

# マウス脱分化脂肪細胞の血管新生作用に関する研究

渡邊拓史<sup>1)</sup>, 萩倉一博<sup>2)</sup>, 風間智彦<sup>2)</sup>, 高橋昌里<sup>1)</sup>, 松本太郎<sup>2)</sup>

## Study on angiogenic activity in mouse dedifferentiated fat cells

Hirofumi WATANABE<sup>1)</sup>, Kazuhiro HAGIKURA<sup>2)</sup>, Tomohiko KAZAMA<sup>2)</sup>,  
Shori TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Taro MATSUMOTO<sup>2)</sup>

### 要旨

脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: ASC) は高い血管新生能を有し、虚血性疾患に対する細胞治療に用いられている。一方、ASCに類似した多能性をもつ脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) の血管新生メカニズムは十分に解明されていない。本研究では、マウス脂肪組織よりDFATとASCを調製し、それぞれ血管内皮細胞と共培養する事により、血管内皮細胞の遊走能や増殖能、管腔形成能の変化を比較検討し、さらに血管構成細胞の1つであるペリサイトへの分化を検討した。その結果、DFATは血管内皮細胞の細胞増殖能、遊走能、管腔形成能を促進した。また、血管内皮細胞との直接および間接的共培養によりペリサイトへ分化した。一方、ASCは血管内皮細胞に対しDFATと同等の細胞増殖能・管腔形成能を示すが、細胞遊走能やASCのペリサイトへの分化能は、DFATに比べ低いことが示された。DFATはASCと同様に血管新生細胞治療の有効な細胞ソースとなりうる可能性がある。

### 1. はじめに

既存の血管より生理的・病的条件下に新たな血管が発生する現象を血管新生という。この血管新生に関与している分子機序や細胞動態を応用して、虚血組織の血流を確保し、組織障害や壊死を軽減させようとする治療法は、治療的血管新生と呼ばれている。その歴史は血管新生因子の遺伝子治療から始まり、現在は骨髄単核球細胞や間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) などの移植による細胞治療が期待され、臨床研究も開始されている<sup>2-5)</sup>。

Matsumotoら<sup>6)</sup>は脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法を用いて、体外で脱分化培養する事により生じてくる繊維芽細胞様の形態をした細胞群が高い増殖能とMSCと同等の多分化能を示すことを明らかにした。この成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞は、脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) と呼ばれている。DFATを虚血

部位へ移植するとバラクライン的に種々の血管新生因子が放出され、血管新生が誘導されることが確認されている<sup>7)</sup>。DFATは遺伝子操作やウイルスベクターを用いない安全かつ簡便な方法で短期間に大量調製が可能であるため、治療用細胞ソースとして早期の臨床応用が期待できる。

末梢動脈疾患 (Peripheral arterial disease : PAD) や Buerger病、虚血性心筋症などの難治性虚血性疾患において、DFATを用いた細胞治療は有効な治療法となる可能性がある。一方で、DFATの血管新生メカニズムに関しては十分に解明されていない。本研究は、DFATと血管内皮細胞を共培養する事により、細胞間相互作用による血管内皮細胞の遊走能や増殖能、管腔形成能の変化を脂肪組織に存在するMSCである脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: ASC) と比較して検討した。さらに血管内皮細胞との共培養により、DFATが血管構成細胞の

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野

2) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野  
松本太郎 : matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

