

## 主論文の要約

論文題名：マウス皮膚欠損修復過程における成熟脂肪細胞の形質転換及び組織再生に関する検討

医学研究科生理系細胞再生・移植医学専攻 石川三友紀

### 【背景・目的】

細胞の可塑性には、脱分化と分化転換の2種類が存在する。このような細胞の可塑性は、魚類や有尾両生類において、組織傷害に対する正常な応答であることが知られている。一方、哺乳類においては病的条件下であっても傷害部位の細胞の脱分化や分化転換による組織再生は起こらないとされてきた。近年、遺伝子改変技術の進歩により、特定の細胞をゲノムレベルでラベリングし、その細胞の運命追跡が可能となった。その結果、マウスなどの哺乳類においても、組織傷害後の組織修復過程で成熟細胞の脱分化現象や分化転換が起こり、組織修復に関わることが示された<sup>1,2)</sup>。皮膚組織では種々の間質細胞が動員され、組織修復に寄与していることが明らかとなっている。一方で、動員される間質細胞の起源や成熟脂肪細胞の関与について多くは不明である。成熟脂肪細胞は体外培養することにより人為的に脱分化させる<sup>3)</sup>ことが可能であるが、生体内において同様の現象が起こるかは明らかになっていない。そこで今回、成熟脂肪細胞の運命追跡が可能な遺伝子改変マウスを用いて傷害モデルとして皮膚全層欠損モデルを作製し、創傷治癒過程における成熟脂肪細胞の形質変換および組織再生への関与を検討した。

### 【方法】

すべての動物実験は、日本大学動物実験運営内規（動物実験計画書承認番号：AP15M005、AP15M005-2、AP15M005-3、AP15M005-4、AP19MED005-1）、

日本大学遺伝子組換え実験実施規定（遺伝子組換え実験計画書整理番号：2015

医 1、2015 医 1-2、2015 医 1-3）に従い実施した。タモキシフェン投与により

アディポネクチン発現細胞特異的に赤色蛍光色素 tdTomato を発現する

Adipoq-CreERT2;Rosa26-tdTomato マウスを作製し、成熟脂肪細胞特異的レポ

ーターマウスとして実験に用いた（12-18 週齢のオスマウス）。このマウスにタ

モキシフェンを投与後、背部に表皮、真皮、皮膚脂肪層を含む皮膚全層欠損創

を作製した。皮膚欠損作製後 0、7、14、21 日目に背部皮膚組織の凍結切片標本

を作成し、免疫組織染色を行い、経時的に組織修復過程を観察した（各時点 n =

4）。成熟脂肪細胞は脂肪滴を有する成熟脂肪細胞マーカー Perilipin<sup>+</sup> 細胞として

同定した。また、脂肪滴を有さない Perilipin<sup>-</sup> tdTomato<sup>+</sup> 細胞を tdTomato<sup>+</sup>

fibroblast-like cell (FLC) と定義して、同定と定量を行った。作成した組織切片

標本からほぼ等間隔に 3 切片を選択し、Perilipin<sup>-</sup> tdTomato<sup>+</sup> FLC 数の合計を計

測した（各時点 n = 4）。

作成した組織切片標本からほぼ等間隔に 3 切片を選択し、各種間質細胞数及

び tdTomato<sup>+</sup> FLC 数、各種間質細胞の形質を示す tdTomato<sup>+</sup> FLC 数の合計を

計測した（各染色 n = 4）。CD31<sup>+</sup>細胞を血管内皮細胞、NG2<sup>+</sup>細胞をペリサイト、

DLK1<sup>+</sup> Sca-1<sup>-</sup> 細胞を Reticular fibroblast、Sca-1<sup>+</sup> DLK1<sup>+</sup> or<sup>-</sup> 細胞を

Pro-adipogenic fibroblast、CD26<sup>+</sup> 細胞を Papillary Fibroblast、ASMA<sup>+</sup> を示す

