

## マウス皮膚欠損治癒過程における成熟脂肪細胞の形質転換

Transformation of mature adipocytes during the healing process in a mouse skin full-thickness defect model

石川三友紀, 萩倉一博, 風間智彦, 李予昕, 松本太郎  
Miyuki ISHIKAWA, Kazuhiro HAGIKURA, Tomohiko KAZAMA, Yuxin LI,  
Taro MATSUMOTO

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】

遺伝子改変技術の進歩により、生体内で特定の細胞の運命追跡が可能となった。その結果、マウスなどのほ乳類においても組織障害後の組織再生過程で成熟細胞の脱分化現象が起こることが明らかとなり、生体内の一部の成熟細胞が脱分化し組織再生に関わることが示されている。一方、成熟脂肪細胞が組織再生に関与しているかは明らかになっていない。本研究では、成熟脂肪細胞の運命追跡が可能で遺伝子改変マウスを用いて全層皮膚欠損モデルマウスを作製し、治癒過程における成熟脂肪細胞の関与及び形質転換の可能性を検討した。その結果、傷害部位に成熟脂肪細胞由来の線維芽細胞様形態を示すfibroblast-like cell(FLC)の出現を認め、その一部の細胞は前駆脂肪細胞マーカーや間葉系幹細胞(MSC)マーカー、ペリサイトマーカー陽性であることから、皮膚欠損後の治癒過程で成熟脂肪細胞に由来する線維芽細胞様細胞が出現し、その一部は肉芽組織内でMSC、前駆脂肪細胞、ペリサイトなどの形質を獲得していることが示唆された。

### 【背景および目的】

近年、Genetic- lineage tracing により、生体内で特定の細胞の運命追跡が可能となった。その結果、マウスなどのほ乳類においても組織障害後の組織再生過程で成熟細胞の脱分化現象が起こることが明らかとなり、生体内の一部の成熟細胞が脱分化し組織再生に関わることが示されている<sup>1)2)3)4)5)</sup>(表 1)。一方、成熟脂肪細胞が組織再生に関与してい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で遺伝子改変マウスに皮膚全層欠損を作製し、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。生体内における成熟脂肪からの脱分化が証明されることで、組織修復に成熟脂肪細胞の関与が明らかとなれば、組織修復に対する脂肪細胞の有用性を見出すことが可能となる。

表 1. 哺乳類における脱分化メカニズムによる組織再生の報告

生物名	組織傷害	脱分化する成熟細胞	分化転換する細胞	文献
マウス	尿管急性虚血再灌流	尿管上皮細胞	尿管上皮細胞	Humphreys BD et al. Cell Stem Cell 2:284, 2008
ラット	膵部分切除	膵管上皮細胞	膵管上皮、インスリン産生細胞	Li WC et al. J Cell Sci 123:2792, 2010
マウス	肺傷害(インフルエンザウイルス)	クララ細胞	I型・II型肺胞上皮細胞	Kumar PA et al. Cell 147: 525, 2011
マウス	気道傷害 (SO <sub>2</sub> , インフルエンザウイルス)	気道分泌細胞	基底細胞、分泌細胞、繊毛細胞	Tata PR et al. Nature 503:218, 2013
マウス	心筋梗塞	心筋細胞	心筋細胞	Senyo SE et al. Nature 493:433, 2013

### 【方法】

tamoxifen 投与により成熟脂肪細胞特異的に cre リコンビナーゼを発現するマウス (Adiponectin-Cre-ERT2 マウス)と、cre 存在下に tdTomato を発現するマウス (ROSA26-LSL-td Tomato マウス)を交配し、脂肪細胞の運命追跡を可能とするレポーターマウス (Adipoq-CreERT2/tdT マウス)を作製した。このマウスに tamoxifen 1mg を 5 日間腹腔内投与後<sup>6)</sup>、背部に 1cm×1cm の皮膚全層欠損創を作製した。創部保護のため、ハイドロコロイドドレッシング剤で創部を被蓋した。欠損作製時、欠損作製後 1 週間、2 週間、3 週間のタイムポイントで欠損部の組織標本作製し、tdTomato の発現を組織学的に評価した(図 1)。形質転換の指標として tdTomato 陽性で成熟脂肪細胞マーカーperilipin 陰性を示す細胞の同定と定量を行った。また、Ki-67(増殖細胞マーカー)、CD31(血管内皮細胞マーカー)、ASMA(平滑筋・筋線維芽細胞マーカー)、DLK1(脂肪前駆細胞マーカー)、Sca-1(間葉系幹細胞マーカー)、PDGFRα(間葉系幹細胞マーカー)、NG2(ペリサイトマーカー) の抗体を用いて tdTomato 陽性細胞の増殖性や細胞形質を評価した。