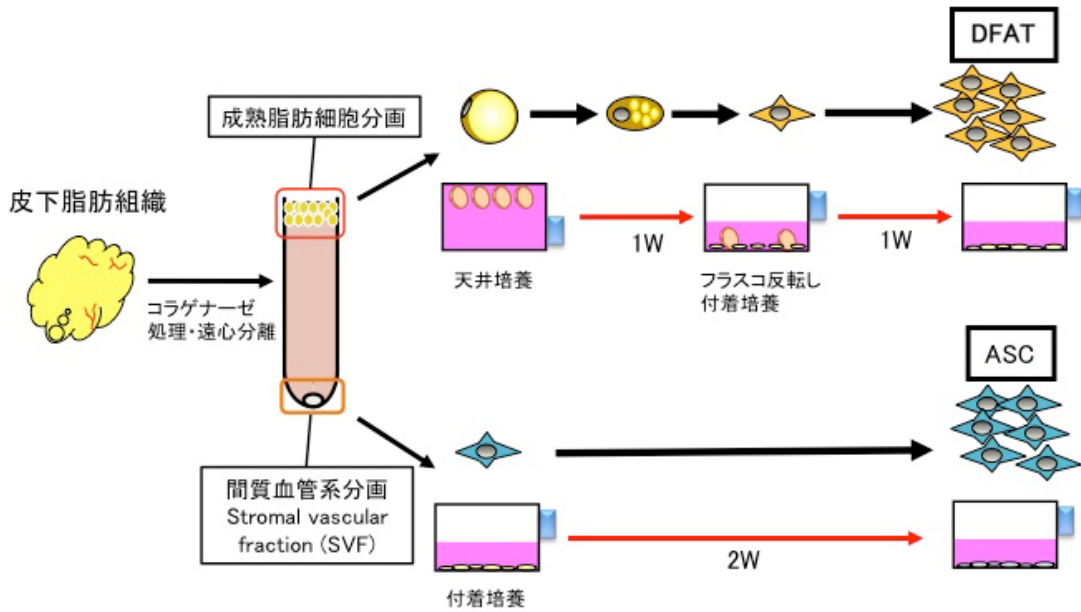


図1 脱分化脂肪細胞 (DFAT), 脂肪組織由来幹細胞 (ASC) の調製法

1つであるペリサイトへ分化する可能性について ASCと比較して検討した。

## 2. 対象及び方法

### DFAT・ASCの調製

Green fluorescent protein (GFP) 標識DFATおよびASCは, GFPトランスジェニックマウス皮下脂肪組織から調製され, 凍結保存された細胞を解冻, 培養して実験に使用した。DFATおよびASC調整法の概略を図1に示す。増殖培地は20% 胎児ウシ血清含有 CSTI303-MSC (Cell Science & Technology Institute) を用い, 3-4日毎に培地交換を行った。

### 血管内皮細胞の増殖に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

セルカルチャーインサート (BD Falcon) 内にマウスDFATあるいはASCを $1 \times 10^4$ , プレート底面にマウス血管内皮細胞 (MS1)  $5 \times 10^3$ を播種し, 48時間共培養した。血管内皮細胞の核染色を行い, 蛍光顕微鏡にて撮影し, ランダム5視野内にある血管内皮細胞数をカウントし, MS1単独 (Control群), DFAT共培養 (DFAT群), ASC共培養 (ASC群) で比較した。実験はtriplicated dishで行った。

### 血管内皮細胞の遊走に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

セルカルチャーインサート内に血管内皮細胞 (MS1)  $5 \times 10^3$ , プレート底面にDFATあるいはASC  $2 \times 10^4$ を播種し, 8時間共培養した。セルカルチャーインサート裏面に遊走した血管内皮細胞の核染色を行い, 蛍光顕微鏡を用いて撮影した。ランダム5視野内にある血管内皮細胞数をカウントし, 非共培養群と共培養群で比較した。実験はtriplicated dishで行った。

### 血管内皮細胞管腔形成に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

コラーゲンボール (Cytodex3, GE Helthcare) 3,000個を含む10%胎児ウシ血清含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) 内にMS1を $8 \times 10^5$ 播種し, 震とうすることによりコラーゲンボールにMS1を付着させた。このMS1の付着したコラーゲンボール50個をDFATまたはASC  $5 \times 10^3$ を含浸させたコラーゲンゲル (Collagen I rat tail, BD Bioscience), またはコラーゲンゲルのみで7日間三次元培養し, MS1の管腔形成を経時的に位相差顕微鏡を用いて観察した。以上の実験はtriplicated dishで行った (図2)。

