

マウス脱分化脂肪細胞の
ペリサイト分化メカニズム

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系細胞再生・移植医学専攻

後藤 俊平

修了年 2017 年

指導教員 松本 太郎

マウス脱分化脂肪細胞の
ペリサイト分化メカニズム

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系細胞再生・移植医学専攻

後藤 俊平

修了年 2017 年

指導教員 松本 太郎

目次

略語表	1
ア) 概要	2
イ) 緒言	6
1. 背景	6
2. 目的	12
ウ) 対象と方法	13
エ) 結果	19
オ) 考察	24
カ) まとめ	29
キ) 謝辞	30
ク) 図および図説	31
ケ) 引用文献	45
コ) 研究業績	52

略語表

ALK	activin receptor-like kinase
ASC	adipose derived stem/stromal cell
ASMA	α -smooth muscle actin
bFGF	basic fibroblast growth factor
BM	bone marrow
BMP	bone morphogenetic protein
CAF	cancer-associated fibroblast
CSTI	Cell Science & Technology Institute
DFAT	dedifferentiated fat cell
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FBS	fetal bovine serum
GFP	green fluorescent protein
GLUT4	glucose transporter 4
iPS	induced pluripotent stem cell
LPL	lipoprotein lipase
MSC	mesenchymal stem cell
NG2	neuron glial 2
PAI-1	plasminogen activator inhibitor
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
RGS5	regulator of G-protein 5
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
TGF	transforming growth factor
Tie-2	tyrosine kinase with Ig-like loops and epidermal growth factor homology domains-2
VEGF	vascular endothelial growth factor

ア) 概要

【背景・目的】

成熟脂肪細胞から調製される脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) は、高い血管新生能を有し、そのメカニズムの一つとして DFAT が血管構成細胞であるペリサイトへ直接分化することが推定されている。血管内皮細胞との共培養により DFAT はペリサイト様細胞へ分化することが明らかにされているが、そのメカニズムについては明らかになっていない。本研究では、主に血管内皮細胞との共培養系を用いて DFAT のペリサイトへの分化メカニズムについて検討を行った。

【方法】

1. コラーゲンゲル内共培養実験

DsRed 標識マウス臍臓由来内皮細胞株 MS1 と Green fluorescent protein

(GFP) 標識マウス DFAT を付着させたコラーゲンビーズを、コラーゲンゲル内で 14 日間培養した。Hoechst 33342 にて核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて管腔形成を観察した。

2. MS1 との共培養におけるペリサイトマーカーの発現解析

GFP 標識 DFAT を単独あるいは MS1 と直接的または間接的に共培養を行い、ペリサイトマーカー Neuron glial2 (NG2) と平滑筋 α アクチン (α -smooth muscle actin: ASMA) の発現を蛍光免疫染色およびリアルタイム RT-PCR 法にて定量評価した。Smad2/3 阻害剤 PD169316 および Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) 中和抗体を用いた実験では、共培養開始時にそれぞれ 5 μ M、25 μ g/ml となるように培地に添加した。

3. TGF- β 1 添加実験

GFP 標識 DFAT に各種濃度のヒトリコンビナント TGF- β 1 を添加し、NG2 と

ASMA の発現を蛍光免疫染色およびリアルタイム reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法にて検討した。PD169316 を用いた実験では、実験開始時に 5 μ M となるように培地に添加した。

【結果】

1. 血管内皮細胞の管腔形成に対する DFAT 共培養の影響

コラーゲンゲル内共培養実験では、DFAT は MS1 とともにゲル内に遊走し、MS1 の管腔形成の外側を裏打ちするようにして接着し、発芽的血管を構成する所見が認められた。この結果より、DFAT が血管内皮細胞との相互作用によりペリサイト様の形質を獲得することが示唆された。

2. DFAT と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

DFAT と MS1 とを直接的または間接的に共培養を行い、ペリサイトマーカーの発現を蛍光免疫染色およびリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。その結果、DFAT からの NG2、ASMA の発現は、DFAT 単独に比べ直接共培養・間接共培養で有意に増加していた。一方 MS1 からの NG2、ASMA の発現はほとんど検出されなかった。以上の結果より、MS1 との共培養により DFAT のペリサイトマーカーの発現が増加し、ペリサイトに分化誘導されることが示唆された。

3. DFAT と血管内皮細胞との共培養による TGF- β 、PDGFB の発現解析

DFAT の TGF- β 1 発現は、DFAT 単独に比べ、直接共培養・間接共培養で有意に増加していた。MS1 の TGF- β 1 発現も、DFAT 単独に比べ MS1 単独が約 1.2 倍、直接共培養が約 2.7 倍、間接共培養が約 1.8 倍と増加していた。PDGFB の発現解析では、DFAT については、単独に比べ直接共培養にて PDGFB の発現が増加していたが、MS1 に比べると DFAT からの発現は極めて低値であった。MS1 では、単独に比べて直接共培養・間接共培養ともに有意に増加していた。これらの結果より、DFAT と内皮細胞との共培養によりそれぞれの細胞から TGF- β 1 や PDGFB の発現が亢進することが示された。

4. TGF- β 1 添加によるペリサイトマーカー発現解析

次に DFAT に各種濃度の TGF- β 1 を添加し、ペリサイトマーカーの発現変化を検討した。蛍光免疫染色によるペリサイトマーカー発現解析では、NG2、ASMA ともに、TGF- β 1 濃度が 1 ng/ml から発現細胞が有意に増加した。NG2、ASMA の発現誘導は 1 ~50 ng/ml までいずれの濃度でも同程度に認められた。リアルタイム RT-PCR 法による遺伝発現解析では、免疫染色の結果と同様に、同程度に発現亢進が認められた。以上の結果より、DFAT のペリサイト分化に係わる主要なサイトカインは TGF- β 1 であることが示唆された。

5. DFAT からのペリサイトマーカー発現に対する TGF- β 1 シグナルの影響

TGF- β 1 の主要な細胞内シグナル伝達経路である Smad2/3 に対する阻害薬

(PD169316) を用いて、DFAT ペリサイトマーカーの発現変化を検討した。まず TGF- β 1 刺激により誘導されるペリサイトマーカー発現に対する Smad2/3 阻害薬の影響を検討した。その結果、TGF- β 1 刺激により誘導された NG2、ASMA 陽性細胞の率は、コントロールである DMSO 添加群に対し、PD169316 添加群は有意に減少していた。リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析でも同様に、TGF- β 1 刺激により誘導された NG2 や ASMA の遺伝子発現増加は、PD169316 添加により両者とも有意に抑制された。以上の結果から、NG2 および ASMA の発現は、TGF- β 1 下流シグナル経路である Smad2/3 を阻害することで抑制されることが明らかになった。

次に MS1 との共培養により誘導されるペリサイトマーカー発現に対する Smad2/3 阻害薬の影響を検討した。MS1 との直接共培養により誘導された NG2 陽性細胞率は、DMSO 添加群に比べ PD169316 添加群では有意に低下していたが、その抑制効果は限定的であった。また TGF- β 1 中和抗体添加群でも抑制効果は限定的であった。以上の結果より、内皮細胞との共培養による DFAT のペリサイト分化にも Smad2/3 経路が関与しているが、特に直接共培養による NG2 発現に関しては TGF- β シグナル経路以外の機序も存在することが示唆された。

【結論】

今回の検討において、DFAT は血管内皮細胞との相互作用により、ペリサイトへ分化することが示唆された。その分化メカニズムとして、TGF- β 1 刺激を介した Smad2/3 シグナル伝達経路が重要であることが明らかになった。本研究成果は、DFAT がもつ血管新生作用の機序を明確にし、さらに有効な血管新生細胞治療法を開発したり、細胞移植に伴う副次作用を制御する上で重要な知見となると思われる。

イ) 緒言

【背景】

1. 脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT)

Matsumoto ら¹は、ヒトを含むほ乳類の脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を、天井培養という方法で体外培養することにより生じてくる線維芽細胞様の形態をした細胞群が、高い増殖能と多分化能を持つことを明らかにした。

これは、一度終末分化した細胞でも適切な環境下で培養することにより、人工的に未分化な細胞へと脱分化させることが可能であることを意味している。この成熟脂肪細胞より調製される多能性細胞は、脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) と呼ばれている。

DFAT では lipoprotein lipase (LPL)、Leptin、glucose transporter4 (GLUT4) などのいわゆる成熟脂肪細胞マーカーの発現が完全に消失しており、成熟脂肪細胞には通常発現していない Runx2、Sox9、平滑筋 α アクチンといった、骨、軟骨、平滑筋の初期分化マーカーの発現が認められることから、DFAT はいわゆる間葉系前駆細胞の形質をもった細胞群であると考えられる。

DFAT の細胞表面抗原は、培養骨髄間葉系細胞 (Bone marrow mesenchymal stem cell: BM-MSC) や脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem/stromal cell: ASC) にほぼ一致した発現プロファイルを示す。また、皮膚線維芽細胞ともかなり類似したパターンを呈することが明らかになっている。

これまで DFAT は、適切な分化誘導培地にて培養することにより、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、筋線維芽細胞に分化することが明らかになっている¹⁻⁵。また、DFAT は沿軸中胚葉に由来する細胞のみならず、臓側中胚

葉に由来する血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞へ分化転換させることが可能である⁶。

さらに、障害部位へ DFAT を移植することにより、下肢虚血モデルにおける血流改善作用、心筋梗塞モデルにおける心機能改善作用、脊髄損傷モデルにおける運動機能改善⁷、慢性腎障害モデルにおける腎機能改善⁸、尿道括約筋傷害モデルに対する排尿機能改善作用⁹、骨粗鬆症モデルに対する骨密度増加作用¹⁰、皮膚全層欠損モデルにおける人工真皮移植後の皮膚再生促進作用¹¹ など、幅広い組織修復能を示すことが明らかになっている。DFAT 移植による組織修復能には局所の血管新生を伴うことが示されており^{6,12,13}、DFAT が血管構成細胞に分化する機序に加え、DFAT から分泌される種々の液性因子が重要な役割を果たしていることが示唆されている。

