撮影し、capillary like network の長さを ImageJ で計測した。

免疫染色 :

虚血再灌流モデル、潰瘍上皮化モデルマウスから採取した組織は、亜鉛固定液(IHC Zinc Fixative; BD Biosciences, San Diego, Calif)で固定し、パラフィン包埋して 5 μ m 厚で切片化した。1 次抗体として、guinea pig anti-perilipin antibody[生存脂肪細胞マーカー](Progen, Heidelberg, Germany)、rat anti-MAC2 antibody[マクロファージマーカー]

(Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canada)、mouse anti-CD206 antibody[M2 マクロファージマーカー] (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas)、CD34[ASC マーカー](Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas)、Ki67[増殖細胞マーカー](Thermo Fisher Scientific Inc, 神奈川)を使用した。また、Alexa Fluor 488- または Alexa Fluor 568-conjugated (Molecular Probes, Carlsbad, Calif.)を 2 次抗体に使用して可視化した。核染色には Hoechst33342 (Dojindo, 熊本)を用いた。

生存脂肪組織割合の定量化：

虚血再灌流処置後 14 日目にマウスから採取した鼠径脂肪組織をペリリピンで免疫染色し、ペリリピン陽性領域の組織切片全体に占める割合を測定した。面積の測定は ImageJ を用いて行い、ペリリピン強陽性領域を生存脂肪組織として算定した。異なるマウスから採取した 3 検体の切片を用い、平均値で各群を比較した。

組織内有核細胞、マクロファージ、ASC 数の定量化：

潰瘍作成後 14 日目のマウス潰瘍組織と、虚血再灌流後 14 日目のマウス鼠径脂肪組織を免疫染色して各細胞割合の定量化を行った。1 つの検討系列につき異なるマウス組織から作成した切片 5 枚を用い、1 切片につき、100 μ m 四方 1 カ所の画像を取得、5 例の平均値で比較した。潰瘍組織では潰瘍縁の皮下組織で、虚血再灌流モデルでは線維化部分を避けて脂肪組織部分でカウント画像を取得した。

有核細胞はヘキスト陽性細胞としてカウントし、細胞数の平均を群間で比較した。

マクロファージはMAC2陽性細胞として、M1マクロファージはMAC2陽性/CD206陰性細胞として、M2マクロファージはMAC2陽性/CD206陽性細胞としてカウントを行い、M1、M2マクロファージのマクロファージ全体に占める割合を平均して群間で比較した。

有核細胞に占めるmASCの割合を、CD34陽性、Lectin陰性細胞をmASCとしてカウントし、群間の平均で比較した。

Flow cytometry :

脂肪組織のコラゲナーゼ処理により単離したSVFとP2hASCでのCXCR4/CXCR7発現をflow cytometerを用いて検討した。phycoerythrin(PE)-labeled anti-CD31[血管内皮細胞マーカー]、Fluorescein isothiocyanate(FITC)-labeled anti-CD34[幹細胞マーカー]、phycoerythrin-Cy7(PE-Cy7)-labeled anti-CD45[血球系細胞マーカー]、allophycocyanin(APC)-labeled anti CXCR4、allophycocyanin(APC)-labeled anti-CXCR7を使用して染色を行った。抗体はBD Bioscienceから購入して使用した。

統計学的解析 :

結果は平均±標準誤差で表記した。2群間の比較にはStudent t検定を用いた。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

(1) Adipose tissue socked buffer 作成と至適実験条件の検討

健常成人から摘出された吸引脂肪組織を等量のリン酸バッファーに漬け、37°C /200rpm の恒温振盪器処理を行った。処理時間は、1 時間、24 時間、48 時間とした。処理後、500µm、100µm、70µm、40µm、0.22µm の順にフィルター濾過を行い、脂肪組織傷害に伴い放出される傷害関連因子を Adipose tissue socked buffer(ATSB)として回収した。作成した ATSB は-80°Cで冷凍保管し、実験時に解凍して使用した。方法の項で記載した通り、脂肪組織検体の個体差を考慮した、10 ロット毎に混和して使用した。作成の概要を図 1A に示す。

次に、作成した ATSB を P2 hASC に投与して hASC の反応を観察した。ATSB の濃度は 20%に設定した。ATSB は hASC を増殖、遊走、angiogenesis において活性化した。活性化作用は図 1B に示す通り、48 時間の恒温振盪器反応から作成した ATSB で最も著明であった。

次いで、48 時間恒温振盪器処理した ATSB を使って、ATSB 濃度と hASC に対する活性化作用の関係を調べた。

結果を図 3 に示す。増殖能は ATSB の濃度依存性に効果増強を認めるが、遊走能では 30%で効果の減退を認め、angiogenesis では 20%以上で効果が頭打ちとなった。

これらの結果を踏まえ、ATSB の至適実験条件として、48 時間処理の ATSB を培地に対して 20%の濃度で用いることとした。

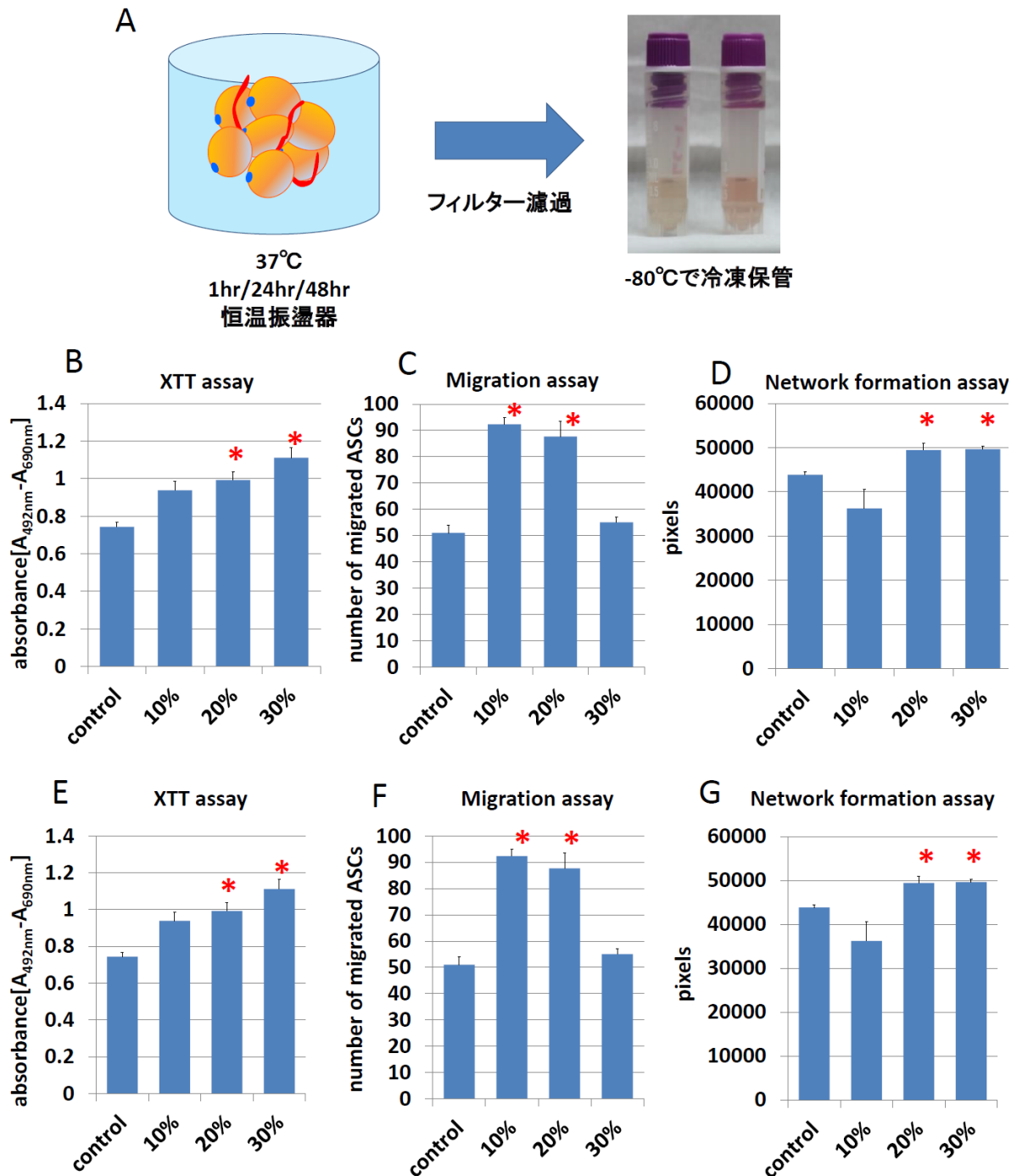


図 1 : Adipose tissue socked buffer の作成と至適実験条件の検討

(A) Adipose tissue socked buffer(ATSB)の作成法概要。

(B-D) ATSB による hASC の活性化。48 時間処理の ATSB で最も顕著な hASC 活性化効果を認める(n=3, *:p<0.05)。

(E-G) ATSB 濃度と ASC 活性化作用の関係。48 時間処理 ATSB を使用して検討した。20%で最も顕著な hASC 活性化作用を認めた(n=3, *:p<0.05)。

(2) ATSB による hASC 活性化経路の検討

我々の研究グループの先行研究において、hASC では循環血中の単球と比較して、CXCR7 遺伝子が発現亢進していることが示されていた。そこで我々は、CXCR7 とそのリガンドである CXCL11、CXCL12 に着目した。また、CXCL12 は CXCR4 のリガンドでもあり、CXCR7 と CXCR4 は 2 量体の形成やリガンドのスキャベンジング作用などで共役している可能性が示唆されている(53,54)ため、CXCR4 も検討の対象とした。

さらに、ATSB による hASC 活性化経路を網羅的に調べるためにマイクロアレイを行い、シグナル経路として IL-17、TREM1、HMGB1 がキーモレキュルとして示唆された(図 2)。

本章では、CXCR4 と CXCL11、CXCR7 と CXCL11/CXCL12、IL-17、TREM-1、HMGB1 とよく知られた受容体である RAGE/TLR2/TLR4 を介するシグナル伝達について検討する。

<GO term of upregulation>
Immune Cell Trafficking
Organ Morphology
Tissue Development
Hematopoiesis

<Possible ATSB components>
PDGF-BB
TNFalpha
INFalpha, beta
HGF, VEGF
Prostaglandin E2

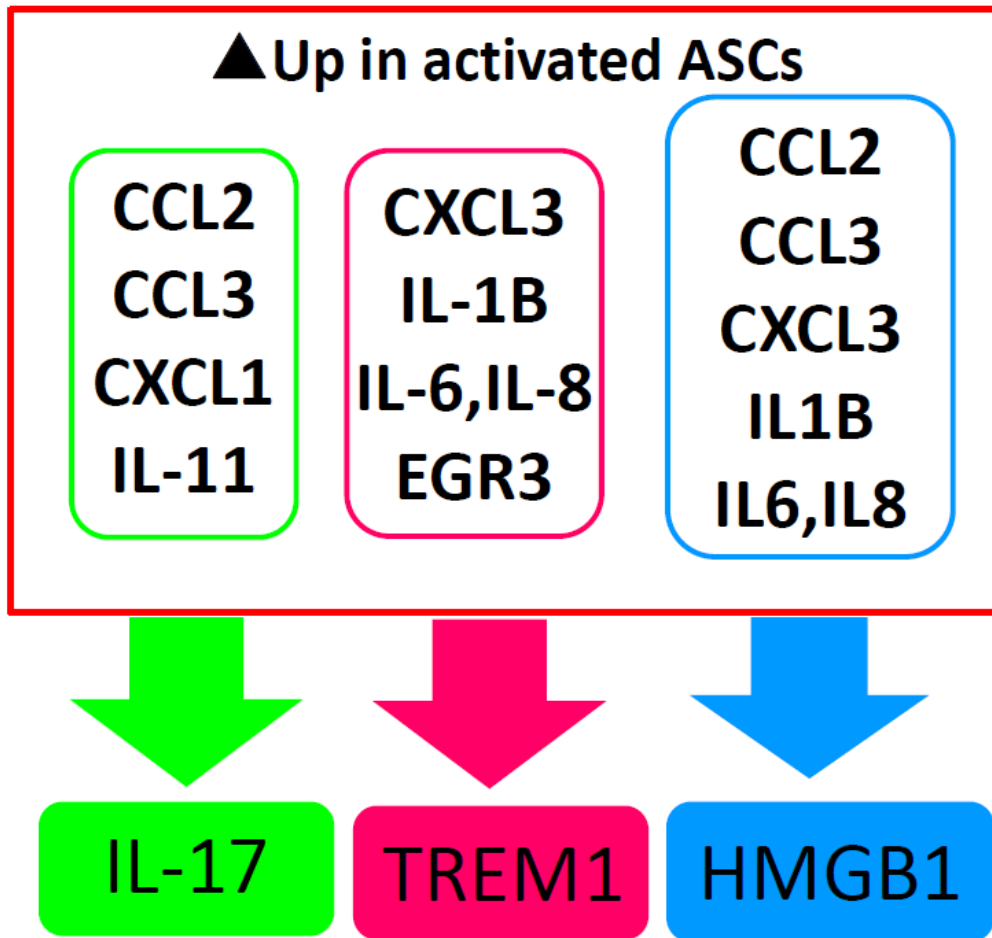


図2：脂肪組織傷害関連因子による hASC 活性化経路のスクリーニング

ATSB 活性化 hASC と ATSB 非投与 hASC での遺伝子発現をマイクロアレイで比較した。ATSB 活性化 hASC において非活性化 hASC より 2 倍以上発現差のある遺伝群を用いて解析を行うと、IL-17、TREM1、HMGB1 の 3 つが ATSB による hASC 活性化のキーモレキュルである可能性が示唆された。