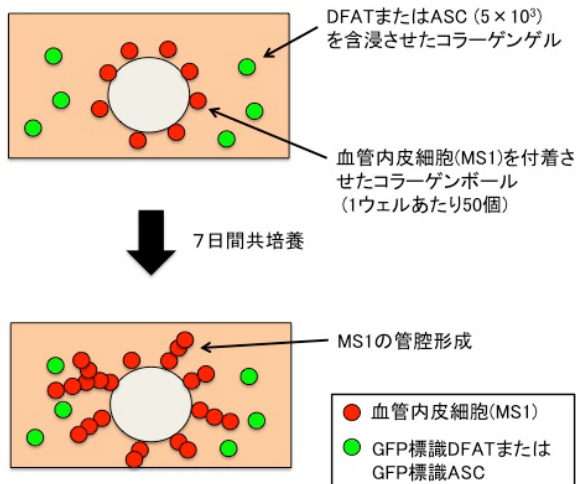


図2 コラーゲンボールを用いた血管内皮細胞管腔形成アッセイ

### 血管内皮細胞との共培養によるペリサイトマーカーの免疫組織染色を用いた発現解析

GFP-DFATあるいはGFP-ASCとMS1を間接的または直接的に72時間共培養を行い、4%パラホルムアルデヒドにより固定した。固定したDFATあるいはASCを、マウス抗NG2抗体(1:200, Millipore), マウス抗CD31抗体(1:200, BD Pharmingen)を用いて免疫染色を行った。Hoechst33342で核染色を行った後に、作成した標本を共焦点レーザー走査型顕微鏡(FV10i-DOC, Olympus)を用いて観察した(図3)。またGFP-DFATあるいはGFP-ASCとMS1を間接的または直接的に72時間共培養を行った後、Total RNAを抽出し、ペリサイトマーカー遺伝子の発現をリアルタイムRT-PCR法を用いて解析した。ペリサイトマーカー遺伝子としてNG2(MM\_00507257), RGS5(MM\_00654112), PDGFR $\beta$ (MM\_00435546)を検討した。 $\beta$ アクチン(MM\_00607939)の発現を同様に測定し、内部標準とした。各サンプルはtriplicateで測定し、 $\beta$ アクチンmRNAに対する相対的定量解析(Comparative Ct法)を行った。

### 統計処理

実験により得られた定量結果はmean  $\pm$  SDにて表した。2群間の比較にはMann-Whitney U test, 3群間の比較にはone-way ANOVA, Tukey's Multiple Comparisonにて統計解析を行った。P < 0.05を統計

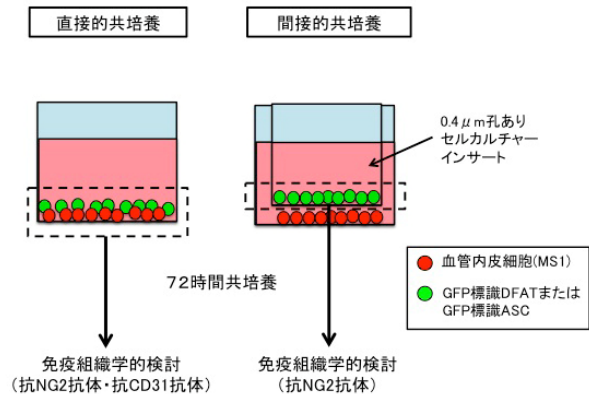


図3 血管内皮細胞との共培養によるペリサイト分化能の検討

学的有意差とした。統計処理はPRISM5(GraphPad Software)を用いて行った。

## 3. 結果

### 血管内皮細胞の増殖に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

DFAT群, ASC群はControl群に比べてそれぞれ3.2倍, 2.6倍と有意にMS1の細胞数が増加した(p < 0.05)。一方, DFAT群とASC群との間には有意差は認められなかった。以上の結果より, DFAT・ASCは血管内皮細胞の増殖を刺激する事が明らかになった。