DFAT は Induced pluripotent stem cell (iPS) 細胞のような全能性はないが、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、短期間に大量調整が可能であるため、再生移植用細胞ソースとして早期の臨床応用が期待されている。

2. ペリサイト

周皮細胞（ペリサイト）とは、1871年に Eberth ら¹⁴によって初めて報告され、機能的・構造的に成熟した血管を形成するために重要な細胞である。ペリサイトの起源は中胚葉由来と考えられてきたが、近年はその起源は多様であり¹⁵、おそらく間葉系細胞の範疇にはいる前駆細胞を経て、ペリサイトへ分化すると考えられている。一般的な既存の血管からの血管新生の過程は、①ペリサイ

ト・周皮細胞の剥離、基底膜の分解、内皮細胞の活性化、②内皮細胞の増殖分裂、遊走、管腔形成、ペリサイト・周皮細胞の増殖、③不完全な血管のトリミング、④ペリサイト・周皮細胞の接着、基底膜形成、血管の成熟・安定化、に分けられる。この過程において、とりわけ重要と考えられてきたものが、**Vascular endothelial growth factor (VEGF)** であり、**VEGF** やその経路を標的として血管新生抑制の効果を期待した治療薬、例えばベバシズマブやスニチニブ、ソラフェニブなどは、すでに臨床応用されている。

ペリサイトは、少なくともその一部が血管基底膜内に位置し、内皮細胞と **Peg-and-socket** などの構造を介して双方向に情報伝達を行っている^{16,17}。代表的には、血管新生の際に内皮細胞に向けてリクルートしてきたペリサイトは **Angiopoietin-1** を分泌し、そのレセプターである **Tyrosine kinase with Ig-like loops and epidermal growth factor homology domains-2 (Tie2)** を発現する内皮細胞に作用し、内皮細胞の分化・安定化を誘導する^{18,19}。一方で、内皮細胞が血小板由来成長因子 (**Platelet-derived growth factor: PDGF**) **B** を分泌し、ペリサイトはその受容体である **PDGF receptor- β (PDGFR β)** を発現する。これらの分子のノックアウトマウスでは、胎生期に循環器系の致死的な発生異常を認め、壁細胞を欠くことが知られており²⁰⁻²³、ペリサイトと内皮細胞の間の情報伝達が重要であることが推察できる。ペリサイトは **Blood-tissue-barrier** が存在する網膜や脳、特に血液脳関門において豊富に存在することが明らかにされ^{18,24}、血液脳関門の機能維持にペリサイトが重要な働きを担っているとの報告もある²⁵。しかしながら、血管内皮細胞から分泌される **Transforming growth factor- β (TGF- β)** や **PDGF** が、ペリサイト分化を誘導する因子とし

て重要と考えられている¹⁸が、未だに不明な点が多いのが現状である。

ペリサイトの特異的マーカーは未だ同定されておらず、Neuron glial2 (NG2)、regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)、PDGFR β などが比較的特異度の高いマーカーとして用いられる。NG2は細胞外マトリックス成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであり、ペリサイトが腫瘍血管へリクルートされる際に発現が上昇するとの報告がある²⁶。NG2は胎生期の微小血管発生早期において内皮細胞に接着する機能的ペリサイトのよいマーカーである事が報告されている²⁷。このようにNG2は主に成熟したペリサイトマーカーとして用いられる。RGSはGTPase活性を刺激する事により、Gタンパク共役型受容体のシグナルを抑制するファミリーを構成する分子群である。このファミリーの中でRGS5は幼若ペリサイトに高発現することが知られている²⁸。従って、RGS5は分化初期の未熟なペリサイトマーカーとして用いられる。PDGFRはPDGFに対するチロシンキナーゼ型レセプターであり、 α および β の2種類が同定されている。PDGFR β はペリサイトに高発現しており、血管内皮細胞から分泌されたPDGFBに反応し、ペリサイトの内皮細胞へのリクルートメントや増殖能に重要な役割を果たす事が知られている²⁹。また平滑筋細胞のマーカーとして知られる平滑筋 α アクチン (α -smooth muscle actin: ASMA)は、ペリサイト分化に伴い高発現するため、特異性は低いがペリサイトマーカーとしてよく用いられている^{30,31}。

これまでの当研究室の検討によりNG2とASMAがin vitroにおけるペリサイト分化をよく反映するマーカーである可能性が示唆されたため、本研究でもペリサイトマーカーとしてNG2とASMAの発現変化を評価した。

すでに当研究室でも、DFAT のペリサイト分化に関する研究が行われており、マウス臍臓由来血管内皮細胞株である MS1 との共培養により DFAT がペリサイトへ分化する可能性が示されている³²。MS1 はコラーゲンゲル内で三次元培養すると単独では管腔形成を認めないが、線維芽細胞との共培養や、Sphingosine-1-phosphate 存在下では管腔形成が誘導されることが知られている³³。一方、DFAT と MS1 とのコラーゲンゲル内共培養により管腔形成を伴う血管様構造が誘導されるかについては、まだ明らかになっていない。

3. TGF- β

TGF- β は、広範な組織・細胞に存在する 25-kD ホモダイマーのサイトカインで、細胞の種類や培養条件により細胞の増殖・分化を促進、または阻害する。TGF- β は、細胞外基質蛋白質やプロテアーゼインヒビターの産生を促進し、逆にプロテアーゼの産生を阻害するなど多彩な生理活性を有し、血管新生、動脈硬化、癌、肝臓の線維化、免疫抑制、個体の発生等、様々な疾病や生理現象に深く関わっているものと考えられている³⁴。

TGF- β による血管新生制御機構は、血管内皮細胞に存在する I 型受容体 Activin receptor-like kinase 1 および 5 (ALK1、ALK5) により調節されている。TGF- β は、血管内皮細胞の ALK1 を介して Bone morphogenetic protein (BMP) シグナルを伝達する Smad1/5 をリン酸化し、誘導される Id1 が増殖・遊走を促進する一方で、ALK5 を介した Smad2/3 のリン酸化が Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) を誘導し、分化を促し血管を成熟させると考えられている³⁵。

また TGF- β は、上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) 因子としても有名であり、がん幹細胞やがん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast: CAF) の発生機構の調節を行っている因子として、非常に注目されている³⁶⁻³⁸。

【目的】

成熟脂肪細胞から調製される DFAT は高い血管新生能を有し、そのメカニズムの一つとして DFAT が血管構成細胞であるペリサイトへ直接分化することが推定されている。血管内皮細胞との共培養により DFAT はペリサイト様細胞へ分化することが明らかにされている³²が、そのメカニズムについては明らかになっていない。本研究では、主に血管内皮細胞との共培養系を用いて DFAT のペリサイトへの分化メカニズムについて検討を行った。

ウ) 対象と方法

1. 実験動物

C57BL/6J Green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックマウス (雄性、7 週齢) はオリエンタル酵母工業から購入し、日本大学医学部動物実験委員会の指針に従って実験を行った。本遺伝子改変マウスの飼育、実験への使用に関しては日本大学遺伝子組換え実験安全委員会 (承認番号 2011 医-3-5) および日本大学動物実験委員会 (承認番号 AP11M018-3) の承認を得て実施した。

2. 細胞の調製

GFP 標識マウス DFAT は、既報¹の調製方法に準拠して調製した。DFAT 調製法の概略を図 1 に示す。GFP トランスジェニックマウスから採取した皮下脂肪組織 (約 0.5 g) をトリミング後、0.1%コラゲナーゼ溶液 (Collagenase type I, Koken) を用いて 37°C、45 分間処理し、フィルター濾過を行った後、低速遠心分離 (135 g、3 分間) を行った。上層に集積した成熟脂肪細胞を採取し、20% ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS) 含有脂肪細胞用無血清培地 CSTI-303MSC (Cell Science & Technology Institute) で満たした 12.5 cm² 細胞培養用フラスコ (NUNC) 中に細胞を添加し、37°C、5%CO₂ 条件下で天井培養した。7 日後、培養液を交換し、細胞付着面が底になるようにフラスコを反転させ、さらに 7 日間培養を継続した。天井培養 14 日後に、細胞を PBS で洗浄後、0.05%Trypsin-EDTA 溶液 (Invitrogen) を用いて単離し、1:5 に希釈後、プラスチックディッシュ (BD Falcon) に再播種し、継代培養を行った。増殖培地は 20%FBS 含有 CSTI-303MSC を用い、3-4 日毎に培地交換を行った。第

4 継代以内の細胞を実験に使用した。

マウス臍臓由来内皮細胞株である MS1 および DsRed 標識 MS1 は Karolinska Institute (Sweden) より譲渡されたものを使用した。増殖培地は 10%FBS 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) を用いた。培地交換は 3-4 日毎に行った。継代培養は約 80~90%コンフルエントに到達後、細胞をリン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline: PBS) で洗浄し、0.05% Trypsin-EDTA 溶液を用いて細胞を単離し、1:5 に希釈後、プラスチックディッシュに再播種して行った。

3. コラーゲンゲル内共培養実験

10%FBS 含有 DMEM に、コラーゲンビーズ (Cytodex3™, GE Healthcare) 3,000 個と DsRed 標識 MS1 および GFP 標識 DFAT (P4) を 4×10^5 ずつ添加し、緩急に震盪することによりコラーゲンビーズに MS1 と DFAT を付着させた。この MS1 と DFAT を付着させたコラーゲンビーズ 50 個を、250 μ l コラーゲンゲル (collagen I rat tail, BD Biosciences) 内で培養した。培養 14 日目に 4%パラホルムアルデヒド (Wako) で固定し、5 μ g/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) にて核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 Fluoview FV10i (Olympus) を用いて管腔形成を観察した。実験の概略を図 2 に示す。

4. MS1 との共培養におけるペリサイトマーカの発現解析

GFP 標識 DFAT を単独あるいは MS1 と直接的または間接的に 96 時間共培養を行い、ペリサイトマーカ-NG2 と ASMA の発現を蛍光免疫染色にて検討