① : hASC における CXCR4/7 を介したシグナル伝達

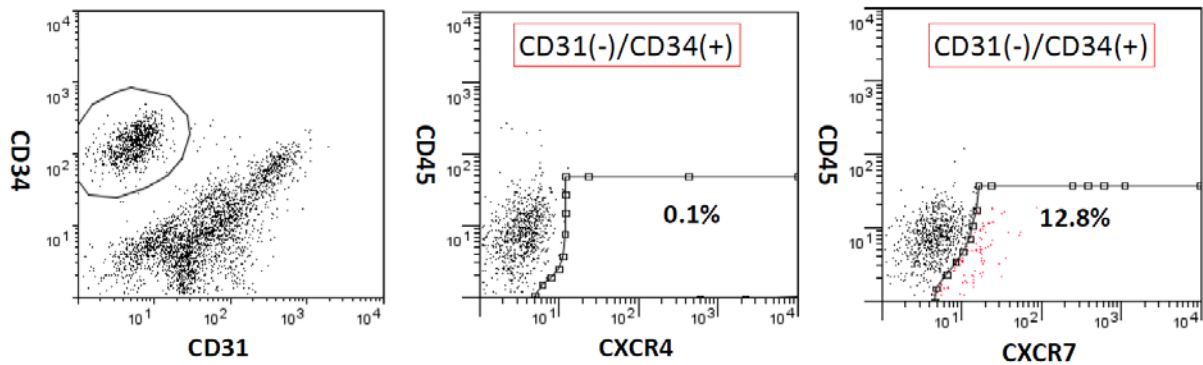
まず、CXCR4 と CXCR7 の hASC 上での発現を確認した。

hSVF 細胞における非培養 hASC での結果を図 3A、培養 hASC での結果を図 3B、培養 hASC を用いた細胞免疫染色を図 3C に示す。図 3A では、培養前の hASC の約 10%に CXCR7 が発現していることが判る。図 3B を見ると、培養により CXCR7 の発現は低下しており、CXCR4 は培養前後に関わらず発現割合が少なかった。CXCR7 > CXCR4 の発現傾向は培養前後で変化しなかった。

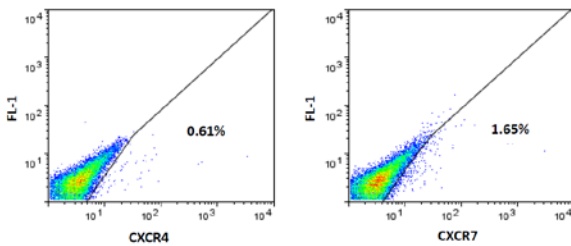
hASC 上での発現を確認した CXCR4 と CXCR7 の ATSB 作用への関与を確認するために、CXCR4 と CXCR7 阻害下での hASC に対する ATSB 作用を調べた。各受容体阻害には競合的阻害剤を用い、CXCR4 阻害には AMD3100、CXCR7 阻害には CCX771 を用いた。図 3D に示す通り、hASC の増殖能は CXCR4、CXCR7 いずれの阻害でも低下し、hASC の遊走能は CXCR7 の阻害で、angiogenesis は CXCR4 の阻害で低下を認めた。

以上のことから、hASC の脂肪組織傷害関連因子への応答には、CXCR4 と CXCR7 が関与していることが示唆された。

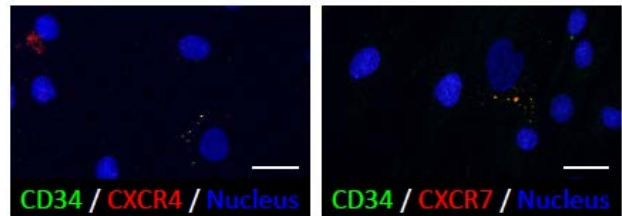
A



B



C



D

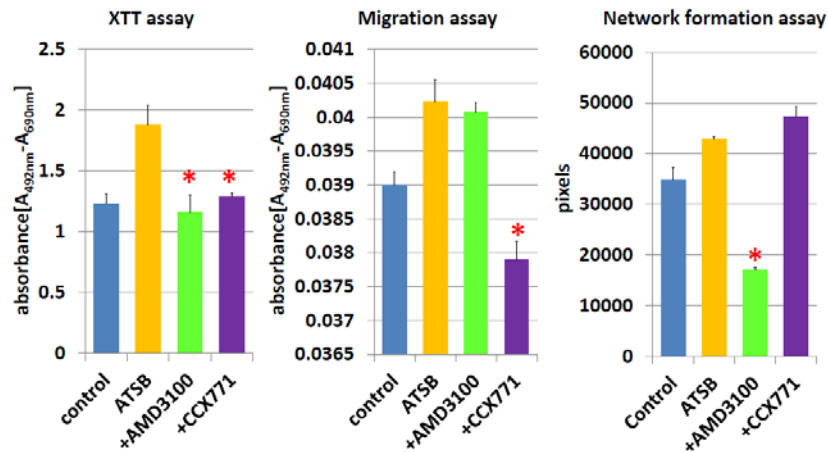


図 3 : hASC における CXCR4/7 を介したシグナル伝達

(A) 非培養 hASC における CXCR4/CXCR7 の発現。約 10% に CXCR7 が発現している。hSVF 細胞のうち、CD45 陰性、CD31 陰性、CD34 陽性の細胞集団を hASC とし、CXCR4 と CXCR7 の発現割合を測定した。(B) 培養 hASC における CXCR4/CXCR7 の発現。(C) 培養 hASC の細胞免疫染色による CXCR4、CXCR7 の検出。(Scale bar=30 μ m) (D) CXCR4/CXCR7 阻害下における ASC の ATSB に対する反応(n=3, * :p<0.05)。hASC の増殖能はいずれの受容体阻害でも低下し、遊走能は CXCR7、angiogenesis は CXCR4 阻害で低下することがわかる。

②：ATSB に含有される脂肪組織傷害関連因子の検索

CXCR4 のリガンドである CXCL12、CXCR7 のリガンドである CXCL11、CXCL12 が ATSB に含まれていることを Human Cytokine Array Panel A を用いて確認した。図 4A に示す通り、ATSB にはいくつかの炎症性サイトカインやケモカインが含まれており、CXCL11 が含まれていることが示されたが、CXCL12 は検出できなかった。そこで、さらに ELISA 法で ATSB 中の CXCL11 と CXCL12 の検出を試みた。異なる 10 ロットを混和して 1 系列とし、3 系列の平均値を求めた。図 4B に示す通り、ATSB 中の CXCL11、CXCL12 含有を確認した。

また、CXCL11 と CXCL12 が hASC を活性化することを確認するために、培養 hASC にリコンビナント CXCL11、CXCL12 を加えて反応を観察した。図 4C に示す通り、リコンビナント CXCL11、CXCL12 は hASC の増殖能、遊走能、血管新生能を活性化した。

次いで、ATSB 中の CXCL11 と CXCL12 が hASC 活性化に関与していることを明確にするため、ATSB に CXCL11 または CXCL12 の中和抗体を添加し、hASC の反応を検討した。図 4D に示すように、ATSB 中の CXCL11、CXCL12 中和により、ATSB による hASC 活性化能が損なわれた。

以上の結果から、ATSB に含まれる CXCL11、CXCL12 が hASC の活性化プロセスに寄与していることが示唆された。

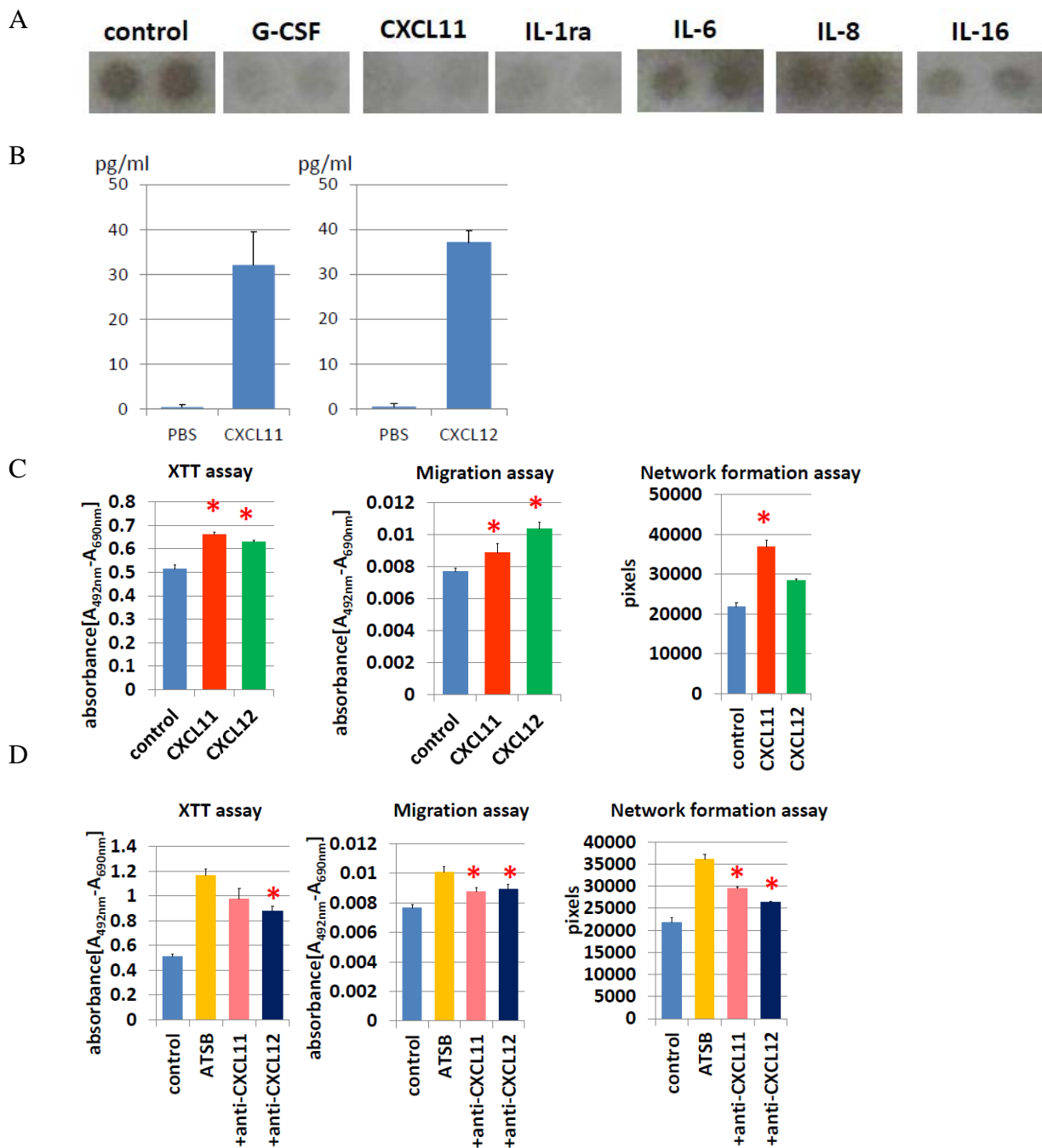


図4：ATSBに含有される脂肪組織傷害関連因子の検索

(A)ATSBのサイトカインアレイ結果。炎症性サイトカインとケモカインが含有されていることが示された。(左端は陽性コントロール)