### 血管内皮細胞の遊走に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

DFAT非共培養群と比較してDFAT共培養群ではMS1の遊走能が1.5倍と有意に高まった(p < 0.05)。一方, ASC非共培養群とASC共培養群との比較では有意差が認められなかった。以上の結果より, DFATは血管内皮細胞の遊走を刺激するが, ASCではその効果は認められなかった。

### 血管内皮細胞管腔形成に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

コラーゲンボールに付着させたMS1管腔形成アッセイでは, DFAT群, ASC群はControl群に比べ明らかにコラーゲンボールから派生する発芽的管腔

形成が促進する所見が認められた。この結果より DFAT および ASC は血管内皮細胞の管腔形成を促進することが明らかになった。

#### 血管内皮細胞との共培養によるペリサイトマーカーの発現解析

##### ①免疫組織学的検討

DFAT 単独培養では全ての DFAT が GFP を発現しており、NG2 は陰性であった。MS1 との 72 時間の間接的共培養により、約 10% の DFAT が NG2 を発現した。MS1 との 72 時間の直接的共培養では NG2 陽性を示す DFAT が高頻度（約 20%）に認められた

(図 4)。NG2 陽性を示す細胞はすべて内皮細胞マーカー CD31 陰性であり、内皮細胞はペリサイトに分化しない事を確認した。一方、ASC 単独培養では全ての ASC が GFP 陽性であり、共培養前より一部の細胞に NG2 陽性細胞が認められた。MS1 との 72 時間の間接的および直接的共培養にて GFP 陽性かつ NG2 陽性細胞が検出されたが、その出現率は共培養前に比べ明らかな差は認められなかった。