した。実験の概略を図3に示す。DFAT 単独 (DFAT alone) は 24 well プレート (BD Falcon) に GFP 標識 DFAT (P4) 2×10^4 を播種し 5%FBS 含有 DMEM にて 96 時間単層培養を行った。MS1 との細胞間接着のある共培養 (Direct co-culture) は 24 well プレート (BD Falcon) に GFP 標識 DFAT (P4) (1×10^4) と MS1 (1×10^4) を混在させたものを播種し、5%FBS 含有 DMEM にて 96 時間共培養を行った。MS1 との細胞間接着のない共培養 (Indirect co-culture) は 24 well プレートと $0.4 \mu\text{m}$ 孔ありセルカルチャーインサート (BD Falcon) を用いた。5%FBS 含有 DMEM を加えたプレート内に GFP 標識 DFAT (P4) (1×10^4) を播種し、セルカルチャーインサート内に MS1 (1×10^4) を播種し、96 時間共培養を行った。それぞれ培養後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、NG2 および ASMA に対する蛍光免疫染色を行った。

Smad2/3 阻害剤 PD169316 (Sigma Aldrich) および TGF- β 1 中和抗体 1D11.16.8 (GeneTex) を用いた実験では、共培養開始時にそれぞれ $5 \mu\text{M}$ 、 $25 \mu\text{g/ml}$ となるように培地に添加した。

5. MS1 との共培養によるペリサイトマーカー遺伝子の発現解析

GFP 標識 DFAT を単独あるいは MS1 と直接的または間接的に 72 時間共培養を行い、ペリサイトマーカー NG2 と ASMA の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。実験の概略を図4に示す。実験には 6well プレート (BD Falcon) と $0.4 \mu\text{m}$ 孔ありセルカルチャーインサート (BD Falcon) を用いた。単独培養はセルカルチャーインサート内に細胞を 1×10^5 ずつ播種し、直接的共培養における DFAT と MS1 は、それぞれ 1×10^5 個ずつの細胞を、セ

ルカルチャーインサートの表面と裏面に播種し、間接的共培養ではその片方の細胞を well の底面に播種した。5%FBS 含有 DMEM で 72 時間培養後、それぞれの細胞をセルスクレイパーで採取し total RNA を抽出した。

6. TGF- β 1 添加実験

蛍光免疫染色用サンプルは、GFP 標識 DFAT を 24well プレートに 2×10^4 ずつ播種し、遺伝子発現解析用サンプルは、GFP 標識 DFAT を 6well プレートに 1×10^5 ずつ播種し、70~80%コンフルエントに到達した時点でヒトリコンビナント TGF- β 1 (PeproTech) を各濃度 (0, 1, 5, 10, 20, 50 ng/ml) で添加した。蛍光免疫染色用サンプルは 96 時間後に固定し、遺伝子発現解析用サンプルは 72 時間後に total RNA を抽出した。PD169316 添加実験では、TGF- β 1 添加 60 分前に最終濃度 5 μ M となるように添加した。

7. 蛍光免疫染色

各条件で 96 時間培養した細胞は、4%パラホルムアルデヒドにより固定後、一次抗体反応として、ウサギ抗マウス NG2 抗体 (1:200, Merk Millipore)、マウス抗ヒト ASMA 抗体 (1:200, Dako) を用い、4°Cで一晩反応させた。一次抗体希釈液として 10%ロバ血清、1%ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA)、0.5% Triton X 含有 PBS を用いた。二次抗体反応として、Alexa-647 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:400, Thermo Fisher Scientific)、Alexa-594 標識ロバ抗マウス IgG 抗体 (1:400, Thermo Fisher Scientific) を用い室温で 4 時間反応させた。5 μ g/ml Hoechst 33342 で核染色を行い、蒸留水で洗浄後、

ProLongGold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific) でマウントした。

作製した標本は、蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE) を用いて観察、撮影を行った。

8. リアルタイム RT-PCR 法

mRNA の発現の変化は、TaqMan プローブを用いたリアルタイム reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて評価した。各条件での 72 時間培養した細胞は、セルスクレイパーを用いて回収し、RNeasy Micro kit (Qiagen) を用いて細胞から total RNA を抽出した。そして High capacity cDNA Reverse Transcription kits (Applied Biosystems) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。Taqman プライマー/プローブとして、TGF- β 1 (Mm_01178820)、PDGFB (Mm_00440677) と、ペリサイトマーカー NG2 (Mm_00507257)、ASMA (Mm_00725412) を用いた。PCR 反応は、TaqMan Fast Advanced Master Mix Product Insert (Applied Biosystems)、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて、95°C/10 分加温の後、95°C/30 秒と 60°C/30 秒のサイクルを 40 サイクル行った。GAPDH 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、GAPDH に対する相対的定量解析 (Comparative CT 法) を行った。

9. 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。多群間比較は One-way analysis of variance (ANOVA) にて検定を行った後、Post-hoc 検定

として Tukey's multiple comparison にて各群間の統計解析を行った。P < 0.05
を有意水準とした。統計処理は IBM SPSS software ver.21.0 を用いて行った。

エ) 結果

1. 血管内皮細胞の管腔形成に対する DFAT 共培養の影響

GFP 標識 DFAT と DsRed 標識 MS1 をコラーゲンビーズに付着させた後、コラーゲンゲル内で 2 週間培養し、蛍光免疫染色で評価した。その結果、MS1 はビーズからゲル内に遊走、増殖し、発芽的管腔構造を示した (図 5)。GFP 標識 DFAT は MS1 とともにゲル内に遊走し、MS1 の管腔形成の外側を裏打ちするようにして接着し、発芽的血管を構成する所見が認められた。この結果より、DFAT が血管内皮細胞との相互作用により血管内皮細胞の管腔形成を誘導し、DFAT 自身はペリサイト様の形質を獲得することが示唆された。

2. DFAT と血管内皮細胞との共培養による DFAT からのペリサイトマーカーの発現解析

GFP 標識 DFAT と MS1 とを直接的または間接的に共培養を行い、ペリサイトマーカー NG2 と ASMA の発現を蛍光免疫染色にて検討した。DFAT の NG2 発現率は DFAT 単独群では平均 1.8%であるのに対し、直接共培養群は 70.2%、間接共培養群は 13.6%であり、直接共培養群で他群に比べ有意に発現が高くなった (図 6)。DFAT の ASMA 発現率は DFAT 単独群では 8.0%であるのに対し、直接共培養群は 90.5%、間接共培養群は 89.3%であり、直接、間接共培養ともに ASMA の発現が誘導された。MS1 は GFP 陰性であり、その核は DFAT の核に比べ明らかに小型であったため、直接的共培養下でも DFAT と容易に識別が可能であった (図 6 Direct co-culture)。MS1 は直接的共培養の結果、NG2 や ASMA の発現は認められなかった。

次に DFAT と MS1 とを直接的または間接的に共培養を行い、ペリサイトマーカーの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。その結果、DFAT からの NG2 の発現は、DFAT 単独に比べ直接共培養で約 11.4 倍、間接共培養では約 1.4 倍と有意に増加していた (図 7)。一方 MS1 からの NG2 発現はほとんど検出されなかった。DFAT からの ASMA の発現は、DFAT 単独に比べ、直接共培養で約 1.2 倍、間接共培養で約 2.0 倍と有意に発現が増加した。MS1 からの ASMA の発現は、NG2 同様にほとんど認められなかった。

以上の結果より、MS1 との共培養により DFAT のペリサイトマーカーの発現が増加し、ペリサイトに分化誘導されることが示唆された。

3. DFAT と血管内皮細胞との共培養による TGF- β 、PDGFB の発現解析

ペリサイトの遊走、増殖、分化に関連する因子として TGF- β 1 および PDGFB の遺伝子発現解析を行った。その結果、DFAT の TGF- β 1 発現は、DFAT 単独に比べ、直接共培養にて約 1.7 倍、間接共培養では約 1.9 倍と有意に増加していた (図 8 上)。MS1 の TGF- β 1 発現も、DFAT 単独に比べ MS1 単独が約 1.2 倍、直接共培養が約 2.7 倍、間接共培養が約 1.8 倍と有意に増加し、間接共培養よりも直接共培養で有意に増加していた。

PDGFB の発現解析では、DFAT については、単独に比べ直接共培養にて PDGFB の発現が増加していたが、MS1 に比べると DFAT からの発現は極めて低値であった (図 8 下)。MS1 では、単独に比べて直接共培養が約 2.2 倍、間接共培養が約 3.9 倍と有意に増加していた。

これらの結果より、DFAT と内皮細胞との共培養によりそれぞれの細胞から

TGF- β 1 や PDGFB の発現が亢進することが示された。これらのサイトカインの発現を介して DFAT のペリサイト分化が誘導されることが推察された。

4. TGF- β 1 添加による DFAT からのペリサイトマーカー発現解析

次に DFAT に各種濃度の TGF- β 1 を添加し、ペリサイトマーカーの発現変化を検討した。蛍光免疫染色によるペリサイトマーカー発現解析では、NG2、ASMA とともに、TGF- β 1 濃度が 1 ng/ml から発現細胞が有意に増加した(図 9)。NG2、ASMA の発現誘導は 1 ~ 50 ng/ml までいずれの濃度でも同程度に認められた。

リアルタイム RT-PCR 法による遺伝発現解析では、免疫染色の結果と同様に、NG2、ASMA とともに、TGF- β 1 濃度が 1 ng/ml から発現が有意に増加し、50 ng/ml に至るまでいずれの濃度でも同程度に発現亢進が認められた(図 10)。

一方、PDGFB 刺激による DFAT からのペリサイトマーカーの発現増加は認められなかった(データ未掲載)。以上の結果より、DFAT のペリサイト分化に係わるサイトカインは TGF- β 1 であることが示唆された。