(B) ATSBのELISA(3系列分の平均値を示す)。

(C)リコンビナントCXCL11、CXCL12によるhASCの活性化(n=3,*:p<0.05)。CXCL11とCXCL12はhASCを活性化した。

(D) ATSB中のCXCL11、CXCL12中和効果(n=3,*:p<0.05)。CXCL11、CXCL12の中和により、ATSBによるhASC活性化作用が低下した。

③ : IL-17 検出の試み

図 2 で示したマイクロアレイアッセイの結果を踏まえ、ATSB に含まれる IL-17 の検出を試みた。図 5A に示すように恒温振盪器処理時間 1 時間の ATSB に比較して、処理時間 48 時間の ATSB で IL-17 の含有量増加を確認した。しかし、図 4 で検討した CXCL11 と CXCL12 に比較すると IL-17 濃度は検体間での濃度差が大きく、必ずしも hASC 活性化に不可欠とは判定できなかった。

④ : TREM1 検出の試み

同じくマイクロアレイの結果から示唆された TREM1 の関与について調べることにした。TREM1 はマクロファージや白血球に発現し、免疫反応のコントロールに関与していることが知られている(20)。また、細胞質内のアダプタータンパクとして DAP12 と協働することも知られている(20)。そこで、我々は、細胞免疫染色を用いて、TREM1-DAP12 の hASC での発現を検討した。

図 5B に示すように、培養 hASC 上での TREM1-DAP12 axis の存在が確認できた。

しかし、hASC 上での陽性率は非常に低く、顕微鏡視野ではほとんど見つからなかった。CXCR7 と比べてもその陽性率の低さは明らかであった。

ATSB による hASC 活性化機序において、部分的に TREM1-DAP12 が関与している可能性が示唆されるものの、普遍的なパスウェイとは判定できなかった。

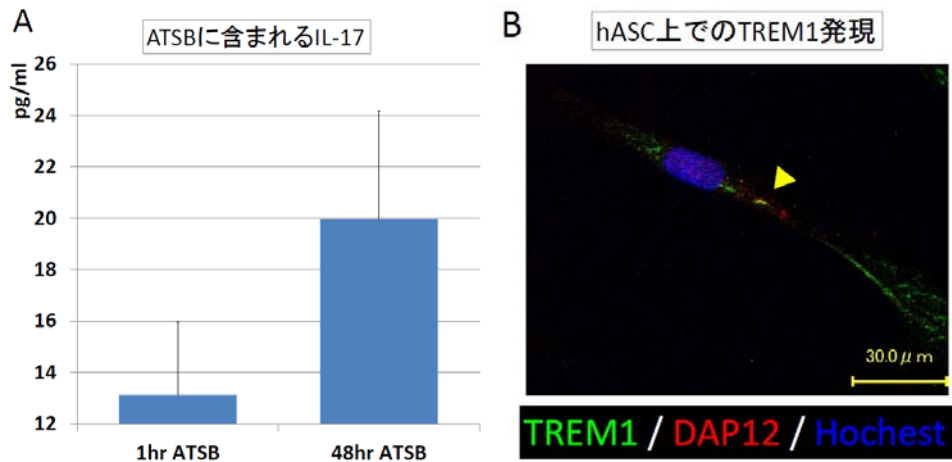


図5：IL-17とTREM-1を介するシグナル経路に関する検討

(A) ELISAキットを用いてATSB中のIL-17検出を試みた。異なる30ロットから10ロット分ずつ3系列作成して測定を行った。平均値を示す。検体による濃度差が大きく、2群間での統計学的有意差は無かった。

(B) 細胞免疫染色によりTREM1とその共役タンパクであるDAP12の検出を試みた。ごくわずかな培養hASCにおいて、TREM1-DAP12の発現が確認できた。

(Scale bar=30μm)

⑤：ATSBに含まれるHMGB1と、hASC上の受容体発現

HMGB1は組織傷害関連因子の代表的な物質である。図2のマイクロアレイの結果からもHMGB1の存在が示唆されたことから、ATSB中にHMGB1が含まれる可能性が高いと考えられた。そこで、ELISAによるATSB中のHMGB1濃度計測を行った。図6Aに示すように、恒温振盪器での処理時間が長くなるほどATSBに含まれるHMGB1が増加しており、脂肪組織の損傷に伴う分泌過程が想定された。

また、HMGB1の主要な受容体であるRAGE、TLR2、TLR4について、培養hASC上での発現を、細胞免疫染色を用いて確認した。図6Bに示すように、いずれの受容体タンパクもhASC上に発現していることが確認できた。特にRAGEタンパクについては陽性hASCの比率が高く、HMGB1によるhASC活性化において重要な経路を担っている可能性が示唆された。

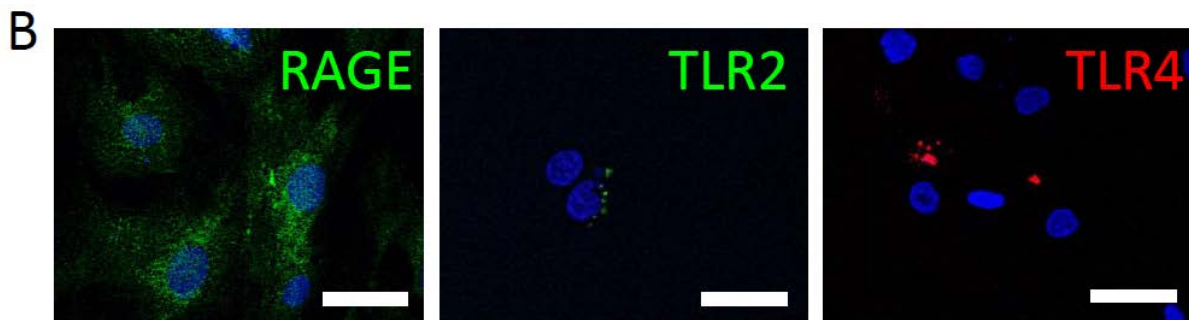
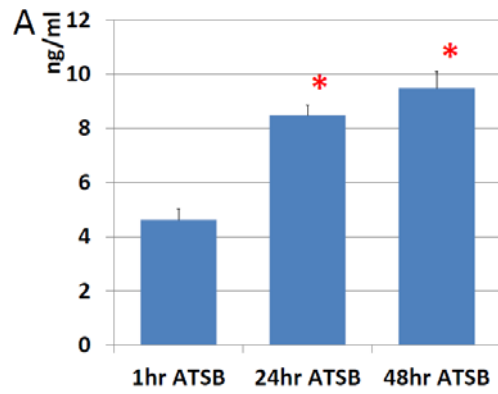


図 6 : ATSB に含まれる HMGB1 と、hASC 上の受容体発現
 (A)ATSB 中の HMGB1 を ELISA で測定。(n=3,*: p<0.05)
 (B)細胞免疫染色による hASC 上での HMGB1 受容体発現検討。(Scale bar=30μm)

⑥ : HMGB1 を介する hASC の活性化

HMGB1 とその受容体が ATSB による hASC 活性化に関わっていることを明確にするために、HMGB1 中和下での ATSB 作用を確認した。図 7A-C に示すように、HMGB1 阻害により、hASC の増殖、遊走、angiogenesis が阻害された。特に hASC の遊走と angiogenesis についてはコントロール群である PBS 投与群と同程度まで抑制されており、ATSB 中の HMGB1 の関与が強いことが判る。反面、hASC の増殖については阻害が弱く、ATSB に含まれる HMGB1 以外の物質の関与が強く示唆される。図 4A に示す通り、ATSB には様々なサイトカインが含まれていることが明らかであり、この結果と矛盾しない。

また、HMGB1 の代表的受容体である RAGE、TLR2、TLR4 を阻害した hASC に ATSB を投与すると、angiogenesis の抑制が顕著に見られた。増殖能は TLR4 阻害で、遊走能は TLR2 阻害で ATSB 作用の減弱を認めた。結果を図 7D-E に示す。ここでも、増殖能、遊走能においては今回の受容体阻害で ATSB 作用の減弱は認めるものの、完全に阻害するまでには至らず、他の hASC 活性化経路の存在が示唆される。

HMGB1 とその受容体を介するシグナルは、hASC の angiogenesis 活性においてもっとも顕著に影響していることが示された。

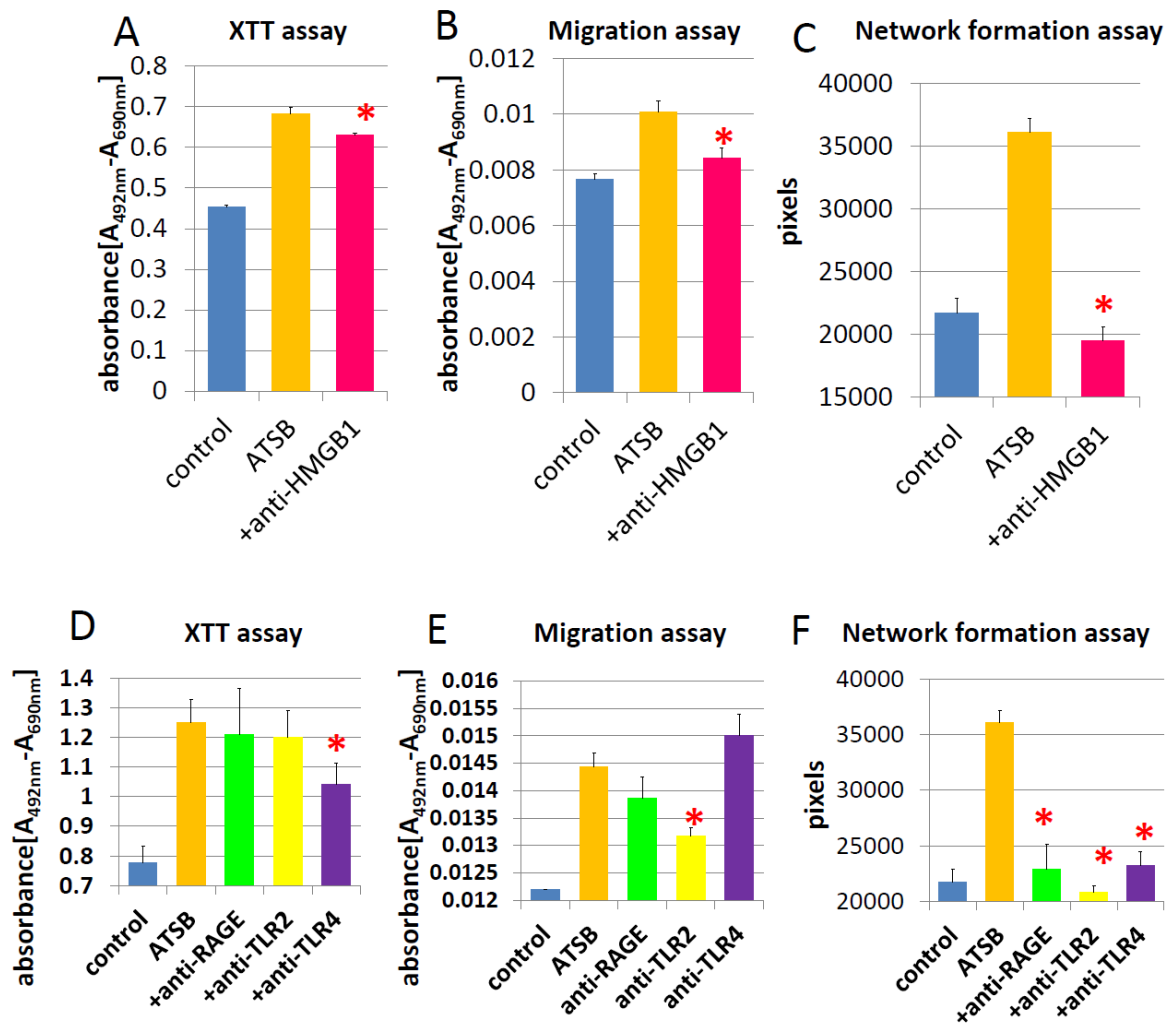


図7：HMGB1を介するhASCの活性化

(A-C)HMGB1 中和 ATSB による hASC 活性化検討。 A:XTT assay、 B:migration assay、 C:network formation assay (n=3,*:ATSB 群と比較して p<0.05)

(D-F)RAGE、 TLR2、 TLR4 阻害下での ATSB による hASC 活性化。 D:XTT assay、 E:migration assay、 F:network formation assay (n=3,*:ATSB 群と比較して p<0.05)