線維芽細胞様細胞を筋線維芽細胞、Ki-67<sup>+</sup> 細胞を増殖性細胞とした。作成した組織切片標本からほぼ等間隔に3切片を選択し、各種間質細胞数及びtdTomato<sup>+</sup> FLC 数、各種間質細胞の形質を示す tdTomato<sup>+</sup> FLC 数の合計を計測した(各染色 n = 4)。

## 【結果】

皮膚欠損作製後7日、14日目において欠損部の肉芽組織に線維芽細胞様形態を示す Perilipin<sup>-</sup> tdTomato<sup>+</sup> FLC の出現が多数認められた。Perilipin<sup>-</sup> tdTomato<sup>+</sup> FLC は21日目には著明に減少し、7日目及び14日目と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に低下していた。このことから、皮膚の修復に伴い Perilipin<sup>-</sup> tdTomato<sup>+</sup> FLC が一過性に出現することが明らかになった。皮膚欠損作製後14日目の肉芽組織の解析では、tdTomato<sup>+</sup> FLC の一部に、ペリサイト(NG2<sup>+</sup>)、Reticular fibroblast (DLK1<sup>+</sup> Sca-1<sup>-</sup>)、Pro-adipogenic fibroblast (Sca-1<sup>+</sup> DLK1<sup>or-</sup>)の形質を示す細胞が認められた。また、tdTomato<sup>+</sup> FLC の一部には細胞増殖マーカー Ki-67 陽性を示す細胞も確認された。一方、血管内皮細胞(CD31<sup>+</sup>)、筋線維芽細胞(ASMA<sup>+</sup>)、Papillary fibroblast (CD26<sup>+</sup>)の形質を示す細胞は検出されなかった。肉芽組織中の各種間質細胞数を定量した結果、血管内皮細胞、Reticular fibroblast、筋線維芽細胞、ペリサイト、Papillary fibroblast、Pro-adipogenic fibroblast の順で出現頻度が高いことが明らかとなった。

## 【考察】

本研究において、Adipoq-CreERT2;Rosa26-tdTomato マウスを用いて皮膚全層欠損モデルを作製した結果、組織の修復に伴い肉芽組織内に成熟脂肪細胞に由来する Perilipin<sup>-</sup> tdTomato<sup>+</sup> FLC が一過性に出現することが明らかとなった。

そして tdTomato<sup>+</sup> FLC の一部は、ペリサイトや Reticular fibroblast、

Pro-adipogenic fibroblast の形質を有していることが示唆された。Genetic

lineage tracing という手法を用いて、マウス皮膚全層欠損に対する治癒過程にお

いて、成熟脂肪細胞に由来する細胞が肉芽組織内に出現し、異なった種類の細胞に形質変換することを確認した研究は、世界的に見ても報告がなく、新規性のある研究成果であると思われる。

肉芽組織中に出現する tdTomato<sup>+</sup> FLC は皮膚欠損作製後 21 日目には著明に減少し、その出現は一過性であることが明らかになった。この所見は、創傷治癒過程において一過性に出現する筋線維芽細胞やマクロファージなどと同様に、tdTomato<sup>+</sup> FLC も創傷治癒を制御する細胞として一過性に出現し、アポトーシス等のプログラムされた細胞死により消失していくことが示唆された。

皮膚全層欠損モデルの肉芽組織内における tdTomato<sup>+</sup> FLC の形質解析を行った結果、tdTomato<sup>+</sup> FLC の一部がペリサイトや Reticular fibroblast、

Pro-adipogenic fibroblast の形質を獲得していることが明らかとなった。この結

果より、tdTomato<sup>+</sup> FLC は創傷治癒過程において、血管新生や毛包再生、脂肪組織の再構築に関与している可能性が考えられる。

Liao ら<sup>4)</sup>は、脂肪組織の移植実験により、虚血ストレス条件下で成熟脂肪細胞由来の脱分化が起こることを報告している。この報告は、組織障害部位に成