5. DFAT からのペリサイトマーカー発現に対する TGF- β 1 シグナルの影響

次に TGF- β 1 の主要な細胞内シグナル伝達経路である Smad2/3 に対する阻害薬(PD169316)を用いて、DFAT ペリサイトマーカーの発現変化を検討した。まず TGF- β 1 刺激により誘導されるペリサイトマーカー発現に対する Smad2/3 阻害薬の影響を検討した。その結果、TGF- β 1 50 ng/ml 刺激により誘導された NG2 陽性細胞の率は、コントロールである DMSO 添加群では約 58.5%であったのに対し、PD169316 添加群では約 15.4%と有意に減少していた

(図 11)。TGF- β 1 刺激により誘導された ASMA 陽性細胞率も DMSO 添加群で約 77.7%、PD169316 添加群で約 40.0%と有意に減少していた。リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析でも同様に、TGF- β 1 刺激により誘導された NG 2 や ASMA の遺伝子発現増加は、PD169316 添加により両者とも有意に抑制された (図 12)。以上の結果から、NG2 および ASMA の発現は、TGF- β 1 下流シグナル経路である Smad2/3 を阻害することで抑制されることが明らかになった。

次に MS1 との共培養により誘導されるペリサイトマーカー発現に対する Smad2/3 阻害薬の影響を検討した。MS1 との直接共培養により誘導された NG2 陽性細胞率は、DMSO 添加群で約 69.4%であったのに対し、PD169316 添加群で約 55.4%であった (図 13)。MS1 は、これまで同様に GFP 陰性であり、NG2 および ASMA の発現を認めなかった。DMSO 添加群に比べ PD169316 添加群では有意に低下していたが、その抑制効果は限定的であった。また TGF- β 1 中和抗体添加群でも約 51.3%と抑制効果は限定的であった。直接共培養により誘導された ASMA 陽性細胞率は、DMSO 添加群で約 87.7%であったのに対し、PD169316 添加群で約 71.5%、TGF- β 中和抗体添加群で約 24.2%であった。MS1 との間接共培養により誘導された NG2 陽性細胞率は、DMSO 添加群で約 12.1%であったのに対し、PD169316 添加群で約 5.3%であった (図 14)。間接共培養により誘導された ASMA 陽性細胞率は、DMSO 添加群で約 89.2%、PD169316 添加群で約 40.3%であった。NG2 陽性細胞率、ASMA 陽性細胞率ともに DMSO 添加群に比べ PD169316 添加群では有意に低下していた。

以上の結果より、内皮細胞との共培養による DFAT のペリサイト分化にも

Smad2/3 経路が関与しているが、特に直接共培養による NG2 発現に関しては TGF- β シグナル経路以外の機序も存在することが示唆された。

オ) 考察

今回の研究では、主に血管内皮細胞との共培養系など *in vitro* 誘導系を用いて DFAT のペリサイトへの分化と、それを制御する液性因子のシグナル伝達経路について検討した。コラーゲンビーズに付着させた DFAT と MS1 を、コラーゲンゲル内で培養した結果、MS1 の管腔形成過程の外側を裏打ちするようにして DFAT が遊走・接着する所見が認められた (図 5)。この結果より DFAT は MS1 の管腔形成を刺激し、DFAT 自身はペリサイト様の細胞へ形質転換することが示唆された。発芽的血管新生には種々の血管新生因子とそのレセプターとの相互作用により制御されていることが知られている。たとえば血管内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成には VEGF-A と VEGF レセプター 2 を介する経路が重要である³⁹。ペリサイトの遊走、増殖には血管内皮細胞から発現される PDGFB とペリサイトが発現する PDGFR β を介する経路が関与する。またペリサイトの血管内皮細胞への接着には、血管内皮細胞が発現する Jagged-1 とペリサイトが発現する Notch3 の経路が重要である⁴⁰。ペリサイトの増殖、分化には血管内皮細胞から分泌される TGF- β が重要な作用を示す¹⁸。さらにペリサイトから発現される Angiopoietin-1 と血管内皮細胞が発現する Tie2 との相互作用により血管の成熟化が促進する⁴¹。今回のコラーゲンゲルを用いた実験系では、血管新生因子を外部から添加していないため、コラーゲンビーズに付着させた血管内皮細胞と DFAT との相互作用により、それぞれの細胞からこれらの血管新生因子がバランス良く発現・分泌された結果、発芽的血管新生が誘導され、DFAT がペリサイトに分化したことが示唆される。既報^{9,10}では DFAT は、血管内皮細胞の増殖、管腔形成を誘導する VEGF を豊富に発現することが明らかになって

いる。また今回の実験結果では、MS1 と DFAT との共培養により、MS1 から PDGFB の発現が亢進し、また MS1 優位の TGF- β 1 の発現が認められた (図 8)。これらの実験結果は、上記のメカニズムと同様の反応がコラーゲンゲルの中で両細胞間に起こっていることを支持している。

DFAT と MS1 との共培養実験では、DFAT からの NG2 および ASMA の発現が認められ、ペリサイト様細胞に分化することが示された (図 6)。骨髄 MSC や ASC においても、血管内皮細胞との共培養によりペリサイトマーカーの発現誘導されることが報告されており⁴²、今回 DFAT でも同様の形質変化が起こることが証明された。今回、ASMA は、直接共培養、間接共培養ともに同程度に発現誘導されたが、NG2 は、直接共培養に比べ間接共培養で誘導率が低かった (図 6)。この結果は、ASMA の発現には、血管内皮細胞から分泌される液性因子を介した刺激で十分であるが、NG2 の発現には、血管内皮細胞から分泌される液性因子以外にも細胞の直接接触による異なった刺激が必要であることを示唆している。遺伝子発現解析の結果、直接共培養では間接共培養に比べ、血管内皮細胞からの TGF- β 1 の mRNA 発現が高いことが示された (図 8)。したがって直接共培養による NG2 の発現増加機序の一つとして、直接共培養によって増加した血管内皮細胞に由来する TGF- β 1 の関与が考えられる。TGF- β 1 刺激により DFAT からの ASMA 発現が増加することは、すでに自施設内からも報告されている^{5,43}。

TGF- β 1 を添加した DFAT からのペリサイトマーカーの発現の検討では、タンパク質レベルでも mRNA レベルでも、TGF- β 1 濃度が 1 ng/ml から NG2 および ASMA の発現が増加していた (図 9、10)。このことから、DFAT のペリ

サイト分化には、TGF- β 1 シグナルの関与が示唆された。NG2 は TGF- β 1 が低濃度でも有意に発現することが示されたが、ASMA の発現は、TGF- β 1 50ng/ml 未満の濃度では、その発現誘導が不安定であったため、以降の阻害実験ではより確実な発現誘導が必要と考え、50ng/ml の濃度で刺激を行った。DFAT に Smad2/3 阻害薬である PD169316 を添加すると、TGF- β 1 刺激で増加した NG2 および ASMA の発現が、有意差をもって抑制された (図 11、12)。特に NG2 および ASMA の mRNA 発現は、Smad2/3 阻害薬添加により、TGF- β 1 刺激前の発現レベルより低下した。この理由として、Smad2/3 阻害薬が DFAT からオートクライン分泌された TGF- β 1 も抑制した結果であると推測される。Smad2/3 は TGF- β の I 型受容体である ALK5 の下流で活性化されるシグナル因子であることから、TGF- β 1/ALK5/Smad2/3 経路が DFAT のペリサイト分化に重要なシグナル伝達経路であることが示唆された。DFAT のペリサイト分化に関与するシグナル伝達経路を明らかにしたという研究は今までに報告がなく、新規性の高い発見であると思われる。ペリサイトマーカー発現に対する Smad2/3 阻害薬の抑制効果は、mRNA レベルとタンパクレベルでは解離が認められた。この理由を明らかにするために今後、異なったタイムポイントでの発現解析が必要と思われる。また、今回は阻害薬を用いた実験結果のみであるため、今後、遺伝子工学的手法を用いて標的分子を特異的に欠損または過剰発現させた細胞を用いて確証実験を行う必要がある。さらに TGF- β のもう一つの I 型受容体である ALK1 を介するシグナル伝達経路の関与についても今後検討を行うことが望まれる。

一方、直接共培養による DFAT からのペリサイトマーカーの発現、特に NG2

の発現は Smad2/3 阻害薬では部分的にしか抑制できなかった (図 13)。さらに TGF- β 1 中和抗体の抑制効果も部分的であった。今回 Smad2/3 阻害薬が ALK5/Smad2/3 経路を完全に阻害しているか検討していないため、今後確認する必要があるが、これらのシグナル阻害薬や中和抗体を用いた実験結果は、内皮細胞と DFAT の直接的な細胞接触を伴う何らかのシグナルが NG2 発現に重要であることを示唆している。TGF- β には、潜在型と活性型があるといわれ、平滑筋細胞との混合培養した血管内皮細胞^{44,46}、レチノイドや Basic fibroblast growth factor (bFGF) で処理した血管内皮細胞^{47,48}、抗エストロゲン剤処理した平滑筋細胞⁴⁹、副甲状腺ホルモン処理した骨芽細胞⁵⁰ などでは、プラスミン依存性に TGF- β が活性化することが知られている⁵¹。このように生理的な TGF- β 活性化機構の一つとして、プラスミノゲンアクチベーターによるプラスミン産生を介するメカニズムがある。Rifkin らは血管内皮細胞と平滑筋細胞の接触によりプラスミノゲンアクチベーターが発現し、細胞表面または細胞外基質上において、産生されたプラスミンによって細胞外基質から TGF- β が放出・活性化されることを示している⁵¹。また Hintz らは、細胞接着のみならず、細胞外基質による牽引力が潜在型 TGF- β 1 の活性化には必要とも述べている⁵²。このようなプラスミンなどのプロテアーゼや細胞が発現する細胞外基質を介した TGF- β の活性化制御が、DFAT の直接的な細胞接着によるペリサイト分化に重要な役割を果たしている可能性がある。また TGF- β 1 経路以外で内皮細胞との直接的相互作用を起こす可能性のあるシグナル分子として、Jagged-1 とそのレセプター Notch3 や、Angiopoietin-1 とそのレセプター Tie 2 を介する経路などがあり、これらの経路の関与に関しても今後の検討課題と考える。