(3)脂肪組織由来傷害関連因子によるマクロファージ、ASCs への作用

ここまでの検討で、脂肪組織由来傷害関連因子に CXCL11、CXCL12、HMGB1 が含まれ、これらの受容体が ASCs 活性化に関与していることが示された。

組織ダメージの典型として虚血状態が挙げられる。我々は、ICR マウスの単径脂肪組織を用いた虚血再灌流モデルと db/db マウスを用いた糖尿病性難治性皮膚潰瘍モデルを用いて、虚血組織におけるリモデリング過程や潰瘍上皮化過程に CXCR4-CXCL12 axis と CXCR7-CXCL11/CXCL12 axis がどのような影響を及ぼすのか、組織変化と組織内のマクロファージに着目して検討した。

また、HMGB1 は ATM と ASCs の相互反応を介して血管新生を促進し、M1/M2 マクロファージの遊走を調整することが知られている(8,49)。そこで、HMGB1 とその受容体を介するシグナル伝達についても ICR マウス単径脂肪組織を用いた虚血再灌流モデルを用いて、脂肪組織のリモデリングプロセスとマクロファージの関係、ASCs 活性の変化に焦点を当てて検討を行った。

①：虚血による脂肪組織傷害と組織再生過程への CXCR4、CXCR7 の関与

CXCR4/CXCR7 とそのリガンドである CXCL11/CXCL12 のシグナル経路は齧歯類にも認められる経路である(16,17,18,19)。そこで ICR マウスを用いた鼠径脂肪の虚血再灌流モデルを作成し、脂肪組織の虚血傷害から血行再開、組織再構築の経過を観察できるモデルとして使用した。尚、ヒトと齧歯類で CXCL11、CXCL12 の分子構造に差

がなく、クロスリアクションがあるため、本実験においてはリコンビナント・ヒト CXCL11/CXCL12 を実験に用いた。

HE 染色標本を図 4A、D、G、I、M に示す。CXCL11 または CXCL12 投与群で線維化の進行を認め、リモデリングプロセスの促進が窺える。対して、CXCR4 阻害群と CXCR7 阻害群においては脂肪細胞壁の脆弱化に加え、変形して壊死していると思われる脂肪細胞が処理されずに放置されている。

虚血障害脂肪組織内に遊走してきた細胞集団とマクロファージの関連性を検討するために、ペリリピン(生存脂肪細胞マーカー)、MAC2(マクロファージマーカー)、CD206(M2 マクロファージマーカー)で免疫染色を行った。染色像を図 4 に示す。CXCL11、CXCL12 投与群で M2 マクロファージ(MAC2 陽性、CD206 陽性)の遊走が目立ち、HE 染色のリモデリング促進所見と一致する。対して CXCR4 阻害群では M1 マクロファージ主体になっており、M2 マクロファージの活性不足が組織リモデリングを妨げることを示す所見である。さらに CXCR7 阻害群では M1、M2 ともにマクロファージの遊走が阻害されており、HE 染色標本で認めた壊死組織の処理能力減退はマクロファージ遊走阻害と関連することが強く示唆される。

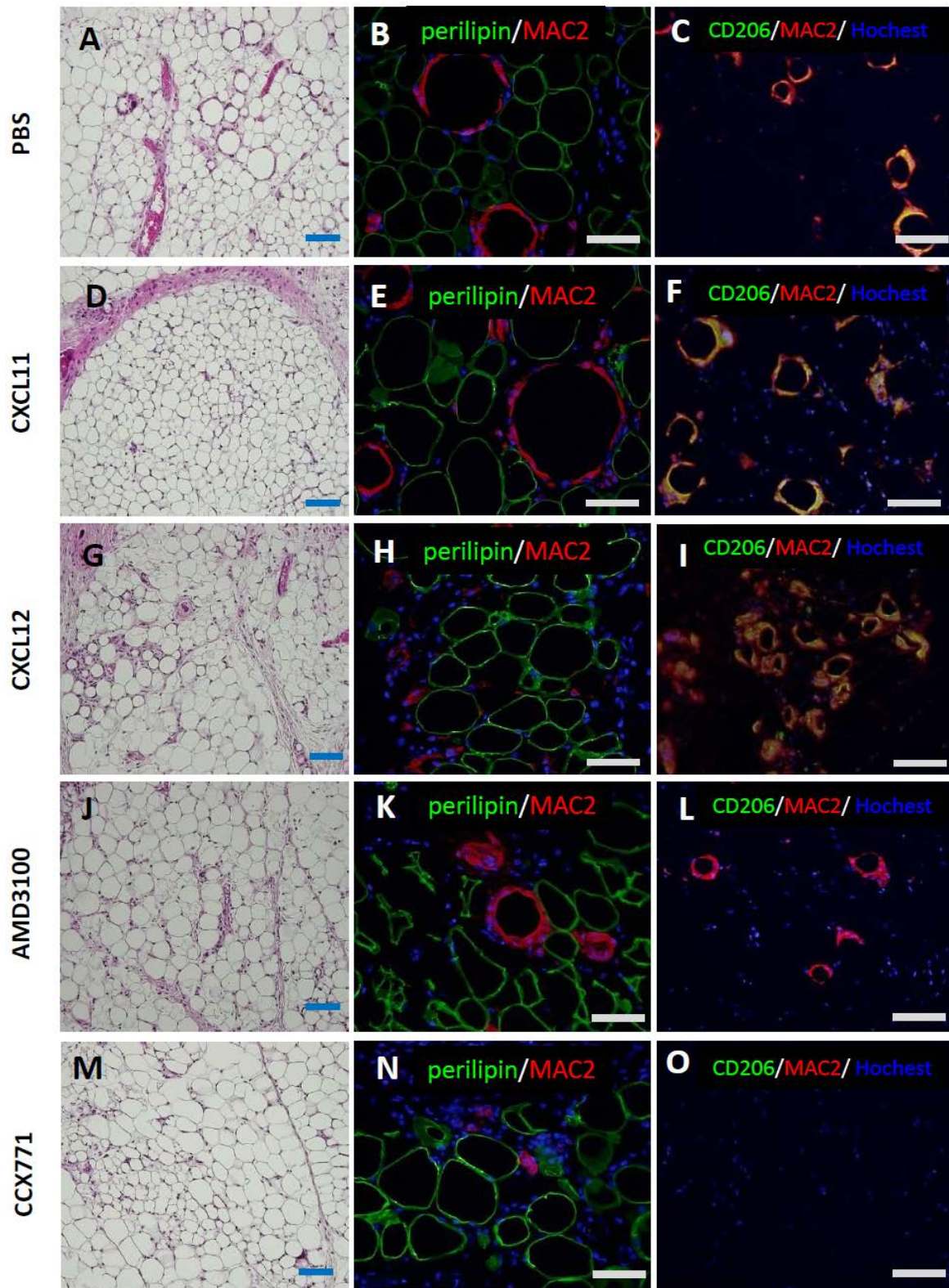


図 8 : 虚血ダメージ後の脂肪組織染色

ケモカイン投与群では M2 マクロファージの遊走が顕著であり、AMD3100(CXCR4 阻害剤)投与群では M1 マクロファージの遊走が顕著である。CCX771(CXCR7 阻害剤)投与群ではマクロファージ遊走自体が阻害されている。(Scale bar = 50 μ m)

②：虚血傷害後の脂肪組織とマクロファージ遊走

図 8 の染色標本を用いて、生存脂肪組織割合とマクロファージについて定量化を行った。

まず、ペリリピン染色(生存脂肪組織マーカー)により生存領域の割合を計測した。

図 9A に示すように CXCL11、CXCL12 投与群では切片におけるペリリピン陽性領域の割合が高く、CCX771 投与群では低かった。CXCL11/CXCL12 の組織保護作用を示すとともに、CXCR7 阻害による脂肪組織傷害の広がりが増大された。また、CXCR4 阻害群においても統計学的に有意ではなかったが、CXCR7 阻害時と類似の効果が認められた。

次に、ヘキスト染色による細胞数のカウントを行った。図 9B に示す通り統計学的有意差は無かったが、PBS 投与群と比較して、ケモカイン投与群と受容体阻害群では脂肪組織内に遊走する細胞数の増加を認めた。

また、遊走してきた組織中の M1 マクロファージ(MAC2 陽性、CD206 陰性)と M2 マクロファージ(MAC2 陽性、CD206 陽性)の割合を計測した。図 9C、D に示すように、CXCR4 阻害により M1 マクロファージが優勢となり、CXCR7 阻害によりマクロファージの遊走自体が阻害されていることがわかる。

図 8 の組織所見と併せて、CXCR4 と CXCR7 を介したマクロファージの活性化、特に M2 マクロファージの活性と、組織リモデリング活性の関連が増大された。

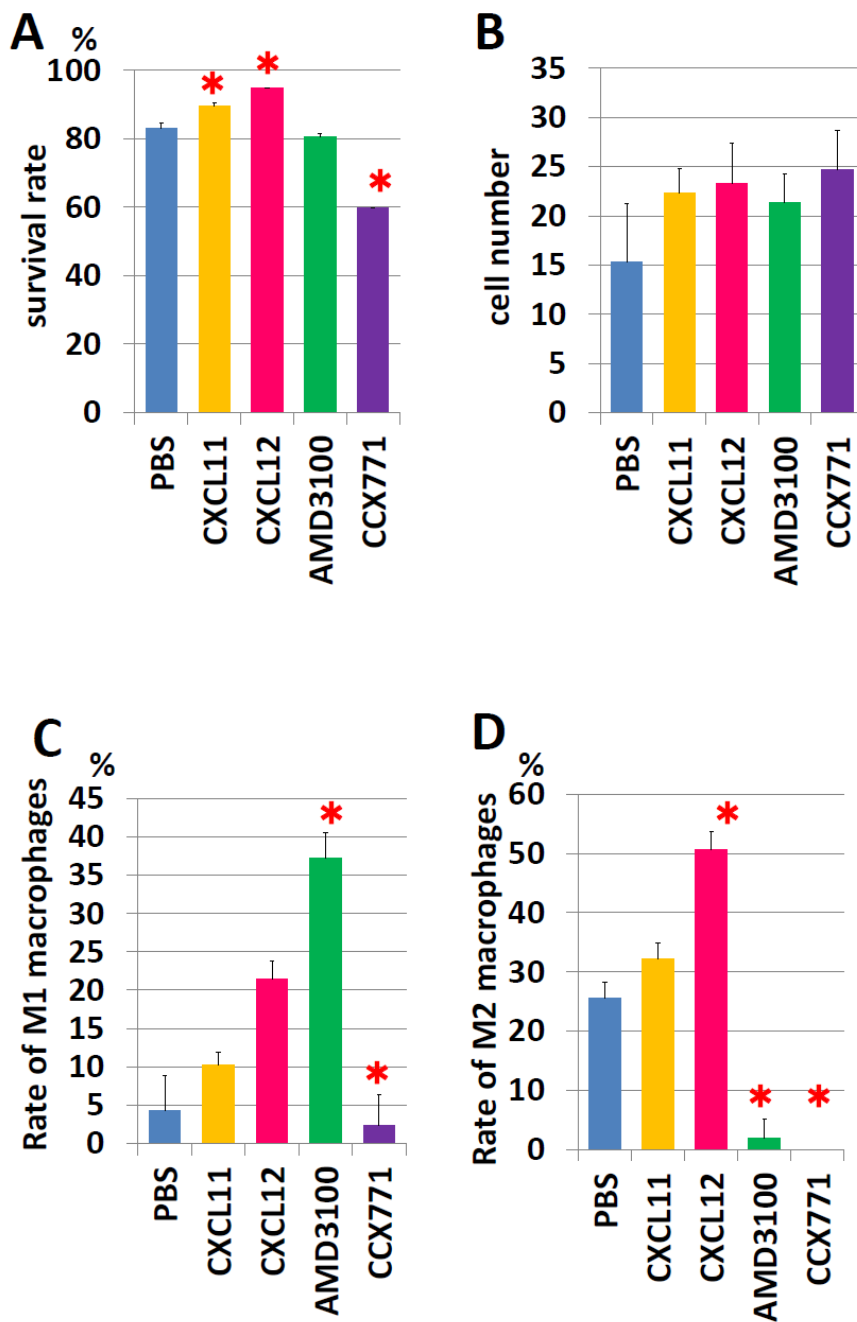


図9：虚血傷害後の脂肪組織とマクロファージ遊走

(A)ペリリピン染色による組織生存割合の計測。ペリリピン陽性領域を生存脂肪組織として、全体に占める割合を定量化した(n=3,*:PBS 群と比較して p<0.05)。 (B)組織内の有核細胞数の定量化。統計学的な有意差は無かったが、ケモカイン投与群と CXCR4/CXCR7 阻害群で細胞数増加傾向を認めた(n=5,*:PBS 群と比較して p<0.05)。 (C)有核細胞に占める M1 マクロファージの割合。(n=5,*:PBS 群と比較して p<0.05) (D)有核細胞に占める M2 マクロファージの割合。(n=5,*:PBS 群と比較して p<0.05)

