

## 論文の内容の要旨

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

### (背景・目的)

軟部組織再建や増大の手段として吸引脂肪を用いた脂肪組織移植が挙げられる。脂肪吸引によって比較的low侵襲に移植組織が得られるメリットがある反面、移植された組織は血行を持たない虚血・低酸素・低栄養環境に置かれる。その結果、移植した組織の一部は壊死して吸収されたり、嚢胞を形成して石灰化するなどの変質経過を辿る。その結果、本来の目的である組織増大が果たせないばかりか、場合によっては長引く炎症から有害事象へと発展する場合もある。

傷害環境に置かれた組織からは組織傷害関連因子が放出されることが知られており、吸引脂肪組織移植術の術後変化においても、傷害環境におかれた脂肪組織から放出される因子と組織リモデリング反応が関与している可能性が予想された。しかしながら、脂肪組織に由来する傷害関連因子について、組織学的変化への関与や組織幹細胞・傷害局所免疫との関連についてはあまり知られていない。

そこで我々は、脂肪組織から放出される傷害関連因子と損傷組織のリモデリングの関係を明らかにすべく、組織傷害関連因子として代表的な CXCL11、CXCL12、HMGB1 の脂肪組織由来幹細胞(ASCs)活性への影響、それに伴う局所免疫反応について調べることにした。

### (方法)

健常成人から採取した脂肪組織を等量のリン酸バッファーと混和し、37°Cの恒温振盪器で振盪し、フィルター濾過したものを adipose tissue soaked buffer (ATSB)として回収した。この ATSB を培養ヒト ASCs(hASC)に投与して活性変化を観察した。次いで、ATSBに含まれる物質をサイトカインアレイでスクリーニングし、CXCL11、CXCL12について ELISA で ATSB 含有濃度を測定した。CXCL11、CXCL12 の受容体である CXCR4/CXCR7 の hASC 上での発現をフローサイトメトリーと細胞免疫染色で確認し、その上で、CXCL11、CXCL12 の hASC に対する作用を解析した。ATSB による他の hASC 活性化経路の候補を検索するため、ATSB 活性化 hASC を用いたマイクロアレイを行った。発現亢進していた遺伝子群から予想された IL-17、HMGB1 について ELISA で検索し、TREM1 の hASC 上での発現を細胞免疫染色を用いて確認した。CXCL11、CXCL12、HMGB1 とその受容体について

hASC 活性化作用との関係を検討し、虚血再灌流モデルマウスと糖尿病マウスの潰瘍上皮化モデルを用いて、虚血傷害下の脂肪組織におけるこれらの物質の働き及び、難治性創傷の上皮化における作用を検討した。

#### (結果)

ATSB を投与すると、hASC の増殖、遊走、angiogenesis が活性化された。活性化作用は恒温振盪器での処理時間が 48 時間の ATSB が最も高く、投与する濃度は増殖能と angiogenesis は濃度依存性に活性化され、遊走能は 30%まで濃度が上昇すると阻害された。

サイトカインアレイ、ELISA を用いた検討で、CXCL11 と CXCL12 が ATSB に含まれることを確認した。リコンビナント CXCL11 や CXCL12 を hASC に投与すると増殖、遊走、angiogenesis で活性化を認め、ATSB 中の CXCL11、CXCL12 を中和すると ATSB による hASC 活性化作用は阻害された。

ATSB による hASC 活性化が CXCL11、CXCL12 に起因する可能性が示唆されたため、その受容体である CXCR4 と CXCR7 の hASC 上での発現を確認した。フローサイトメーターと細胞免疫染色により、いずれの受容体発現も確認できたが、CXCR4 の発現率は低かった。また、これらの受容体阻害により、ATSB による hASC 活性化作用の減弱を認めた。したがって、ATSB の hASC 活性化作用には、CXCL11/CXCL12 とその受容体である CXCR4/CXCR7 が関わっていると考えられた。

虚血再灌流モデルマウスを用いた検討で、CXCL11、CXCL12 投与群で脂肪組織の生存率が高く、組織保護作用を認めた。また、組織内への遊走細胞を比較すると、CXCL11、CXCL12 投与群では M2 マクロファージの遊走が強化され、リモデリングの促進が示唆される結果であった。対して、CXCR4 ないしは CXCR7 の阻害群ではマクロファージの遊走阻害が認められ、脂肪組織の生存率も低かった。

Db/db マウスの背部に直径 6 mm の全層皮膚欠損層を作成し、創縁に CXCL11、CXCL12、ATSB、ATSB+CXCR4 阻害剤、ATSB+CXCR7 阻害剤を注射し、上皮化経過を比較した。ATSB、CXCL11、CXCL12 の投与群で上皮化促進作用がみられた。CXCR4、CXCR7 阻害群では著明な上皮化遅延を認めた。潰瘍縁の組織を観察すると CXCL11、CXCL12、ATSB の投与群には M2 マクロファージの遊走が強化され、CXCR4、CXCR7 阻害群ではマクロファージの遊走自体が阻害されていた。

ATSB により活性化された hASC における遺伝子発現の変化をマイクロアレイで検索したところ、IL-17、TREM1、HMGB1 によるシグナル伝達経路が活性化されている可能性が示唆された。ELISA を用いて ATSB 中の IL-17 検出を試みたが、検体間での濃度差が大きく、決定的因子とは考えられなかった。また、hASC 上での TREM1 の発現を細胞免疫染色で確認したが、ごく低い発現率であったため、詳細な検討対象とはしなかった。

HMGB1 については、ELISA を用いた検討で、ATSB 中に安定して含まれていることが判明した。さらに、細胞免疫染色を用いて、hASC 上に HMGB1 の代表的受容体である RAGE、

TLR2、TLR4 が発現していることが示された。

HMGB1 中和により ATSB の hASC 活性化が阻害された。ただ、増殖能については部分阻害に留まった。また、HMGB1 受容体である RAGE、TLR2、TLR4 阻害群でも同様の結果が得られた。

虚血再灌流モデルを用いた検討により、HMGB1 系の阻害により、炎症反応の惹起が抑制され、リモデリングの遅延、ASC の増殖活性抑制が確認できた。

#### (考察と結論)

今回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 adipose tissue soaked buffer (ATSB) として回収した。

ATSB は増殖・angiogenesis について濃度依存性に 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 活性化作用が減退した。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り、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おり、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も否定できない。

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、興味深いことに 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。今回の検討では片方ずつの阻害実験結果を提示したが、同時阻害の実験も現在進行中である。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。

HMGB1 は代表的な Damage associated molecular patterns(DAMPs)である。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。一方で、HMGB1 による組織幹細胞活性化の報告もある。今回の検討から、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。また、hASC の遊走は HMGB1 により活性化され、TLR2 が部分的に関与していることも判った。一方、増殖活性については HMGB1 シグナルの阻害だけでは部分阻害に留まる。前述の結果も踏まえると、CXCL11、CXCL12、HMGB1 以外に hASC 増殖を促進する物質が ATSB に含まれ、それは CXCR4 と CXCR7 を介してシグナル伝達を行う可能性があることが示唆される。これに当てはまる物質の検討は今後の課題である。

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 経路の阻害によりリモデリングプロセスの遅延が見取れる。さらに、

HMGB1 阻害による ASC 増殖活性の抑制が示唆された。HMGB1 は炎症性病態の主役として語られることが多いが、本研究においては、HMGB1 の阻害は傷害組織において転機改善に繋がらないばかりか、組織修復遅延という有害事象を発生させた。このことから、適量の 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、HMGB1 の持つ起炎症力価の検討が必要である。

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考えられる。