本研究では、DFAT のペリサイト分化を NG2 および ASMA のタンパク質レベル、mRNA レベルで評価したが、特異的なマーカーがない現在では、in vivo などで機能的な検討が望まれる。たとえば実験動物への移植実験などを通じて、ペリサイトに分化した DFAT が血管内皮細胞に接着することにより機能血管として血管透過性を保てるのか、またペリサイトの一機能である血管内皮細胞のエンドサイトーシスを制御できるかなどの検討が必要である。また DFAT に TGF- β 1 を作用させると、筋繊維芽細胞に形質転換することが報告されている⁵。筋繊維芽細胞は、EMT を起こすことにより、癌の悪性化、特に癌細胞の浸潤・転移を促進する因子としての側面も持つことが知られている。したがって、DFAT から TGF- β により誘導されるペリサイトと筋繊維芽細胞にどのような違いがあるのか明らかにし、それぞれを特異的に誘導する方法などを確立することが望まれる。

カ) まとめ

今回の検討において、**DFAT** は血管内皮細胞との相互作用により、ペリサイトへ分化することが示唆された。その分化メカニズムとして、**TGF- β 1** 刺激を介した **Smad2/3** シグナル伝達経路が重要であることが明らかになった。本研究成果は、**DFAT** がもつ血管新生作用の機序を明確にし、さらに有効な血管新生細胞治療法を開発したり、細胞移植に伴う副次作用を制御する上で重要な知見となると思われる。

キ) 謝辞

本研究にあたり、研究全般において終始ご指導戴きました日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野教授 松本太郎先生に深謝いたします。そして、研究全般を支えて戴きました日本大学医学部外科学系小児外科学分野教授 越永従道先生に深謝いたします。また、多くの実験手技をご指導くださり実験にお付き合いくださった日本大学医学部外科学系小児外科学分野 小沼憲祥先生、橋本真先生、小野賀功先生、日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 萩倉一博先生、風間智彦先生、風間美奈子先生、山元智衣さん、長岡悠紀さん、渡邊拓史先生ほかご協力戴きました皆様に心より感謝いたします。

ク) 図および図説

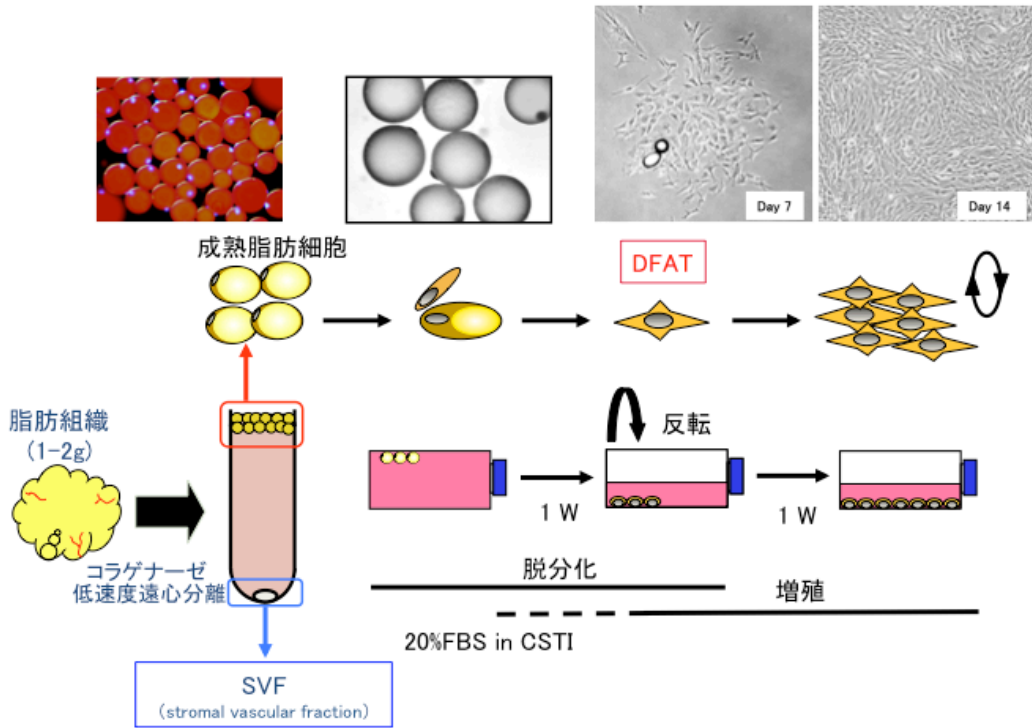


図 1. DFAT の調製方法

マウスから採取した皮下脂肪組織を、コラゲナーゼ処理し、低速遠心分離を行うことで、成熟脂肪細胞を単離する。浮遊層に集積した成熟脂肪細胞を回収し、培地を満したフラスコ内で1週間培養する（天井培養）。成熟脂肪細胞はフラスコ天井側に付着後、3日目頃には非対称分裂を起こし、繊維芽細胞様の形態を示すDFATが産生される。1週間後、培養液を交換し、細胞付着面が底になるようにフラスコを反転させ、通常の付着培養を行うことで、DFATは急速に増殖する。

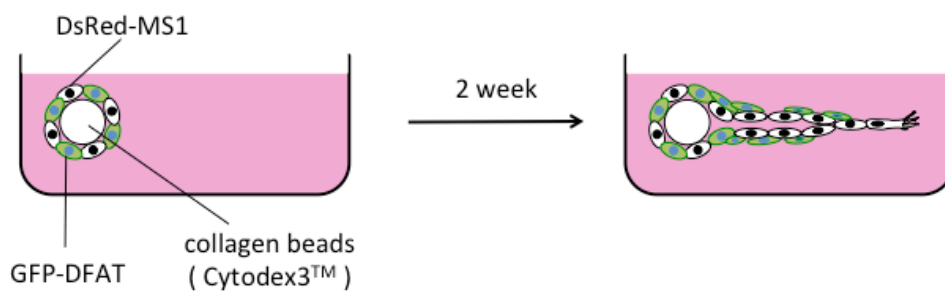


図 2. マウス血管内皮細胞 (MS1) の管腔形成に対する
DFAT 共培養の影響の検討

コラーゲンビーズ (Cytodex3™) に付着させた GFP-DFAT と DsrRed-MS1 を、コラーゲンゲル内で 2 週間培養し、MS1 の管腔形成反応に対する DFAT の細胞挙動を蛍光顕微鏡にて観察した。

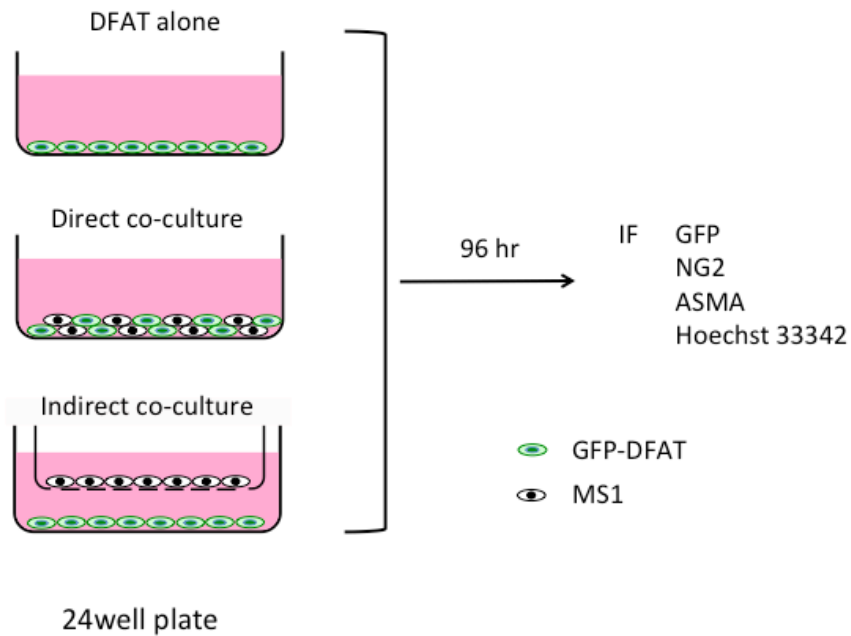


図 3. 蛍光免疫染色を用いた血管内皮細胞（MS1）との共培養による DFAT からのペリサイトマーカの発現解析

GFP 標識 DFAT を単独あるいは、MS1 と直接的または間接的に 96 時間共培養を行い、ペリサイトマーカ-NG2 と平滑筋 α アクチン（ASMA）の発現を蛍光免疫染色にて検討した。

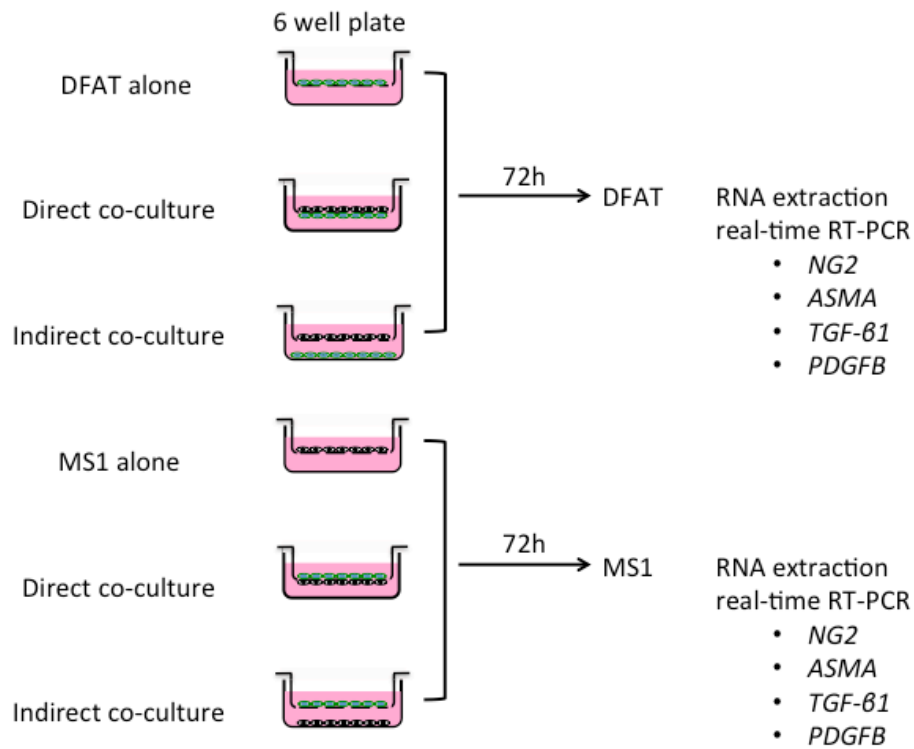


図 4. DFAT と血管内皮細胞 (MS1) の共培養による
DFAT・MS1 からの遺伝子発現解析

GFP 標識 DFAT と MS1 を、単独あるいは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、それぞれの細胞からの mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。検討遺伝子として、TGF- β 1、PDGFB、NG2、ASMA を検討した。