##### ②リアルタイム RT-PCR

DFAT における NG2 の mRNA の発現は Control と比較し間接的および直接的共培養において有意に増

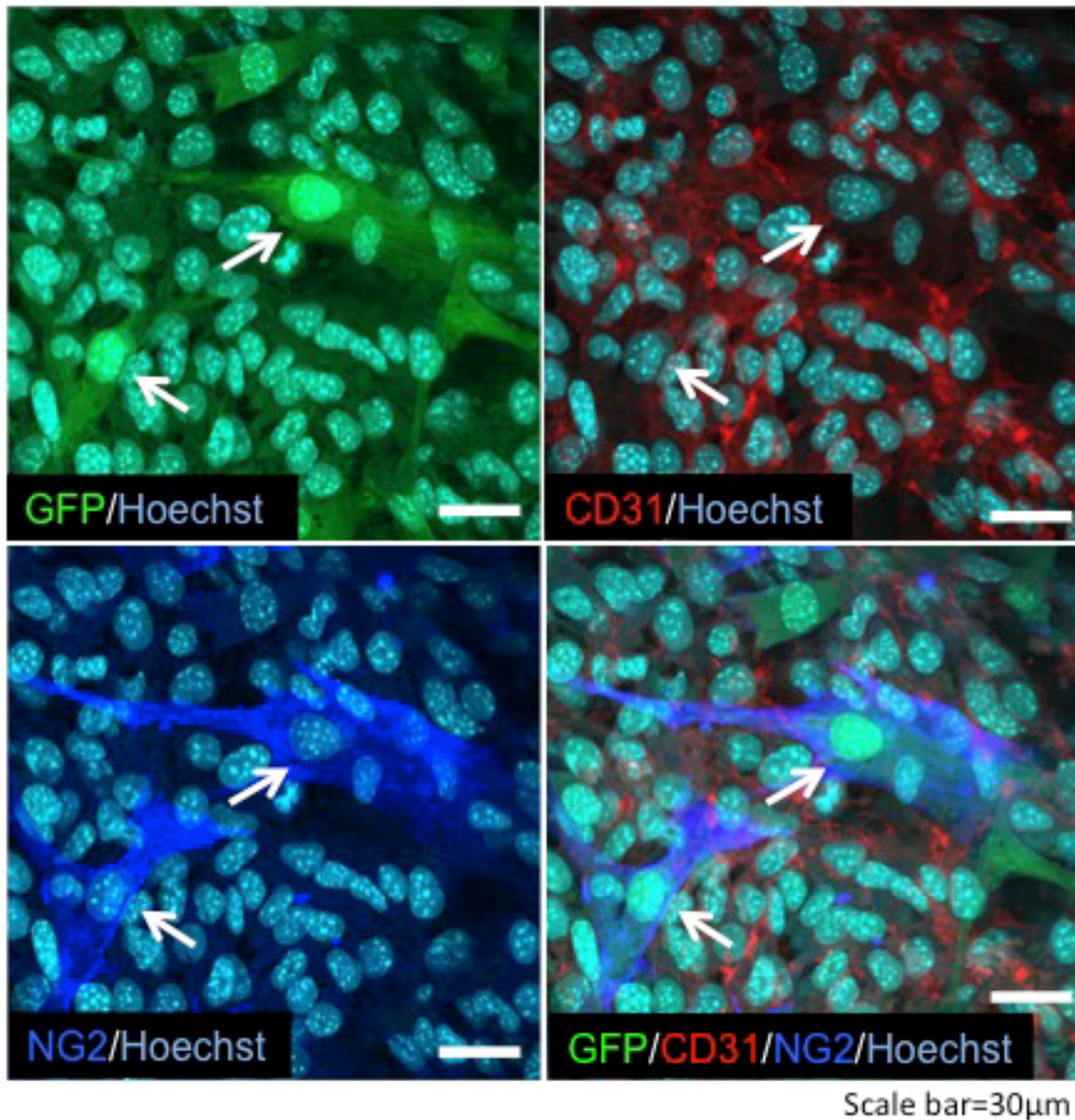


図 4 血管内皮細胞との直接的共培養による GFP-DFAT のペリサイトマーカー NG2 の発現 (矢印は NG2 を発現した GFP-DFAT を示す。)

加した ( $p < 0.05$ )。間接的共培養と直接的共培養間の比較においては直接的共培養のほうが有意にNG2発現が増加していた ( $p < 0.05$ )。RGS5のmRNAの発現はControlと比較し、間接的および直接的共培養において有意に低下した ( $p < 0.05$ )。間接的、直接的共培養間の比較においてはRGS5発現に有意差は認められなかった。PDGFR  $\beta$  mRNAの発現はControlと比較し間接的および直接的共培養において有意に増加した ( $p < 0.05$ )。間接的、直接的共培養間の比較においては直接的共培養のほうが有意にPDGFR  $\beta$  発現が増加していた ( $p < 0.05$ )。ASCにおいては、全体的にNG2, RGS5, PDGFR  $\beta$  の発現はDFATと比較すると低い傾向が認められた。以上の結果より血管内皮細胞との共培養により、DFATがペリサイトの形質を獲得する事が示された。一方、ASCはその一部にペリサイトの混入が疑われ、内皮細胞との共培養による明らかなペリサイト分化の所見は得られなかった。

#### 4. 考察

DFAT, ASCともに細胞間相互作用による血管内皮細胞の増殖能、管腔形成能を増加させる事が明らかになった。一方、血管内皮細胞に対する遊走能においてはDFATがASCに比べ有意に高い事が明らかになった。DFATとASCのサイトカイン発現プロファイルは類似している事が報告されている<sup>9)</sup>が、遊走活性を制御する因子において何らかの差異があると思われる。