成熟脂肪細胞由来の FLC が出現する点で本研究結果と類似しているが、GFP ラベルした他家細胞を移植しているモデルであり、細胞の形質まで解析したのではない。また、Marangoni ら<sup>5)</sup>は、成熟脂肪細胞特異的レポーターマウスにブレオマイシンを投与し、強皮症モデルを作製したところ、病巣部位に FLC が出現し、筋線維芽細胞の形質を獲得したことを報告した。この研究と本研究とは、FLC が筋線維芽細胞に形質転換したという点で異なる結果であった。この結果の相違の理由として、この報告では、ブレオマイシン誘発強皮症モデルを使用しており、本研究とは異なる化学的刺激による皮下脂肪組織の萎縮に起因する傷害モデルであること、ブレオマイシンを最大 14 日間投与しているため皮膚組織におけるストレス刺激が本研究とは大きく異なる慢性的なものであることなどに起因している可能性がある。この報告の結果と本研究の結果を併せて考察すると、化学的刺激か物理的刺激かといった刺激の種類の違いや、刺激の持続時間の違いにより、成熟脂肪細胞が異なった反応を示し、その結果様々な細胞に形質転換する可能性があると考えられる。

本研究により、創傷治癒過程において生体内でも脂肪細胞が脱分化する可能性が示された。そのメカニズムとして、創傷治癒に関わるサイトカインである腫瘍壊死因子 $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$  : TNF $\alpha$ )<sup>6)</sup>や Wnt-10b<sup>7)</sup>が PPAR $\gamma$ の発現を阻害することで脂肪細胞の形質を喪失させることが報告されている。そのため、本研究においても、創傷治癒過程において分泌された炎症性サイトカインにより、成熟脂肪細胞の PPAR $\gamma$ 発現レベルを低下させ、成熟脂肪細胞の脱分化を誘導した可能性が考えられる。実際に、生体外で成熟脂肪細胞を脱分化して得られる脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell : DFAT) は PPAR $\gamma$ の発現レベルが著明に低下していることが明らかになっている<sup>3)</sup>。今後、tdTomato<sup>+</sup> FLC 出現の分子メカニズムを明らかにするため、さらなる検討が必要であると考えられる。更に、創傷治癒に対して tdTomato<sup>+</sup> FLC がどのような役割を果たすか、機能を解析する必要がある。

### 【まとめ】

皮膚全層欠損モデルの組織修復過程において、組織の修復に伴い脂肪細胞由来の線維芽細胞様細胞 (tdTomato<sup>+</sup> FLC) が一過性に出現することが明らかとなった。tdTomato<sup>+</sup> FLCの一部は、ペリサイト、Reticular fibroblast、Pro-adipogenic fibroblast の形質を獲得していることが示された。皮膚全層欠損モデルの組織修復過程において、成熟脂肪細胞が脱分化または形質転換し、皮膚組織の修復に関与する可能性が示唆された。

### 【引用文献】

- 1) Hsu YC, Li L, Fuchs E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med* 2014; 20: 847-856.
- 2) Tarlow BD, Pelz C, Naugler WE, et al. Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell* 2014; 15: 605-618.
- 3) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; 215: 210-222.
- 4) Liao Y, Zeng Z, Lu F, et al. In vivo dedifferentiation of adult adipose cells.

PLoS One 2015; 10: e0125254.

5) Marangoni RG, Korman BD, Wei J, et al. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors.

Arthritis Rheumatol 2015; 67: 1062-1073.

6) Cawthorn WP, Heyd F, Hegyi K, et al. Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway.

Cell Death Differ 2007; 14: 1361-1373.

7) Ross SE, Hemati N, Longo KA, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. Science 2000; 289: 950-953.11) Salzer MC, Lafzi A,

Berenguer-Llargo A, et al. Identity Noise and Adipogenic Traits Characterize

Dermal Fibroblast Aging. Cell 2018; 175: 1575-1590 e1522.