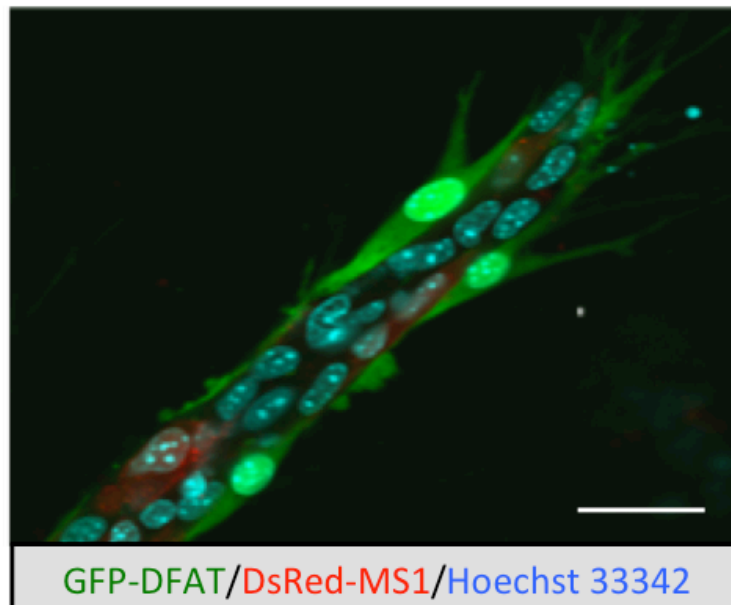


図 5. 血管内皮細胞 (MS1) の管腔形成に対する DFAT 共培養の影響

コラーゲンビーズに GFP 標識したマウス DFAT と、DsRed 標識した MS1 を付着させ、コラーゲンゲル内で2週間培養し、それぞれの細胞の分布や形態を評価した。核は Hoechst 33342 を用いて染色した。GFP (緑) 蛍光は DFAT を示し、DsRed (赤) 蛍光は MS1 を示す。DsRed 陽性を示す MS1 の管腔形成の外側を裏打ちするようにして、GFP 陽性を示す DFAT が遊走・接着する所見が認められた。Scale bar: 100 μ m。

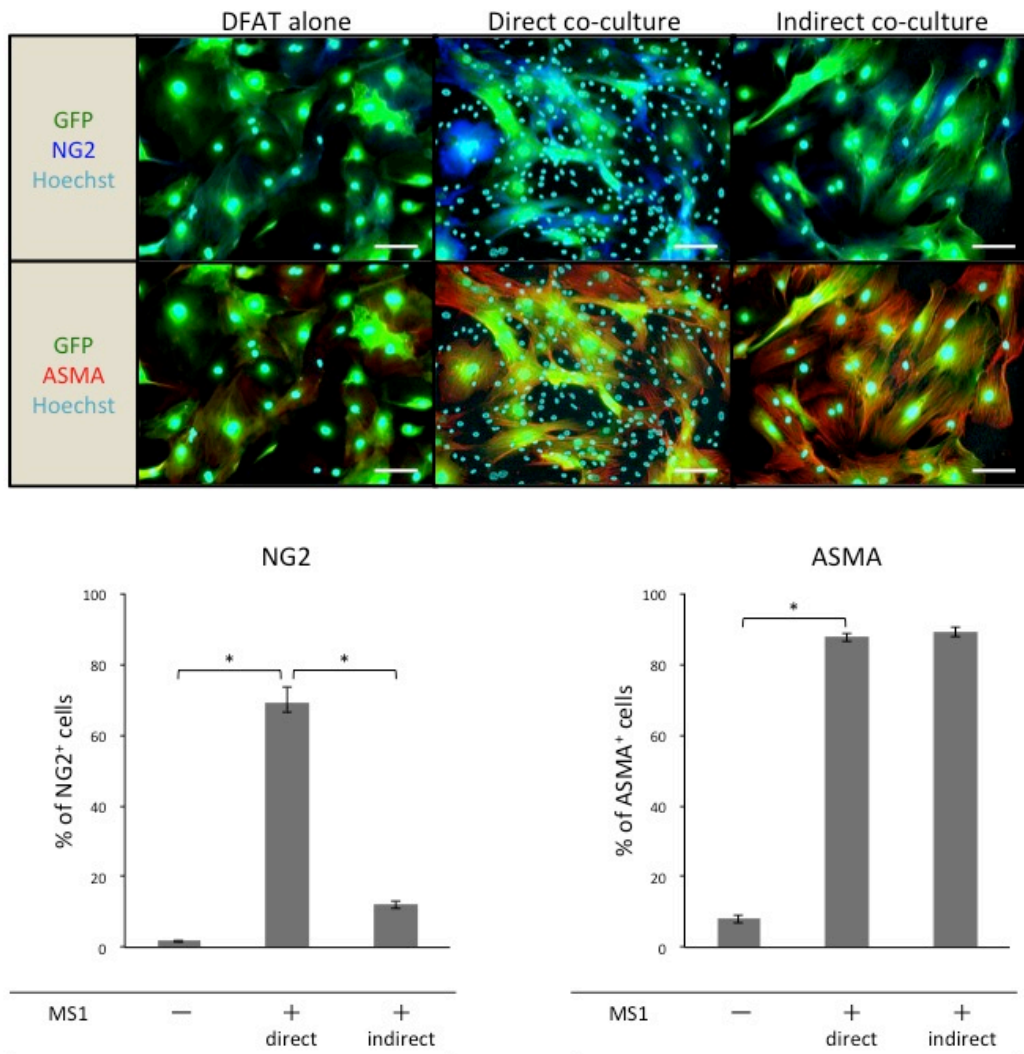


図 6. 蛍光免疫染色を用いた DFAT と血管内皮細胞 (MS1) との共培養による DFAT におけるペリサイトマーカーの発現解析

GFP 標識 DFAT を単独あるいは、MS1 と直接的または間接的に 96 時間共培養を行い、ペリサイトマーカー NG2 と ASMA の発現を蛍光免疫染色にて検討した。核は Hoechst 33342 を用いて染色した (水色)。上図: 代表的な免疫染色像。Scale bar: 100 μ m。下図: ランダム 3 視野内にある NG2、ASMA 陽性細胞数をカウントし、GFP (緑) 陽性細胞に占める比率を計測した。DFAT 単独群と、直接・間接共培養群で比較した。表示するデータは triplicate dish からであり、定量結果を mean \pm SD で示す。(*: $p < 0.05$ One-way ANOVA, Turkey's multiple comparison test)

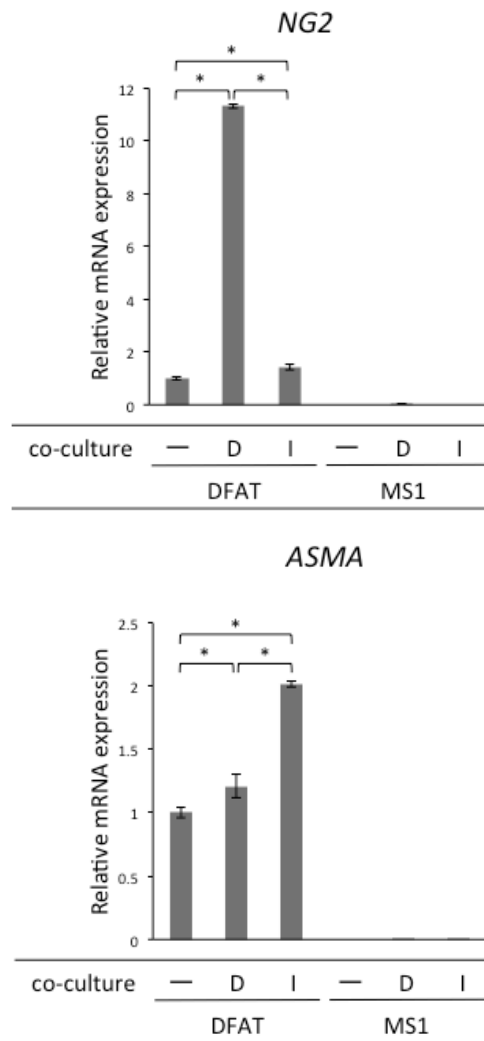
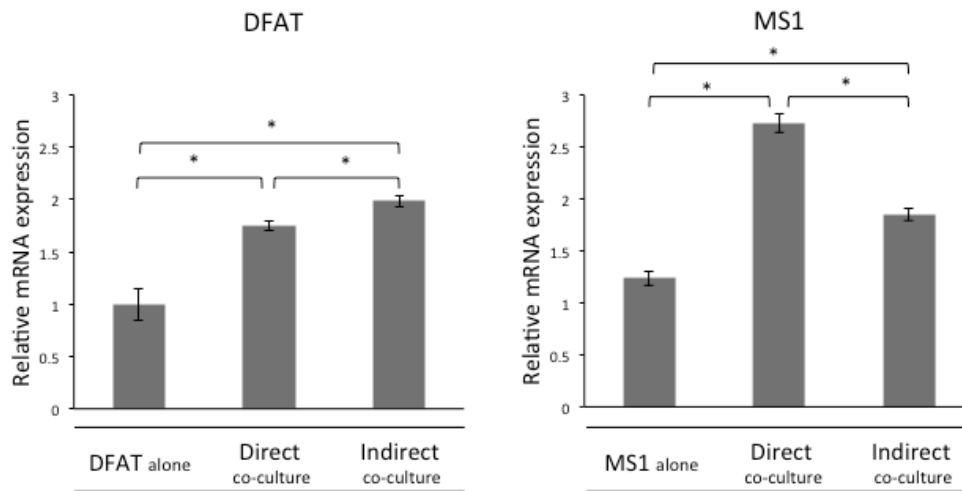