③：難治性創傷における組織傷害因子と CXCR4、CXCR7 の役割

糖尿病マウスである db/db マウスの背部に直径 6mm の全層性皮膚欠損潰瘍を作成し、潰瘍縁に ATSB や ATSB+CXCR4 阻害剤、ATSB+CXCR7 阻害剤の組み合わせを投与し、上皮化の経過を観察した。

図 10A に示す通り、ATSB 投与群では潰瘍上皮化が促進されていることがわかる。

図 10B を見ると、CXCL11 か CXCL12 を投与された群では ATSB よりも潰瘍上皮化が促進されていることがわかる。対して、ATSB とともに、AMD3100(CXCR4 antagonist) か CCX771(CXCR7 antagonist)を投与した群では上皮化が阻害されている。

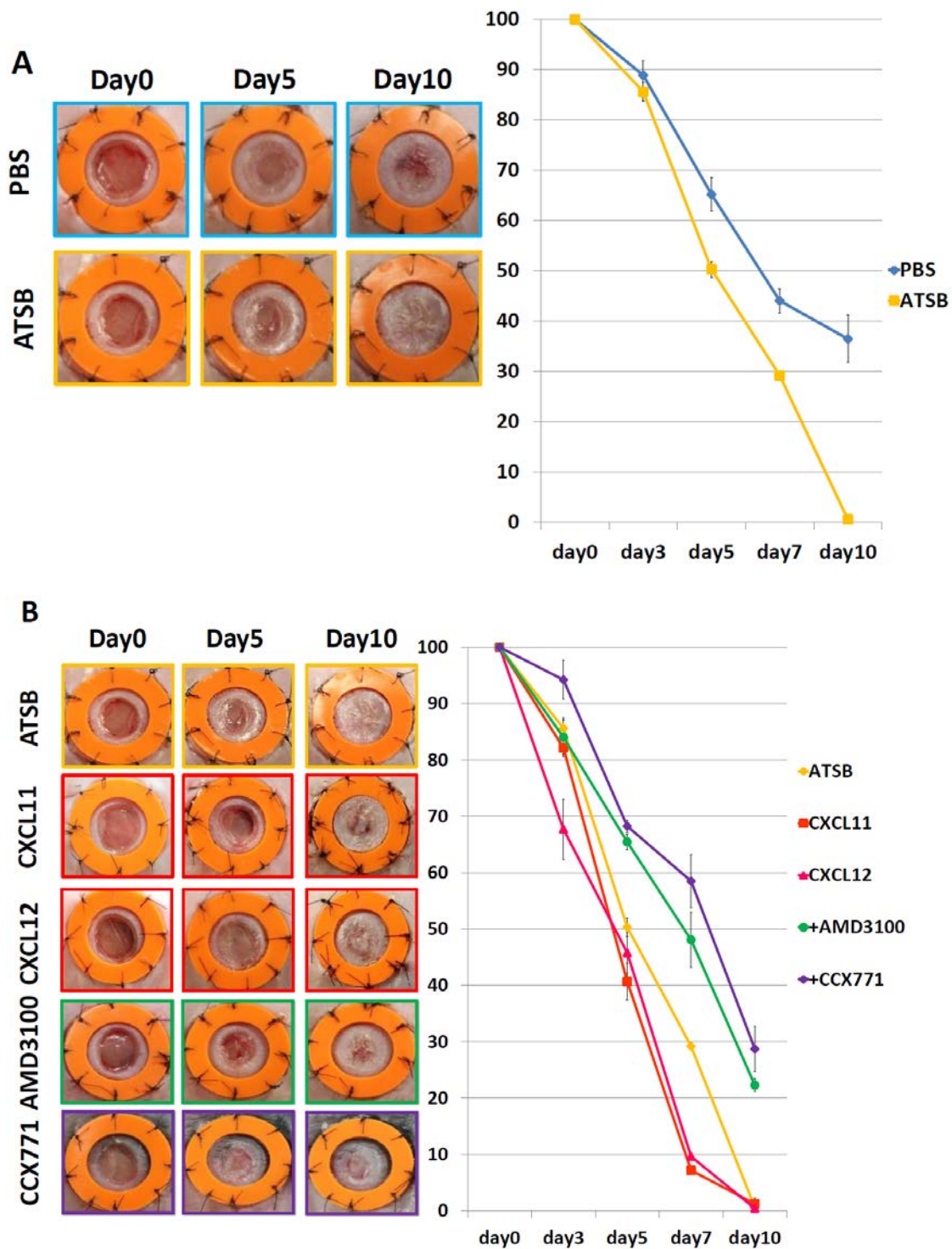


図 10：難治性創傷における組織傷害因子と CXCR4、CXCR7 の役割

(A)db/db マウスの潰瘍縁に PBS、ATSB を投与して比較した。ATSB により潰瘍の上皮化が促進されている。(n=3)

(B)ATSB、CXCL11、CXCL12、及び、ATSB+AMD3100、ATSB+CCX771 投与下での潰瘍上皮化経過。CXCL11 と CXCL12 の投与群で上皮化促進が認められ、AMD3100(CXCR4 antagonist)や CCX771(CXCR7 antagonist)が ATSB の潰瘍上皮化促進作用を阻害していることがわかる(n=3)。

④：潰瘍上皮化モデルにおける組織検討

図 10 で示した潰瘍モデルの潰瘍縁部分の組織を採取し、虚血再灌流モデルの炎症細胞遊走検討に用いたのと同様の手順で、潰瘍縁に遊走している細胞種の検討を行った。

図 11A に免疫染色写真を示す。PBS 投与群では M1 マクロファージが主ながら M2 マクロファージの遊走も認められる。ATSB、CXCL11、CXCL12 投与群では CD206 陽性の M2 マクロファージが遊走細胞の主役となっている。また、ATSB+AMD3100(CXCR4 阻害剤)投与群では M1 マクロファージ主体の細胞遊走を認め、ATSB+CCX771(CXCR7 阻害剤)投与群ではマクロファージの遊走がほとんど認められなくなっている。

遊走細胞の定量化結果を図 11B～D に示す。定量化の方法は図 9 で示した際と同様である。まず、ヘキスト染色による細胞数のカウントを行った。図 11B に示す通り、ATSB 投与群と ATSB+AMD3100(CXCR4 阻害剤)投与群で遊走有核細胞数が多かった。

次に遊走してきた組織内で、M1 マクロファージ(MAC2 陽性、CD206 陰性)と M2 マクロファージ(MAC2 陽性、CD206 陽性)の遊走細胞に占める割合を計測した。図 11C、D に示すように、CXCR4 阻害により M1 マクロファージが優勢となり、CXCR7 阻害によりマクロファージの遊走自体が阻害されている。これは図 8、9 で示した ICR マウス単径脂肪組織を用いた虚血再灌流モデルと同様の結果である。

これらの結果から、糖尿病マウスの難治性潰瘍において、ATSB や CXCL11、CXCL12 が適切な炎症細胞誘導により上皮化を促進しており、シグナル伝達に参与している CXCR4 と CXCR7 の阻害により細胞誘導効果が阻害され、難治性潰瘍における炎症制御能が阻害されることが示された。

虚血再灌流モデルの結果と併せ、脂肪組織由来傷害関連因子によるマクロファージ活性のコントロールと、それに伴う局所での炎症反応・リモデリング反応のコントロールが CXCR4、CXCR7 を介するシグナル伝達で行われていることが示された。

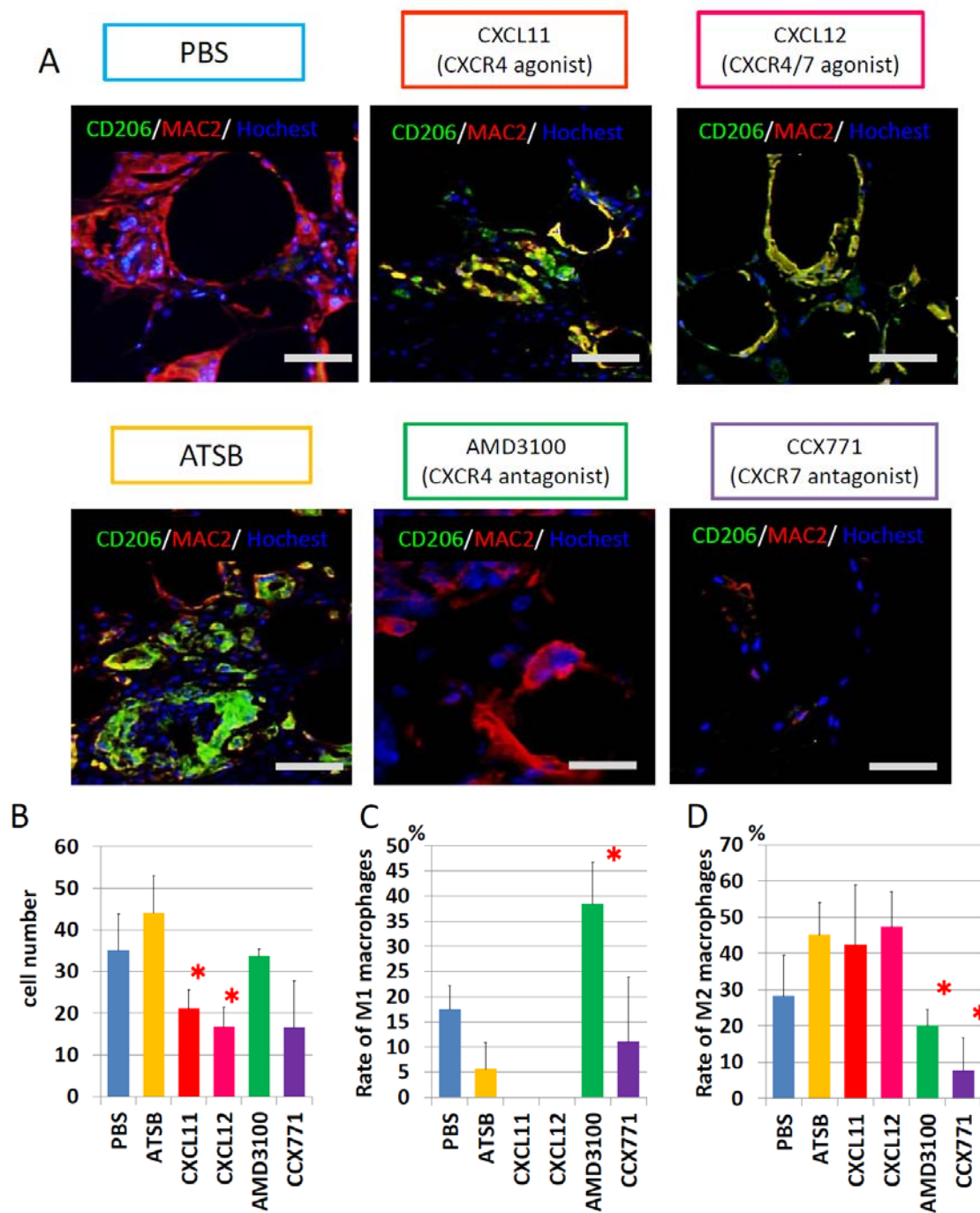


図 11：潰瘍上皮化モデルにおける組織検討

(A)薬剤投与部である潰瘍縁へのマクロファージ遊走。緑：CD206、赤：MAC2、青：核。Scale bar = 30 μ m

(B) 組織内の有核細胞数の定量化。CXCL11、CXCL12、ATSB+CCX771 投与群で遊走有核細胞の減少を認めた。(n=5,*:PBS 群と比較して $p<0.05$)。 (C)有核細胞に占める M1 マクロファージの割合。CXCL11、CXCL12 投与群では (n=5,*:PBS 群と比較して $p<0.05$) (D)有核細胞に占める M2 マクロファージの割合。(n=5,*:PBS 群と比較して $p<0.05$)

⑤：虚血による脂肪組織傷害と組織再生過程への HMGB1 の関与

脂肪組織虚血再灌流モデルマウスを用いて、虚血ダメージ下の脂肪組織傷害と傷害後修復過程への HMGB1 とその受容体の関与を検討した。

ATSB 中の HMGB1、hASC 上での発現を確認した RAGE、TLR2、TLR4 はいずれも種を超えて保存されていることが知られているタンパクであるため(21)(22)(23)、マウスでの実験環境とヒト組織での環境が近似できるものと考えた。

