

審査の結果の要旨

氏名 久野慎一郎

本研究は脂肪組織が傷害を受けた際に放出する脂肪組織由来傷害関連因子が、傷害を受けた組織のリモデリングに果たす役割を明らかにするために、脂肪組織障害関連因子による脂肪組織由来幹細胞(ASCs)活性化シグナル経路の検索と、マウスにおける虚血脂肪組織・糖尿病性難治性皮膚潰瘍での組織解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 脂肪組織障害関連因子を実験に用いるため、リン酸バッファーの中で脂肪組織を振盪し、脂肪組織由来傷害関連因子バッファー(ATSB)を作成した。この ATSB がヒト脂肪組織由来幹細胞(hASCs)の増殖、遊走、angiogenesis を活性化することを示し、振盪処理 48 時間、添加濃度 20%の ATSB が実験至適条件であることを示した。

2. Cytokine array assay 並びに ELISA 法を用いて ATSB に CXCL11、CXCL12 が含まれていることを示し、これらが hASCs の増殖、遊走、angiogenesis を活性化することを示した。また、CXCL11 と CXCL12 の受容体である CXCR7 と、CXCL12 の受容体である CXCR4が hASCs 上に発現していることを細胞免疫染色と flowcytometry で示した。ATSB 中に含まれる CXCL11、CXCL12 の抗体による中和または、hASCs 上の CXCR4 並びに CXCR7 の競合的阻害により ATSB の hASCs 活性化能が阻害されることを示した。これらの結果から CXCL11/CXCL12-CXCR7 axis と CXCL12-CXCR4 axis が脂肪組織由来傷害関連因子による hASCs 活性化に寄与することが示された。

3. ATSB により活性化された hASCs を用いて microarray assay を行った。発現亢進している遺伝子を既知のシグナルパスウェイと照合解析した結果、IL-17、TREM1、HMGB1 がキーモレキュル候補として挙げられた。

4. ATSB に含まれる IL-17 を ELISA 法により検出した。ATSB 中の IL-17 含有を確認できたものの、検体毎のばらつきが大きかった。また、TREM1 とそのアダプタータンパクである DAP12 の hASC 上での発現を細胞免疫染色で示したが、陽性率は極めて小さかった。これらの結果から、IL-17 と TREM1 は、脂肪組織由来傷害関連因子による hASCs 活性化において、一般的に関与する物質とは判定できなかった。

5. ATSB に HMGB1 が含有されていることを ELISA 法で示した。HMGB1 のよく知られた受容体である RAGE、TLR2、TLR4 が hASCs 上に発現していることを細胞免疫染色で示した。ATSB 中に含まれる HMGB1 の抗体による中和、または RAGE、TLR2、TLR4 の阻害抗体投与により、ATSB による hASCs の増殖、遊走、angiogenesis 活性化能が阻害された。特に angiogenesis の阻害効果が顕著であり、増殖、遊走能は部分阻害に留まった。これらの結果から、脂肪組織由来傷害関連因子に含まれる HMGB1 とその受容体を介する

シグナル経路が hASCs の活性化、特に angiogenesis の活性化に寄与していることが示された。

6. ICR マウスの単径脂肪組織を用いた虚血再灌流モデルを作成し、虚血処置後に CXCL11、CXCL12、AMD3100(CXCR4 antagonist)、CCX771(CXCR7 antagonist)を投与して虚血傷害後の脂肪組織リモデリングとマクロファージ活性について検討した。生存脂肪細胞のマーカであるペリリピンで染色すると、CXCL11 または CXCL12 投与群で生存領域が大きく、CCX771 で生存領域の顕著な縮小を認めた。また、マクロファージの汎用マーカである MAC2 と M2 マクロファージのマーカである CD206 による免疫染色により、CXCL11、CXCL12 投与群での M2 マクロファージ遊走増加が確認され、AMD3100 投与群では M1 マクロファージ優位の遊走が、CCX771 投与群ではマクロファージ遊走の障害が観察された。これらの結果から、虚血傷害後の脂肪組織リモデリングを、CXCL11/CXCL12 – CXCR7 axis と CXCL12 – CXCR4 axis が促進していることが示された。

7. 脂肪組織障害関連因子の難治性潰瘍における作用を確認するため、糖尿病マウス(db/db マウス)を用いて難治性皮膚潰瘍モデルを作成し、CXCL11、CXCL12、ATSB、ATSB + AMD3100(CXCR4 antagonist)、ATSB + CCX771(CXCR7 antagonist)投与を行って組織解析を行った。ATSBによる上皮化促進作用が示され、AMD3100またはCCX771によるATSBの上皮化促進作用阻害が示された。さらに、MAC2、CD206による免疫染色により、脂肪組織虚血再灌流モデルと同様、ATSB、CXCL11、CXCL12投与群でのM2マクロファージ遊走促進と、CXCR4阻害(AMD3100投与群)によるM1マクロファージ遊走の優位化、CXCR7阻害(CCX771投与群)によるマクロファージ遊走の阻害が示された。このことから、難治性潰瘍上皮化においてもCXCL11/CXCL12 – CXCR7 axis と CXCL12 – CXCR4 axis の関与が示された。

8. ICR マウス単径脂肪組織を用いた虚血再灌流モデルで HMGB1 並びに、受容体である RAGE、TLR2、TLR4 の抗体投与による阻害実験を行った。RAGE 阻害群と TLR4 阻害群において、著明な脂肪組織収縮が観察され、検体のペリリピン染色によりこの 2 群において生存脂肪細胞の占める領域が明らかに縮小していることが示された。これら 2 群では脂肪細胞の新生所見も乏しかった。また、CD34(マウス ASCs マーカー)と Ki67(細胞増殖マーカー)による免疫染色では、HMGB1 タンパク阻害並びに RAGE、TLR2、TLR4 阻害によるマウス ASCs の増殖活性減弱が示された。加えて、脂肪組織内におけるマウス ASCs 数そのものの減少も確認された。加えて、MAC2、CD206による免疫染色を行うと、RAGE 阻害群での著明なマクロファージ遊走阻害と、TLR4 阻害による M2 マクロファージ活性の低下を認めた。これらの結果から、虚血傷害後の脂肪組織リモデリングに、HMGB1 とその受容体群(RAGE、TLR2、TLR4)を介したシグナル伝達が関与していることが示された。

以上、本論文は脂肪組織由来傷害関連因子に CXCL11、CXCL12、HMGB1 が含まれ、これらの因子が ASCs の活性化とマクロファージ遊走活性調整により組織リモデリングに密接に関与することを明らかにした。本研究は組織障害に伴う組織幹細胞活性化と免疫調整能の関係性解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。