図 7. DFAT と血管内皮細胞 (MS1) の共培養における
ペリサイトマーカ遺伝子の発現解析

DFAT あるいは MS1 単独、DFAT と MS1 の細胞間接着のある共培養 (Direct)、細胞間接着のない共培養 (Indirect) について、図 4 の 6 条件において、培養 72 時間後に各群の DFAT あるいは MS1 から total RNA を抽出し、ペリサイトマーカ NG2、ASMA の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。GAPDH 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、GAPDH に対する相対的定量解析 (Comparative CT 法) を行った。表示するデータは、triplicate dish からであり、定量結果を mean ± SD で示す。(* : p<0.05 One-way ANOVA, Turkey's multiple comparison test)

TGF-β 1



PDGFB

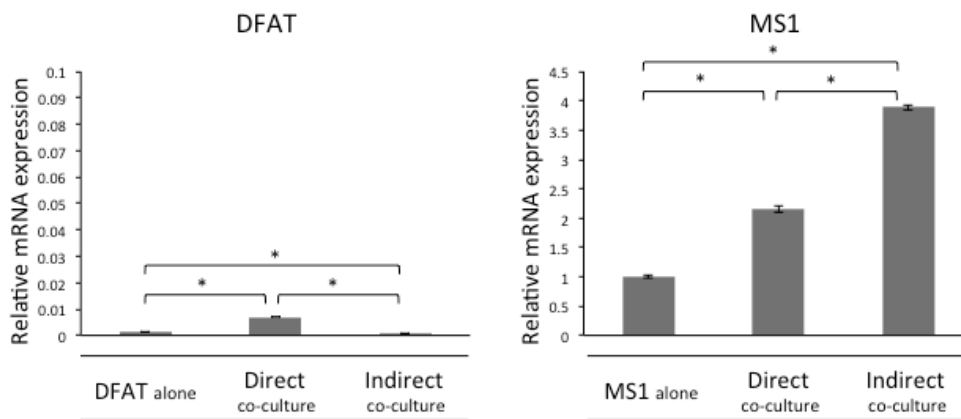


図 8. DFAT と血管内皮細胞 (MS1) の共培養における

TGF-β 1、*PDGFB* 遺伝子の発現解析

DFAT あるいは MS1 単独、DFAT と MS1 の細胞間接着のある共培養 (Direct)、細胞間接着のない共培養 (Indirect) について、図 4 の 6 条件において、培養 72 時間後に各群の DFAT あるいは MS1 から total RNA を抽出し、*TGF-β 1*、*PDGFB* の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。GAPDH 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、GAPDH に対する相対的定量解析 (Comparative CT 法) を行った。表示するデータは、triplicate dish からであり、定量結果を mean ± SD で示す。(* : One-way ANOVA, Turkey's multiple comparison test)

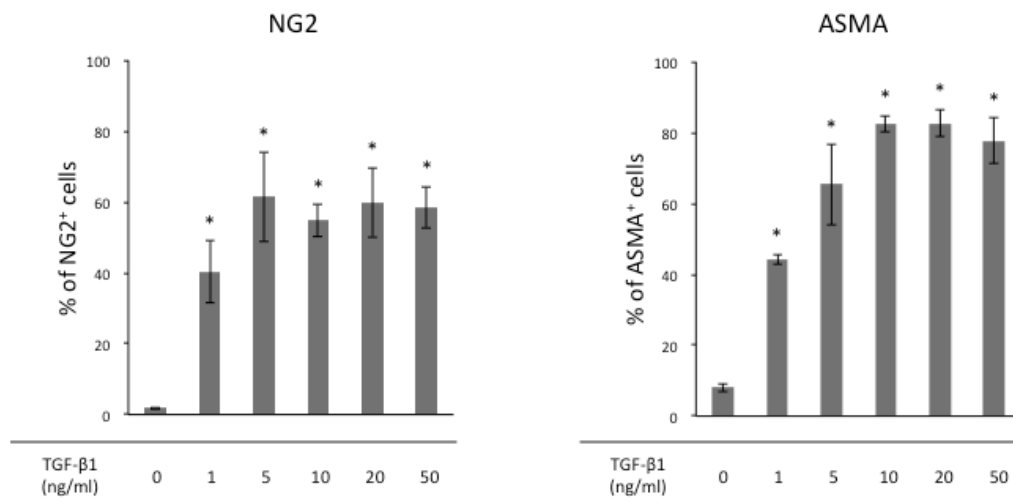


図 9. 蛍光免疫染色を用いた TGF-β 1 添加による DFAT からのペリサイトマーカー発現解析

GFP 標識 DFAT に各種濃度の TGF-β 1 を添加後 96 時間培養し、ペリサイトマーカー NG2 と ASMA の発現を、蛍光免疫染色にて検討した。NG2 と ASMA に対する免疫染色を行い、核は Hoechst 33342 を用いて染色した。ランダム 3 視野内にある NG2、ASMA 陽性細胞数をカウントし、GFP 陽性細胞に占める比率を計測した。表示するデータは triplicate dish からであり、定量結果を mean ± SD で示す。(* : p < 0.05 vs TGF-β 1 0 ng/ml. Turkey's multiple comparison test)

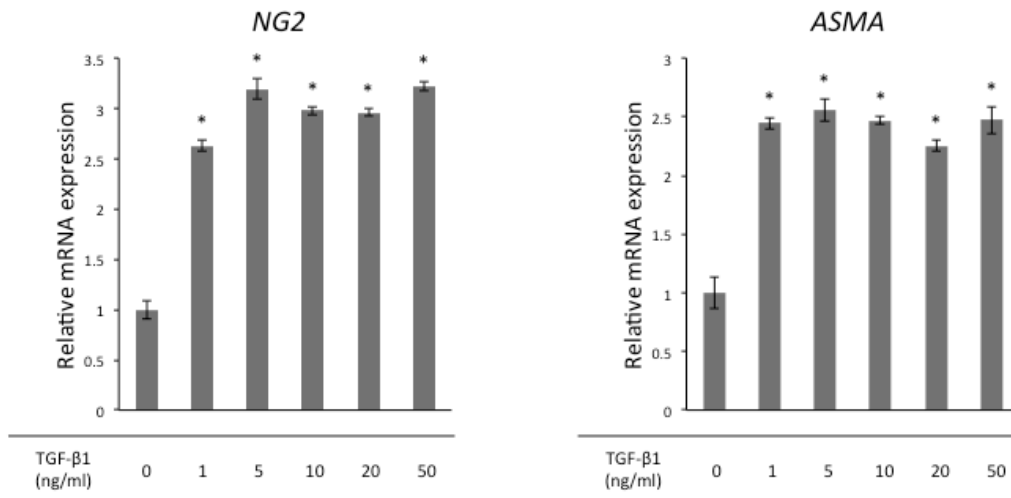


図 10. TGF-β 1 添加による DFAT からのペリサイトマーカ遺伝子の発現解析

GFP 標識 DFAT に各種濃度の TGF-β 1 を添加し 72 時間培養した後、total RNA を抽出し、ペリサイトマーカ NG2、ASMA の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。GAPDH 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、GAPDH に対する相対的定量解析 (Comparative CT 法) を行った。表示するデータは、triplicate dish からであり、定量結果を mean ± SD で示す。(*: p<0.05 vs TGF-β 1 0 ng/ml. Turkey's multiple comparison test)