まず、虚血再灌流傷害を与えたマウスの鼠径脂肪組織に HMGB1 中和抗体、RAGE 阻害剤、TLR2 阻害剤、または TLR4 阻害剤を投与し、2 週間後の組織変化を観察した。虚血再灌流前の脂肪組織体積と比較した実験後脂肪組織の体積割合を図 12A に示す。PBS 群の体積に比して HMGB1 阻害群では虚血再灌流前よりも組織体積が小さく、RAGE や TLR4 阻害群で組織萎縮が目立った。

脂肪組織の状態を確認するために、図 12A で用いた組織をペリリピン(生存脂肪細胞マーカー)と MAC2(マクロファージマーカー)で免疫染色を行った。図 12B に染色像を示す。PBS 投与群ではマクロファージの遊走と脂肪細胞の新生が認められるのに対し、HMGB1 阻害群では脂肪組織新生が抑えられ、RAGE 阻害群ではマクロファージ遊走、壊死脂肪細胞の除去反応、組織リモデリングのいずれも立ち遅れが目立ち、TLR2 阻害群ではマクロファージ遊走はあるものの脂肪細胞の新生が見られず、TLR4 阻害群ではマクロファージ遊走のみでリモデリングの遅れが目立った。検体組織における生存脂肪細胞(ペリリピン陽性部分)の占める面積を定量化し、図 12C に示す。マ

クロの所見において収縮が顕著であった RAGE 阻害群と TLR4 阻害群において、生存脂肪細胞面積の低下を認めた。

次に、遊走してきたマクロファージのフェノタイプを調べるために、MAC2(マクロファージマーカー)と CD206(M1 マクロファージマーカー)での免疫染色を行った。RAGE 阻害群ではマクロファージ遊走の阻害が観察された。その他の実験群では M2 マクロファージ主体の遊走を観察した。染色像を図 12D に示す。図 12D の染色像をもとに、遊走細胞数 (図 12E)、遊走細胞数に占める M1 マクロファージの割合(図 12F)、M2 マクロファージの割合(図 12G)の定量化を行った。RAGE においてはマクロファージマーカー陰性の小さな炎症細胞の集簇を認める。視野によっては M1 マクロファージの遊走を認める部位もあるが、胞体は小さく、活性化状態にあるかは疑わしい。また、TLR4 阻害群での定量化では、遊走有核細胞自体の減少があるため、見かけ上 M2 マクロファージの割合が増大している。しかし、図 12D の染色像を参照すると、きわめて細胞質の小さなマクロファージが見て取れる。RAGE 阻害群で認められたのと同じく、機能不全に陥っているマクロファージを観察している可能性がある。

ここでも、HMGB1 の中和阻害、あるいは、受容体の阻害により程度の差はあるが、マクロファージの遊走が阻害されていることがわかり、組織リモデリング過程の障害が発生していることがわかる。

有核細胞に占める ASCs(CD34 陽性、lectin 陰性細胞)の割合を定量化し、図 12I に示す。非阻害群である PBS 投与群に比して、HMGB1 阻害群と HMGB1 受容体阻害群で

の ASCs 増殖活性は減退していた。また、HMGB1 の中和か受容体阻害により ASCs の数自体が減少しており、特に RAGE 阻害群と TLR4 阻害群での減少が顕著である。

この所見は図 12A で認めた組織収縮所見と一致している。

さらに、HMGB1 とその受容体阻害に伴う ASC 活性の変化について観察するため、CD34(組織幹細胞マーカー)と Ki67(細胞増殖活性マーカー)を用いた免疫染色を行った。染色像を図 12J に示す。

これらの結果より、HMGB1 とその受容体を介するシグナルは、虚血傷害を受けた脂肪組織におけるマクロファージ遊走と ASCs 活性の制御に関与し、壊死細胞の処理、からリモデリング反応に至る重要なシグナル伝達経路であることが示された。

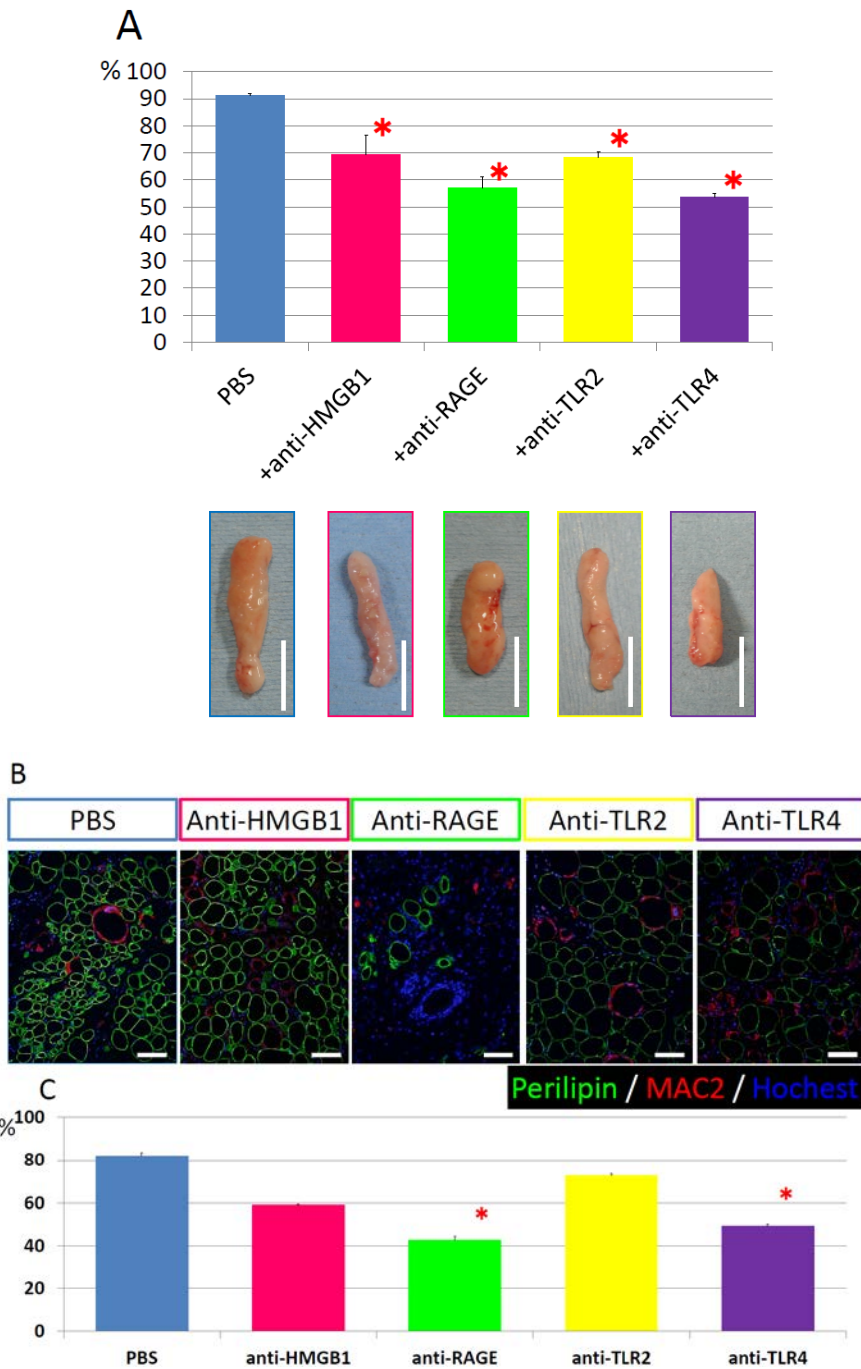


図 12 : 虚血による脂肪組織傷害と組織再生過程への HMGB1 の関与
 (A)虚血再灌流後 2 週間目の鼠径脂肪組織体積の、処置前脂肪組織体積に対する割合。
 RAGE 阻害群と TLR4 阻害群では組織の体積が小さかった。(n=3, *:PBS 群と比較して
 p<0.05. Scale bar=1cm)
 (B)虚血再灌流後 2 週間目の鼠径脂肪組織の免疫染色。MAC2(赤)、ペリリピン(緑)、
 核(青)。Scale bar=30 μ m。
 (C)検体に占める生存脂肪細胞面積の割合。(n=3, *:PBS 群と比較して p<0.05)

D

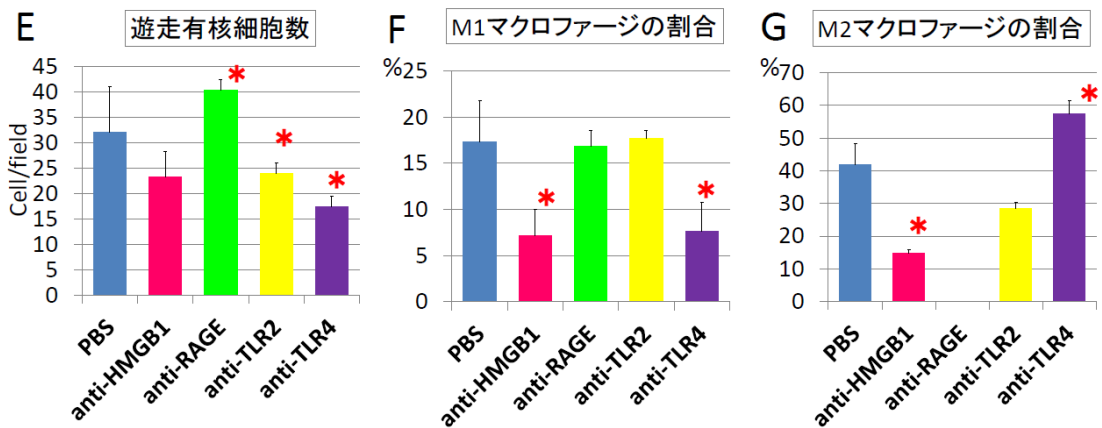
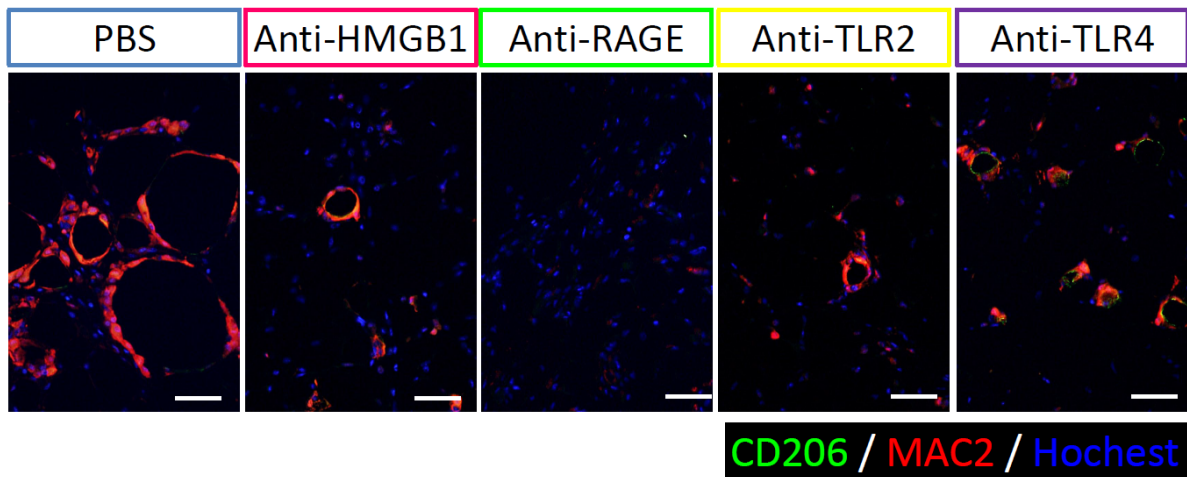