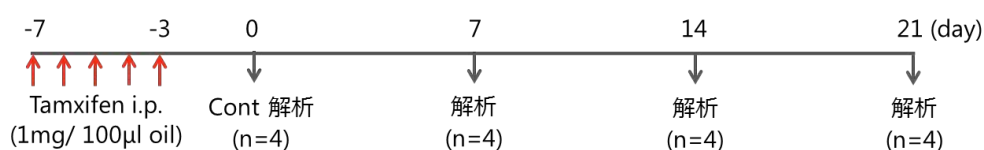


図 1. 実験プロトコール

### 【結果】

tdTomatoの蛍光はtamoxifen投与後のマウスの腸間膜や結合組織中の脂肪組織にのみ認められ、肝臓、腎臓、肺といった実質臓器はすべてtdTomato陰性であった。皮下組織にはtdTomato陽性を示す2層の脂肪組織が存在し、これらはPerilipinの局在と完全にマージすることから、tdTomatoが脂肪細胞のみに発現していることが確認できた。また、脂肪組織中の微小血管や間質細胞はtdTomato陰性であり、脂肪滴をもつ成熟脂肪細胞のみがtdTomatoを発現していることを確認した。皮膚欠損作製後1週間で、欠損部の脂肪組織周囲に成熟脂肪細胞マーカーperilipin陰性で線維芽細胞様形態を示すtdTomato陽性 fibroblast-like cell(FLC)の出現を認め、皮膚欠損作製後2週間でピークに肉芽組織内でも確認された。欠損部中のtdTomato陽性FLCの細胞数をカウントしたところ皮膚欠損作製後1週間、2週間で急激に増加した後、皮膚欠損作製後3週間で減少していくことが明らかとなった。tdTomato陽性FLCの一部は脂肪前駆細

胞マーカーDLK1や間葉系幹細胞マーカーSca-1及びPDGFR $\alpha$ 、ペリサイトマーカーNG2、細胞増殖マーカーKi-67を発現していた。一方、血管内皮マーカーCD31や筋線維芽細胞マーカーASMAを発現している細胞は確認できなかった。

### 【考察】

本研究では、マウスにおける皮膚全層欠損作製により、欠損部の肉芽組織に成熟脂肪細胞由来の tdTomato 陽性 FLC の出現を確認した。欠損部中の tdTomato 陽性 FLC の細胞数をカウントしたところ、皮膚欠損作製後 1 週間、2 週間で急激に増加した後、皮膚欠損作製後 3 週間で減少していくことから、tdTomato 陽性 FLC は組織障害により出現し組織の修復に伴って減少していくことが示された。tdTomato 陽性 FLC の一部は DLK1、Sca-1 及び PDGFR $\alpha$ 、NG2 を発現していたことから MSC、前駆脂肪細胞、ペリサイトへの形質転換の可能性が示された<sup>7)</sup>。しかし、Marangoni らによる報告<sup>8)</sup>とは異なり、平滑筋や血管への分化は確認できず組織修復への直接的な関与は確認できなかった。今後、肉芽組織がより発達するスプリントを使用した創傷治癒遅延のモデル<sup>9)</sup>等を作製し、tdTomato 陽性 FLC の形質や役割を詳細に検証することが望まれる。

### 【結語】

皮膚欠損後の治癒過程で成熟脂肪細胞に由来する線維芽細胞様細胞が出現し、その一部は肉芽組織内でMSC、前駆脂肪細胞、ペリサイトなどの形質を獲得していることが示唆された。

### 【参考文献】

- 1) Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell*. 2008 Mar 6;2(3):284-91.
- 2) Li WC, Rukstalis JM, Nishimura W, et al. Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats. *J Cell Sci*. 2010 Aug 15;123(Pt 16):2792-802.
- 3) Kumar PA, Hu Y, Yamamoto Y, et al. Distal airway stem cells yield alveoli in vitro and during lung regeneration following H1N1 influenza infection. *Cell*. 2011 Oct 28;147(3):525-38.
- 4) Tata PR1, Mou H, Pardo-Saganta A, et al. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature*. 2013 Nov 14;503(7475):218-23.
- 5) Senyo SE1, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 2013 Jan 17; 493 (7432):433-6.
- 6) Sassmann A1, Offermanns S, Wettschureck N. Tamoxifen-inducible Cre-mediated recombination in adipocytes. *Genesis*. 2010 Oct 1;48(10):618-25.
- 7) Di Carlo SE, Peduto L. The perivascular origin of pathological fibroblasts. *J Clin Invest*. 2018 Jan 2;128(1):54-63.
- 8) Marangoni RG, Korman BD, Wei J, et al. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Apr;67(4):1062-73.
- 9) Jimi S, De Francesco F, Ferraro GA, et al. A Novel Skin Splint for Accurately Mapping Dermal Remodeling and Epithelialization During Wound Healing. *J Cell Physiol*. 2017 Jun;232(6):1225-1232.