またDFATは内皮細胞との共培養によりペリサイトへの分化の可能性が示された。一方、ASCは内皮細胞との共培養にてペリサイト分化の傾向を示さなかった。ASCがペリサイトへの分化傾向を示さなかった理由として、ASCではDFATに比べ未分化ペリサイトマーカー<sup>9)</sup>であるRGS5の基礎発現が低く、またペリサイト分化に重要なシグナルを伝達するPDGFR  $\beta$  の発現誘導が低いという形質に起因している可能性がある。ASCはin vitroおよびin vivoにおいて高い血管新生作用<sup>10-12)</sup>が知られており、虚血性疾患に対する血管新生を目的とした臨床研究も始まっている。今後、ASCとDFATのin vivoにおける血管新生効果を直接比較する前臨床試験を行い、両者の治療用細胞としての有用性を評価する必要がある。

#### 5. 結語

DFATは血管内皮細胞に作用し、その細胞増殖能、遊走能、管腔形成能を促進する事が明らかになった。また、血管内皮細胞との直接的および間接的共培養によりペリサイトへ分化する可能性が示唆された。一方、ASCは血管内皮細胞に対しDFATと同等の細胞増殖能・管腔形成能を示すが、細胞遊走能は低い事が明らかになった。また、ASCのペリサイトへの分化能は、DFATに比べ高くないことが示された。DFATはASCと同様に治療の血管新生における有用な治療用細胞ソースとなりうる可能性がある。

#### 文献

- 1) Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6(4), 389-395. doi:10.1038/74651
- 2) Matoba, S., Tatsumi, T., Murohara, T., Imaizumi, T., Katsuda, Y., Ito, M., et al. (2008). Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *American Heart Journal*, 156(5), 1010-1018. doi:10.1016/j.ahj.2008.06.025
- 3) Lunde, K., Solheim, S., Aakhus, S., Arnesen, H., Abdelnoor, M., Egeland, T., et al. (2006). Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 355(12), 1199-1209. doi:10.1056/NEJMoa055706
- 4) Rosenzweig, A. (2006). Cardiac cell therapy—mixed results from mixed cells. *The New England Journal of Medicine*, 355(12), 1274-1277. doi:10.1056/NEJMe068172
- 5) Schächinger, V., Erbs, S., Elsässer, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Hölschermann, H., et al. (2006). Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 355(12), 1210-1221. doi:10.1056/NEJMoa060186
- 6) Matsumoto, T., Kano, K., Kondo, D., Fukuda, N., Iribe, Y., Tanaka, N., et al. (2008). Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *Journal of Cellular Physiology*, 215(1), 210-222. doi:10.1002/jcp.21304
- 7) Jumabay, M., Matsumoto, T., Yokoyama, S.-I., Kano, K., Kusumi, Y., Masuko, T., et al. (2009). Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(5), 565-575. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.004
- 8) Kikuta, S., Tanaka, N., Kazama, T., Kazama, M., Kano, K., Ryu, J., et al. (2013). Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Engineering Part A*, 19(15-16), 1792-

- 1802.doi:10.1089/ten.TEA.2012.0380
- 9) Arnold, C., Feldner, A., Pfisterer, L., Hödebeck, M., Troidl, K., Genové, G., et al. (2014). RGS5 promotes arterial growth during arteriogenesis. *EMBO Molecular Medicine*, **6**(8), 1075 - 1089. doi:10.15252/emmm.201403864
  - 10) Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C. A., Busse, R., & Bouloumié, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*, **110**(3), 349-355. doi:10.1161/01.CIR.0000135466.16823.D0
  - 11) Piccinno, M. S., Veronesi, E., Loschi, P., Pignatti, M., Murgia, A., Grisendi, G., et al. (2013). Adipose stromal/stem cells assist fat transplantation reducing necrosis and increasing graft performance. *Apoptosis*: **18**(10), 1274-1289. doi:10.1007/s10495-013-0878-7
  - 12) Yoo, J. H., Shin, J. H., An, M. S., Ha, T. K., Kim, K. H., Bae, K. B., et al. (2012). Adipose-tissue-derived stem cells enhance the healing of ischemic colonic anastomoses: An experimental study in rats. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*, **28**(3), 132 - 139. doi:10.3393/jksc.2012.28.3.132