図 12 : 続き

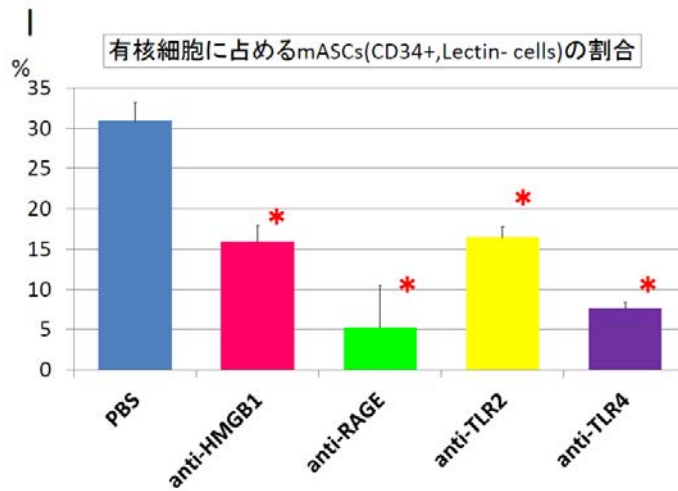
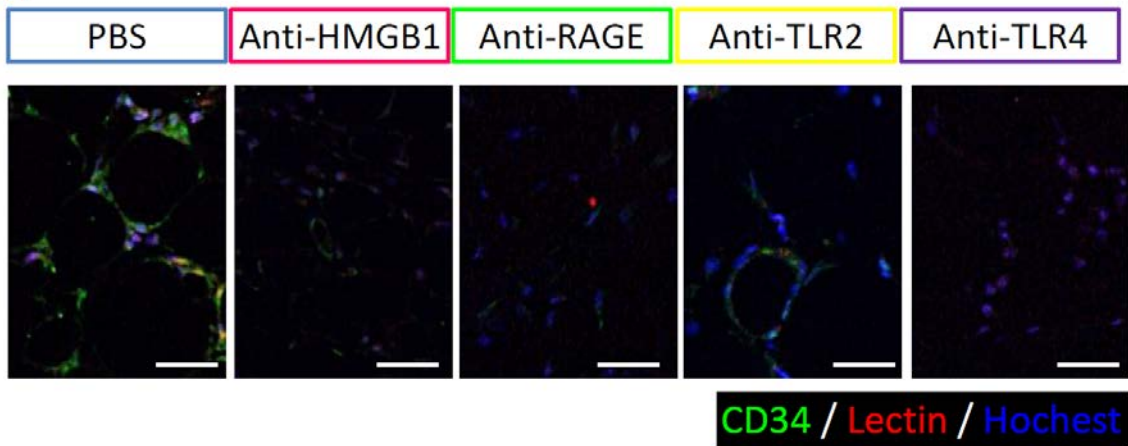
(D)虚血再灌流後脂肪組織へのマクロファージ浸潤。MAC2(赤)、CD206(緑)、核(青)。
Scale bar= 30 μ m。

(E)遊走有核細胞数(n=5,*:PBS 群と比較して p<0.05)。

(F)有核細胞に占める M1 マクロファージの割合。(n=5,*:PBS 群と比較して p<0.05)

(G)有核細胞に占める M2 マクロファージの割合。(n=5,*:PBS 群と比較して p<0.05)

H



J

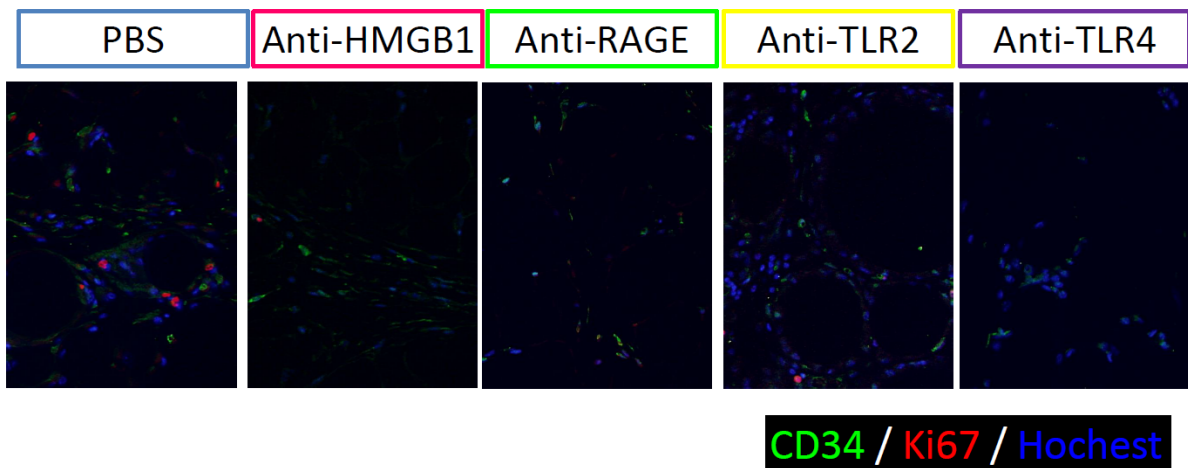


図 12 : 続き

(H) 虚血再灌流後脂肪組織における ASC の増殖活性。CD34(緑)、Ki67(赤)、核(青)。Scale bar= 30 μ m。(I) 含まれる ASCs 数の定量化(n=5,*:PBS 群と比較して p<0.05)。(J)組織内 ASCs の増殖活性検討。CD34(緑)、Ki67(赤)、核(青)。

考察

ヒト脂肪組織の傷害により、様々な組織傷害関連因子が放出され、傷害部位の再生やリモデリングに関与していることが知られている(25,26,27)。

我々は吸引した遊離脂肪組織を PBS に浸して処理することで、脂肪組織からの組織傷害関連因子を ATSB として回収することを試みた。PBS 中での振盪処理時間が長い ATSB のほうが hASC の活性化能が高いことが明らかとなった。傷害後の経過時間とともに放出される因子が変化することは他家の報告(25)からも予想される。今回の検討では、最長 48 時間までの処理時間の ATSB を用いて検討を行った。しかし、更に長時間の振盪処理により、更なる傷害関連因子放出が起こりえることも考慮しなければならない。PBS 中での振盪処理時間を延長した ATSB の検討については現在進行中である。

ATSB は図 1C に示す通り増殖・angiogenesis については濃度依存性に hASC を活性化したが、遊走能については濃度が高すぎると hASC 活性化作用が減退することが示された。ATSB は様々な炎症性サイトカインやケモカインの集合体であるが、これらの液性因子は複雑な活性化・抑制経路のネットワークを持っており、相互に干渉している。ATSB から検出された CXCL11 は CXCR3 や CXCR7 のリガンドである反面、好中球遊走に関わる CCR3 や CCR5 のアンタゴニストであることも知られている(33,34)。したがって、ATSB の作用においても活性化と抑制の相反する作用の結果を観察している可能性を考慮しなければならない。

昨今、CXCL11 や CXCL12 といったケモカインが傷害関連因子に含まれ、傷害局所の免疫反応のコントロールや組織修復・リモデリングをコントロールする可能性についても示唆する研究報告が多数なされている(28-32)。今回の研究では、末梢血中の単球と比較して hASC で発現亢進していた CXCR7 をもとに、そのリガンド群である CXCL11、CXCL12、更に協働が示唆される(35)CXCR4 の関与する経路について検索を行った。ATSB 中の CXCL11 または CXCL12 の中和だけでは hASC に対する増殖・遊走・angiogenesis 活性化の部分抑制に留まった。しかし、hASC の CXCR4 阻害で angiogenesis が、CXCR7 阻害で遊走が、そしていずれかの阻害で増殖が完全に抑制された。この事は、CXCR4 と CXCR7 の複雑な協働関係が関連しているものと思われる。この2つの受容体の関係については現在も議論のあるところである。いずれも7回膜貫通型タンパクであるが、CXCR4 が G タンパク共役なのに対し、CXCR7 は G タンパクを伴わない。一部の報告では CXCR7 が CXCR4 とリガンドの結合を調整している可能性が示唆されている(36、37)。hASC の増殖・遊走能活性化については CXCR7 阻害による CXCR4 機能調整が重要であることが推測される。Angiogenesis については CXCR7 阻害による抑制効果が認められないことから、CXCR4 を介するシグナルのみで稼働されている可能性が高い。今回の検討では片方ずつの阻害実験結果を提示したが、同時阻害の実験を現在行っているところである。また、CXCR4、CXCR7 とともに近縁経路に関与する CXCR3 についても検討を計画している。

虚血再灌流傷害モデル、潰瘍上皮化モデルいずれの組織解析においても、

CXCL11/CXCL12 による M2 マクロファージ遊走強化が観察され、CXCR4 阻害群で M1 マクロファージ優勢の誘導、CXCR7 阻害群でマクロファージ遊走の著明な減弱を認めた。AMD3100 は CXCR4-CXCL12 による細胞アンカリングを解除することで細胞遊走を促すことが知られている(38)。一方でアンカリングが解除されるため、組織に遊走細胞を引き留める作用が減弱する可能性がある。特に今回の検討では脂肪組織や潰瘍縁に直接阻害剤を注射しており、局所での細胞アンカリング作用が減弱した結果、細胞遊走に影響を及ぼしたと思われる。他家の報告で、AMD3100 の投与により db/db マウスの潰瘍上皮化が促進されたという我々の検討結果に反する報告が挙げられているが(39)、AMD3100 の全身投与による実験であるため、我々の検討結果と異なる経過を辿ったものと思われる。

M2 マクロファージの組織リモデリング作用は諸家の報告から明らかである(40,41)。虚血再灌流傷害後の脂肪組織を用いた検討で、M2 マクロファージ遊走強化を認めた CXCL11 投与群と CXCL12 投与群では壊死組織リモデリング後と思われる線維状の組織や成長過程の小型の脂肪細胞が散見された。対して、AMD3100 投与群と CCX771 投与群では油滴状に壊死した脂肪細胞や、細胞壁が菲薄化した脂肪細胞を認めるものの、リモデリングの痕跡は目立たなかった。M2 マクロファージによる組織リモデリングに CXCR4 と CXCR7 が関与していることが示唆される結果である。

今回の研究では、ATSB により活性化された hASC を用いたマイクロアレイの結果から、CXCR4/CXCR7 に関与する経路以外に、IL-17、TREM1、HMGB1 がシグナル経

路に関わる物質として示唆された。IL-17 と TREM1 については、検出を試みたものの、ATSB 検体間で濃度のばらつきが大きく、発現が僅少であったため、詳細な検討を見送った。これは、マイクロアレイにおいて、これらの物質の mRNA 発現亢進を直接検出したものではなく、関連する物質・因子群の mRNA 発現亢進から予測された候補物質であったことが原因であると考えられる。今後の課題として、IL-17 の阻害実験や TREM1 の発現阻害下での検証実験など、機能的な検討を計画している。

HMGB1 は代表的な Damage associated molecular patterns(DAMPs)である(42)。自己免疫疾患や術後炎症のような炎症性病態に関与していることが示唆されており、HMGB1 により惹起される炎症が病勢に関与するとの報告が多い(43-46)。一方で、HMGB1 による組織幹細胞活性化の報告もある(47,48)。今回の検討では、ATSB の中に HMGB1 が含まれており、hASC の活性化に関与していることが示された。興味深いことに、ATSB 中の HMGB1 を中和することで、hASC の遊走活性と angiogenesis 活性がほぼ完全に抑制されるのに対し、増殖活性については部分抑制に留まった。さらに HMGB1 受容体阻害実験も考慮すると、hASC の angiogenesis 活性は HMGB1 により活性化され、RAGE、TLR2、TLR4 を介するシグナルが同時に必要とされることが判る。一方、hASC の遊走については、HMGB1 により活性化され、TLR2 が部分的に関与しているものの、今回検討した RAGE、TLR4 以外に HMGB1 シグナルを伝達している受容体タンパクの存在を示唆する結果である。さらに増殖活性については、HMGB1 タンパク中和による阻害効果は限定的であった。前述の CXCL11、CXCL12

についても、中和による hASC 増殖活性の阻害効果は限定的である。CXCR4、CXCR7 の阻害が有効であったことから、hASC の増殖促進因子として CXCR4 ないしは CXCR7 に結合してシグナル伝達を行う別のリガンドの存在が示唆され、今後の検討課題である。

虚血再灌流モデルを用いた HMGB1 の傷害脂肪組織リモデリングへの関与に関する検討では、HMGB1 経路の阻害により組織修復の遅れが認められた。マクロファージ遊走の減弱傾向を認め、傷害後組織の処理がうまく進まず、リモデリングプロセスの遅延が見て取れる。さらに、HMGB1 阻害による ASC 増殖活性の抑制が示唆された。このことから、HMGB1 に起因する組織反応は、傷害を受けた組織の修復を促すのに必須であると考えられる。しかし、前述のように、HMGB1 による組織炎症の拡大は有害な組織変性や病態を生む可能性がある。どの受容体がどの程度の反応を惹起するのか、また、活性化する受容体による組織反応の違いなどの分析を更に進め、HMGB1 に起因する組織炎症反応のコントロールが確立すれば、組織移植後の変性や組織増大効果の維持に貢献できるかもしれない。

