

マウス脱分化脂肪細胞の血管新生作用に関する研究

Study on angiogenic activity in mouse dedifferentiated fat cells

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

Hirofumi WATANABE¹⁾, Kazuhiro HAGIKURA²⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Shori TAKAHASHI¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾

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

【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用な細胞ソースとなりうる可能性がある。

【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²⁻⁵⁾。

Matsumoto ら⁶⁾ 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パ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⁷⁾。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。

【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凍、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。

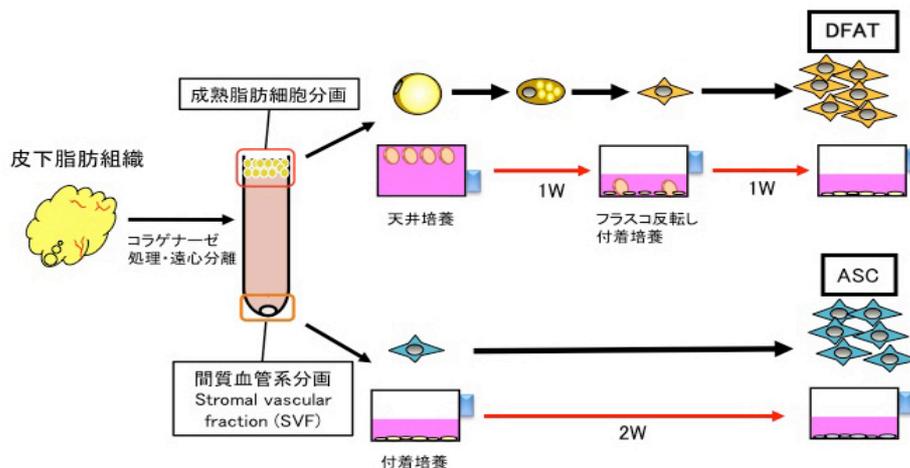


図1. 脱分化脂肪細胞(DFAT)、脂肪組織由来幹細胞(ASC)の調製法

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 1×10^4 、プレート底面にマウス血管内皮細胞 (MS1) 5×10^3 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(MS1)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) 5×10^3 、プレート底面に DFAT あるいは ASC 2×10^4 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 Healthcare) 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 8×10^5 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 5×10^3 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)。

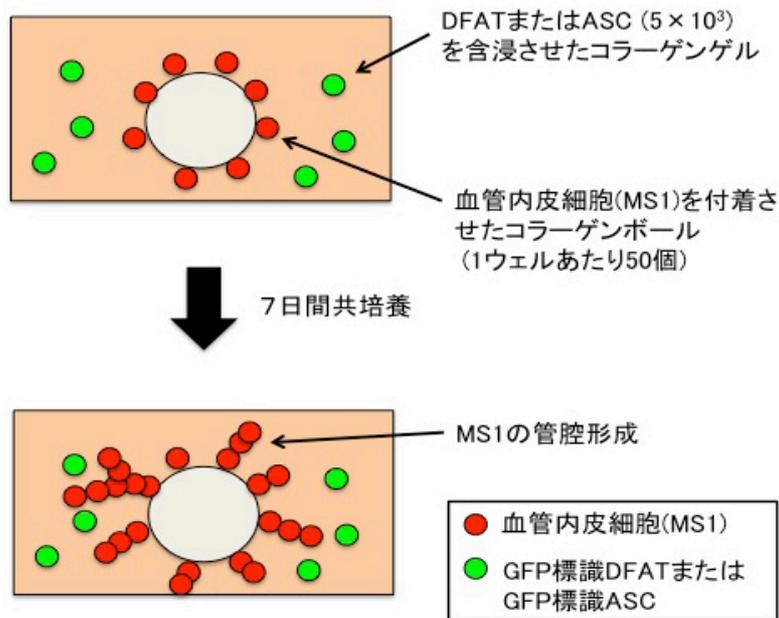


図2. コラーゲンボールを用いた血管内皮細胞管腔形成アッセイ

血管内皮細胞との共培養によるペリサイトマーカー(NG2)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 RTPCR 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 β (MM_00435546)を検討した。 β 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、 β アクチン mRNA に対する相対的定量解析 (Comparative Ct 法)を行った。

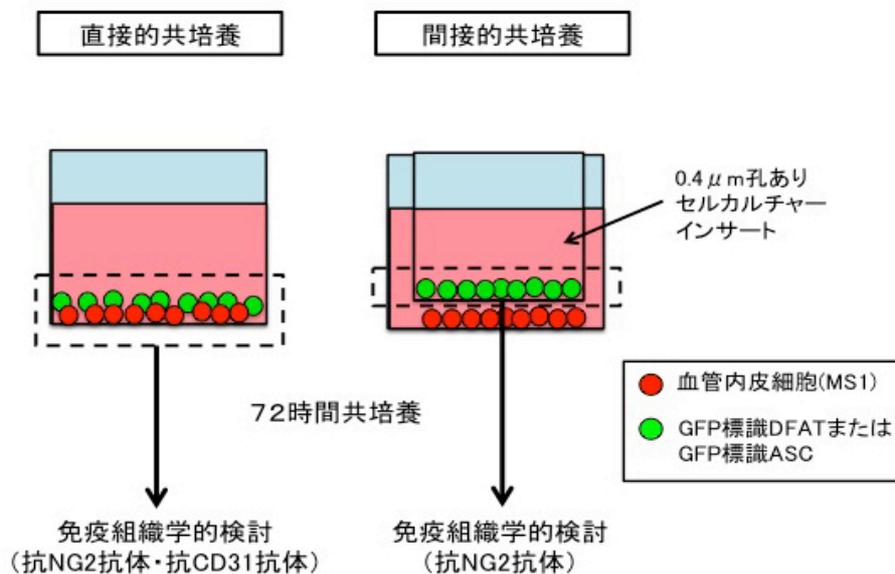


図3. 血管内皮細胞との共培養によるペリサイト分化能の検討

統計処理

実験により得られた定量結果は mean ± 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 を統計学的有意差とした。統計処理は PRISM5 (GraphPad Software) を用いて行った。

【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(NG2)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。

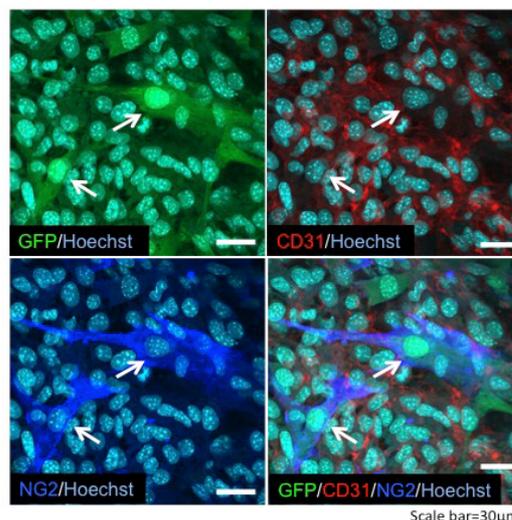


図4. 血管内皮細胞との直接的共培養による GFP-DFAT のペリサイトマーカーNG2 の発現
(矢印は NG2 を発現した GFP-DFAT を示す。)

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 β 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 β 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 β 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。

【考察】

DFAT、ASC と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⁸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⁹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 β 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¹⁰⁻¹²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。

【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 と同様に治療的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。

【参考文献】

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 : an International Journal on Programmed Cell Death*, 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