今回の研究を通じて、培養 hASC の反応や、組織内 ASC の増殖活性の検索を行い、マクロファージを介する傷害局所免疫についても言及してきた。我々の研究グループでは、Adipose tissue resident macrophage(ATM)という、組織幹細胞に極めて近い性質を持つマクロファージ分画を確認した(8)。昨今の報告では、ASC を含めた組織幹細胞によるパラクライン効果によって傷害組織の angiogenesis や組織リモデリングが活性

化されることや(49)、組織幹細胞活性化によってマクロファージ分画が炎症性の M1 から組織リモデリングに関わる M2 へと変化することも示されてきている(50)。今回、*vivo* 実験においては ASC とマクロファージの直接相互作用を確認するには至らなかった。しかし、特に HMGB1 についての検討ではマクロファージの遊走減弱と組織 ASC の増殖活性減退が相関しており、これでの諸家の報告と合わせて、組織傷害関連因子による ASC の活性化がマクロファージの遊走や遊走してくるフェノタイプに影響しているものと推察できる。今後、ASC とマクロファージ相互に及ぼす影響について検討を進めていく。

今回の研究を通して、傷害脂肪組織から CXCL11、CXCL12、HMGB1 が放出され、hASC がこれらに対する受容体を持ち、各々の受容体を介して活性化されることが明らかとなった。また、傷害脂肪組織内や難治性創傷において、これらの物質が組織幹細胞を活性化しつつ、M2 マクロファージの遊走を促し、創傷治癒や組織リモデリングを促進していることもわかった。CXCL11、CXCL12 はケモカインとして知られる物質であり、諸家の報告からも組織再生や創傷治癒に有益であることが示されている。さらに炎症性病態のメディエーターとして語られる HMGB1 も傷害組織のリモデリングには必要であることが示され、適量の傷害関連物質が適切に働くことが適切な組織修復プロセスの稼働に重要であることがわかる。臨床における難治性創傷や脂肪組織移植後の組織内でも同様の現象が起きている可能性が高く、今回の研究をさらに進めることで、組織幹細胞や局所免疫のコントロール手法開発につながり、新たな創傷治

癒促進治療の開発や組織移植後の予後改善手法の開発に資するものとする。

引用文献

- (1) Herold C, Ueberreiter K, Busche MN, Vogt PM. Autologous fat transplantation: volumetric tools for estimation of volume survival. A systematic review. *Aesthetic Plast Surg.* 37(2):380. 2013.
- (2) 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. *Plast Reconstr Surg.* 130(1):249. 2012.
- (3) Herold C, Ueberreiter K, Vogt PM. Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study. *Plast Reconstr Surg.* 130(3): 479e. 2012.
- (4) 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.* 2014 Jul 22.
- (5) Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol.* 2013 Jun;93(6):875
- (6) Vogel DY, Glim JE, Stavenuiter AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, Dijkstra CD, Beelen RH. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology.* 2014 Sep;219(9):695.
- (7) Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.*

2013 Oct;14(10):986.

(8) Eto H, Ishimine H, Kinoshita K, Watanabe-Susaki K, Kato H, Doi K, Kuno S, Kurisaki A, Yoshimura K. Characterization of human adipose tissue-resident hematopoietic cell populations reveals a novel macrophage subpopulation with CD34 expression and mesenchymal multipotency. *Stem Cells Dev.* 2013 Mar 15;22(6):985.

(9) Mineda K, Kuno S, Kato H, Kinoshita K, Doi K, Hashimoto I, Nakanishi H, Yoshimura K. Chronic inflammation and progressive calcification as a result of fat necrosis: the worst outcome in fat grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2014 May;133(5):1064

(10) Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell.* 2013 Oct 3;13(4):392.

(11) Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, Caro M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut.* 2013 Aug;62(8):1131

(12) Eggenhofer E, Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant Res.* 2012 Sep 28;1(1):12.

(13) Pistoia V, Raffaghello L. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) and mesenchymal stem cells: a matter of attraction and excitement. *Eur J Immunol.* 2011 Jul;41(7):1828.

(14) Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of

inflammation. *Mol Ther*. 2012 Jan;20(1):14.

(15) Yoshimura K, Eto H, Kato H, Doi K, Aoi N. In vivo manipulation of stem cells for adipose tissue repair/reconstruction. *Regen Med*. 2011 Nov;6:33.

(16) Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006 Dec;25(6):977.

(17) Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, Nagasawa T. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):387.

(18) Trousse F, Poluch S, Pierani A, Dutriaux A, Bock HH, Nagasawa T, Verdier JM, Rossel M. CXCR7 Receptor Controls the Maintenance of Subpial Positioning of Cajal-Retzius Cells. *Cereb Cortex*. 2014 Aug 1. pii: bhu164.

(19) Mazinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, Parente E, Mancina R, Netti GS, Becherucci F, Gacci M, Carini M, Gesualdo L, Rotondi M, Maggi E, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med*. 2008 Feb 18;205(2):479.

(20) Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway . *Immunol Lett*. 2008 Mar 15;116(2):111.

(21) Weber DJ, Gracon AS, Ripsch MS, Fisher AJ, Cheon BM, Pandya PH, Vittal R, Capitano ML, Kim Y, Allette YM, Riley AA, McCarthy BP, Territo PR, Hutchins GD, Broxmeyer HE, Sandusky GE, White FA, Wilkes DS. The HMGB1-RAGE axis mediates traumatic brain injury-induced pulmonary dysfunction in lung transplantation. *Sci Transl Med.* 2014 Sep 3;6(252):

(22) Kim S, Kim SY, Pribis JP, Lotze M, Mollen KP, Shapiro R, Loughran P, Scott MJ, Billiar TR. Signaling of high mobility group box 1 (HMGB1) through toll-like receptor 4 in macrophages requires CD14. *Mol Med.* 2013 May 20;19:88-98.

(23) Furlani D, Donndorf P, Westien I, Ugurlucan M, Pittermann E, Wang W, Li W, Vollmar B, Steinhoff G, Kaminski A, Ma N. HMGB-1 induces c-kit⁺ cell microvascular rolling and adhesion via both toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 of endothelial cells. *J Cell Mol Med.* 2012 May;16(5):1094.

(24) Debels H, Galea L, Han XL, Palmer J, van Rooijen N, Morrison W, Abberton K. Macrophages play a key role in angiogenesis and adipogenesis in a mouse tissue engineering model. *Tissue Eng Part A.* 2013 Dec;19(23-24):2615.

(25) Aiba-Kojima E, Tsuno NH, Inoue K, Matsumoto D, Shigeura T, Sato T, Suga H, Kato H, Nagase T, Gonda K, Koshima I, Takahashi K, Yoshimura K. 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.* 2007

Jul-Aug;15(4):511.

(26) Cordon-Cardo C1, Vlodavsky I, Haimovitz-Friedman A, Hicklin D, Fuks Z. Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab Invest.* 1990 Dec;63(6):832.

(27) Schulze-Osthoff K1, Risau W, Vollmer E, Sorg C. In situ detection of basic fibroblast growth factor by highly specific antibodies. *Am J Pathol.* 1990 Jul;137(1):85

(28) Fu Q, Chen X, Cui H, Guo Y, Chen J, Shen N, Bao C. Association of elevated transcript levels of interferon-inducible chemokines with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):R112.

(29) Sun H, Liu J, Zheng Y, Pan Y, Zhang K, Chen J. Distinct chemokine signaling regulates integrin ligand specificity to dictate tissue-specific lymphocyte homing. *Dev Cell.* 2014 Jul 14;30(1):61.

(30) Feng G, Hao D, Chai J. Processing of CXCL12 Impedes the Recruitment of Endothelial Progenitor Cells (EPCs) in Diabetic Wound Healing. *FEBS J.* 2014 Sep 11.

(31) Wani N, Nasser MW, Ahirwar DK, Zhao H, Miao Z, Shilo K, Ganju RK. C-X-C motif chemokine 12/C-X-C chemokine receptor type 7 signaling regulates breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2014 May 29;16(3):R54.

(32) Michineau S, Franck G, Wagner-Ballon O, Dai J, Allaire E, Gervais M. Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 blockade by AMD3100 inhibits experimental abdominal aortic

aneurysm expansion through anti-inflammatory effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Aug;34(8):1747.

(33) Petkovic V, Moghini C, Paoletti S, Uguccioni M, Gerber B. I-TAC/CXCL11 is a natural antagonist for CCR5. *J Leukoc Biol.* 2004 Sep;76(3):701.

(34) Xanthou G, Duchesnes CE, Williams TJ, Pease JE. CCR3 functional responses are regulated by both CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11. *Eur J Immunol.* 2003 Aug;33(8):2241.

(35) Heckmann D, Maier P, Laufs S, Li L, Sleeman JP, Trunk MJ, Leupold JH, Wenz F, Zeller WJ, Fruehauf S, Allgayer H. The disparate twins: a comparative study of CXCR4 and CXCR7 in SDF-1 α -induced gene expression, invasion and chemosensitivity of colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Feb 1;20(3):604.

(36) Singh AK, Arya RK, Trivedi AK, Sanyal S, Baral R, Dormond O, Briscoe DM, Datta D. Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013 Feb;24(1):41.

(37) Maksym RB, Tarnowski M, Grymula K, Tarnowska J, Wysoczynski M, Liu R, Czerny B, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *Eur J Pharmacol.* 2009 Dec 25;625(1-3):31.

(38) Pusic I, DiPersio JF. Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells.

Curr Opin Hematol. 2010 Jul;17(4):319.

(39) Fiorina P, Pietramaggiore 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 Transplant. 2010;19(11):1369.

(40) Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage polarization in inflammatory diseases. Int J Biol Sci. 2014 May 1;10(5):520

(41) Chinetti-Gbaguidi G1, Staels B. Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation. Curr Opin Lipidol. 2011 Oct;22(5):365.

(42) Pisetsky D. Cell death in the pathogenesis of immune-mediated diseases: the role of HMGB1 and DAMP-PAMP complexes. Swiss Med Wkly. 2011 Aug 29;141.

(43) Abdulahad DA, Westra J, Bijzet J, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther. 2011 May 6;13(3):R71.

(44) Takahata R, Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Kimura A, Kinoshita M, Miyazaki H, Saitoh D, Hase K. Postoperative serum concentrations of high mobility group box chromosomal protein-1 correlates to the duration of SIRS and pulmonary dysfunction following gastrointestinal surgery. J Surg Res. 2011 Sep;170(1):e135.

(45) Hirsiger S, Simmen HP, Werner CM, Wanner GA, Rittirsch D. Danger signals activating

the immune response after trauma. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:315941.

(46) Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:139.

(47) Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol.* 2004 Feb 2;164(3):441.

(48) Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Iinuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, Katayama I, Miyazaki J, Takeda J, McGrath JA, Uitto J, Kaneda Y. PDGFRalpha-positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Apr 19;108(16):6609.

(49) Suga H, Glotzbach JP, Sorkin M, Longaker MT, Gurtner GC. Paracrine mechanism of angiogenesis in adipose-derived stem cell transplantation. *Ann Plast Surg.* Feb;72(2):234, 2014.

(50) Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell.* Oct 3;13(4):392,2013.

(51) Jung WY, Kang JH, Kim KG, Kim HS, Jang BI, Park YH, Song IH. Human adipose-derived stem cells attenuate inflammatory bowel disease in IL-10 knockout mice. *Tissue Cell.* 2014 Dec 6. pii: S0040-8166(14)

(52) Yoshimura K1, 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. *J Cell Physiol.* 2006 Jul;208(1):64-76.

(53) Westernströer B, Terwort N, Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S, Neuhaus N. Profiling of Cxcl12 receptors, Cxcr4 and Cxcr7 in murine testis development and a spermatogenic depletion model indicates a role for Cxcr7 in controlling Cxcl12 activity. *PLoS One.* 2014 Dec 2;9(12):e112598.

(54) Neve Polimeno M, Ierano C, D'Alterio C, et al. CXCR4 expression affects overall survival of HCC patients whereas CXCR7 expression does not. *Cell Mol Immunol.* 2014 Nov 3.

謝辞

本研究において、研究の立案から実験の進め方、論文執筆まで様々な面においてご指導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。産業技術総合研究所の栗崎晃先生には実験手技や研究内容につきましてご意見を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

研究室でともに仕事をして参りました東京大学医学部形成外科の加藤晴乃輔先生、土居健太郎先生、荒木淳先生、木下佳保里先生、金山幸司先生には研究ミーティングや抄読会を通じて様々なアドバイスを頂くとともに、実際の実験においてもご協力いただきました。改めて感謝の意を表したいと思います。