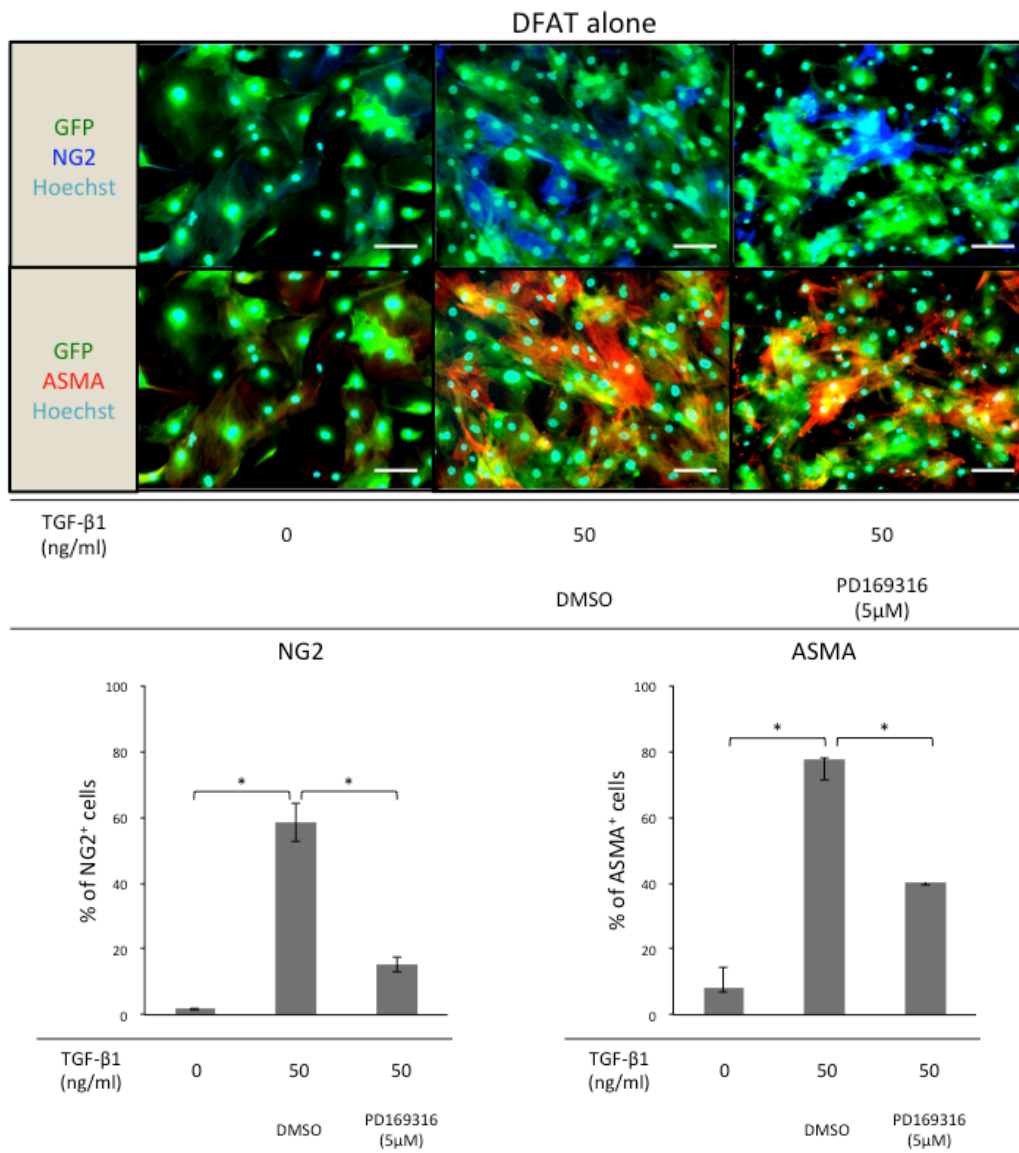


図 11. DFAT からのペリサイトマーカ発現に対する Smad2/3 阻害薬の影響 (蛍光免疫染色)

GFP 標識 DFAT を Smad2/3 阻害薬である PD169316 (5 μ M) またはコントロールとして DMSO 存在下に TGF- β 1 (50 ng/ml) で刺激し、96 時間後にペリサイトマーカ NG2 と ASMA の発現を蛍光免疫染色にて検討した。核は Hoechst 33342 を用いて染色した。上図：代表的な免疫染色像。Scale bar: 100 μ m。下図：ランダム 3 視野内にある NG2、ASMA 陽性細胞数をカウントし、GFP 陽性細胞に占める比率を計測した。表示するデータは triplicate dish からであり、定量結果を mean \pm SD で示す。(*: $p < 0.05$ One-way ANOVA, Turkey's multiple comparison test)

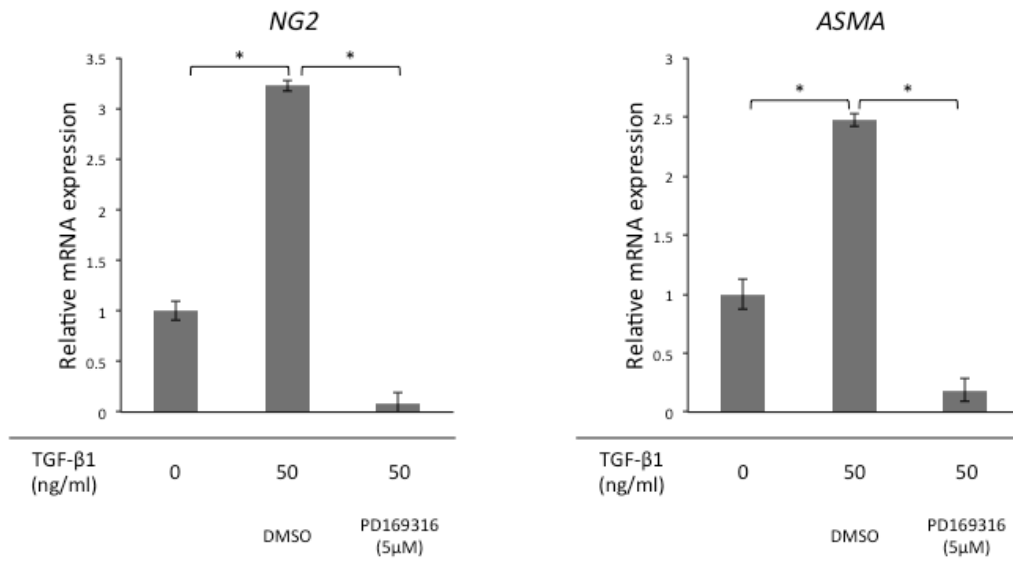


図 12. DFAT からのペリサイトマーカ発現に対する Smad2/3 阻害薬の影響
(リアルタイム RT-PCR)

GFP 標識 DFAT を Smad2/3 阻害薬である PD169316 (5 μ M) またはコントロールとして DMSO 存在下に TGF- β 1 (50 ng/ml) で刺激し、72 時間後にペリサイトマーカ NG2 と ASMA の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。GAPDH 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、GAPDH に対する相対的定量解析 (Comparative CT 法) を行った表示するデータは triplicate dish からであり、定量結果を mean \pm SD で示す。
(* : p<0.05 One-way ANOVA, Turkey's multiple comparison)

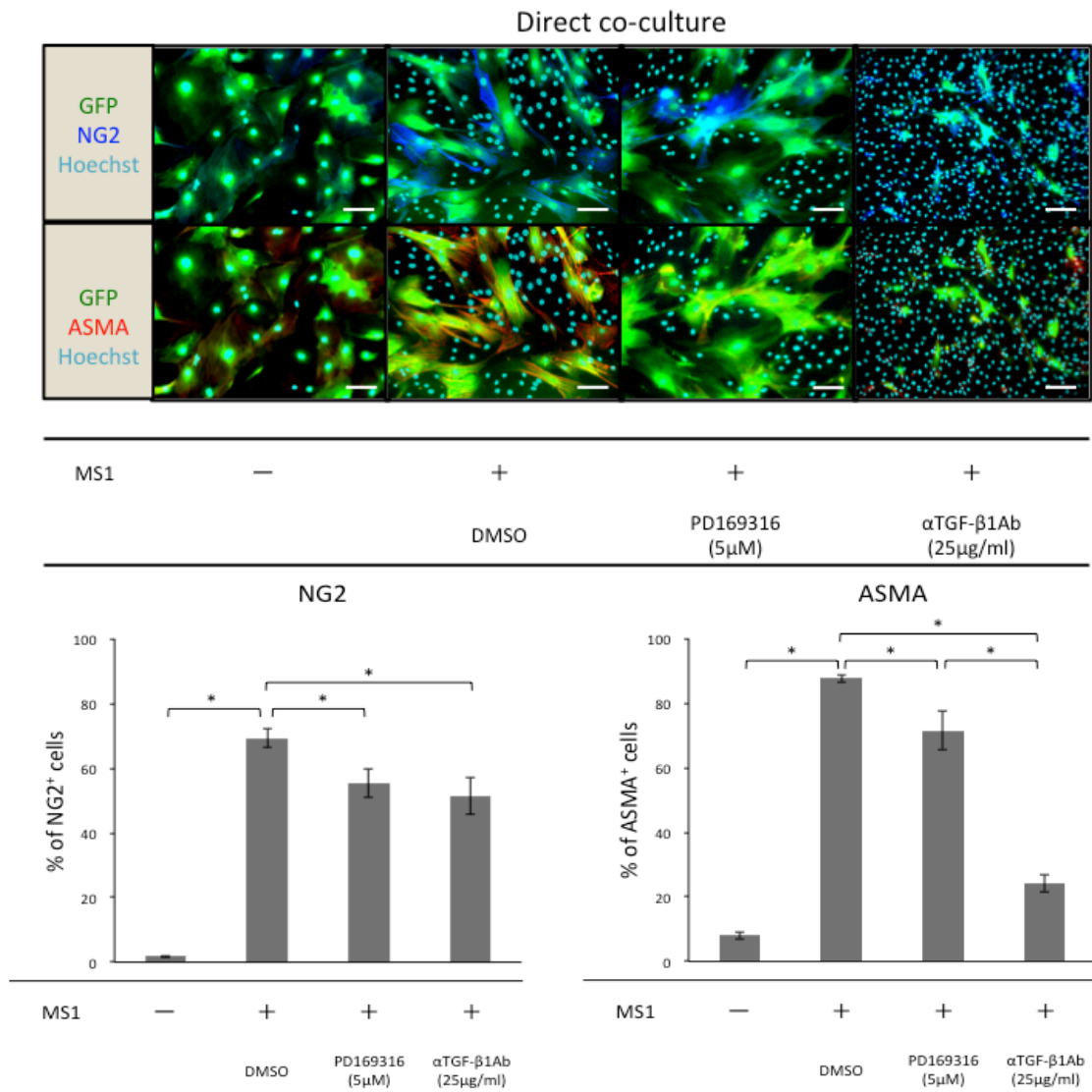


図 13. 血管内皮細胞 (MS1) との直接的共培養における DFAT からのペリサイトマーカー発現に対する TGF- β シグナル阻害の影響

Smad2/3 阻害薬である PD169316 (5 μ M)、TGF- β 1 中和抗体 1D11.16.8 (25 μ g/ml) またはコントロールとして DMSO 存在下に GFP-DFAT と MS1 との直接的共培養を 96 時間行い、ペリサイトマーカー NG2 と ASMA の発現を蛍光免疫染色にて検討した。核は Hoechst 33342 を用いて染色した。上図：代表的な免疫染色像。Scale bar: 100 μ m。下図：ランダム 3 視野内にある NG2、ASMA 陽性細胞数をカウントし、GFP 陽性細胞に占める比率を計測した。表示するデータは triplicate dish からであり、定量結果を mean \pm SD で示す。(*: $p < 0.05$ One-way ANOVA, Turkey's multiple comparison test)

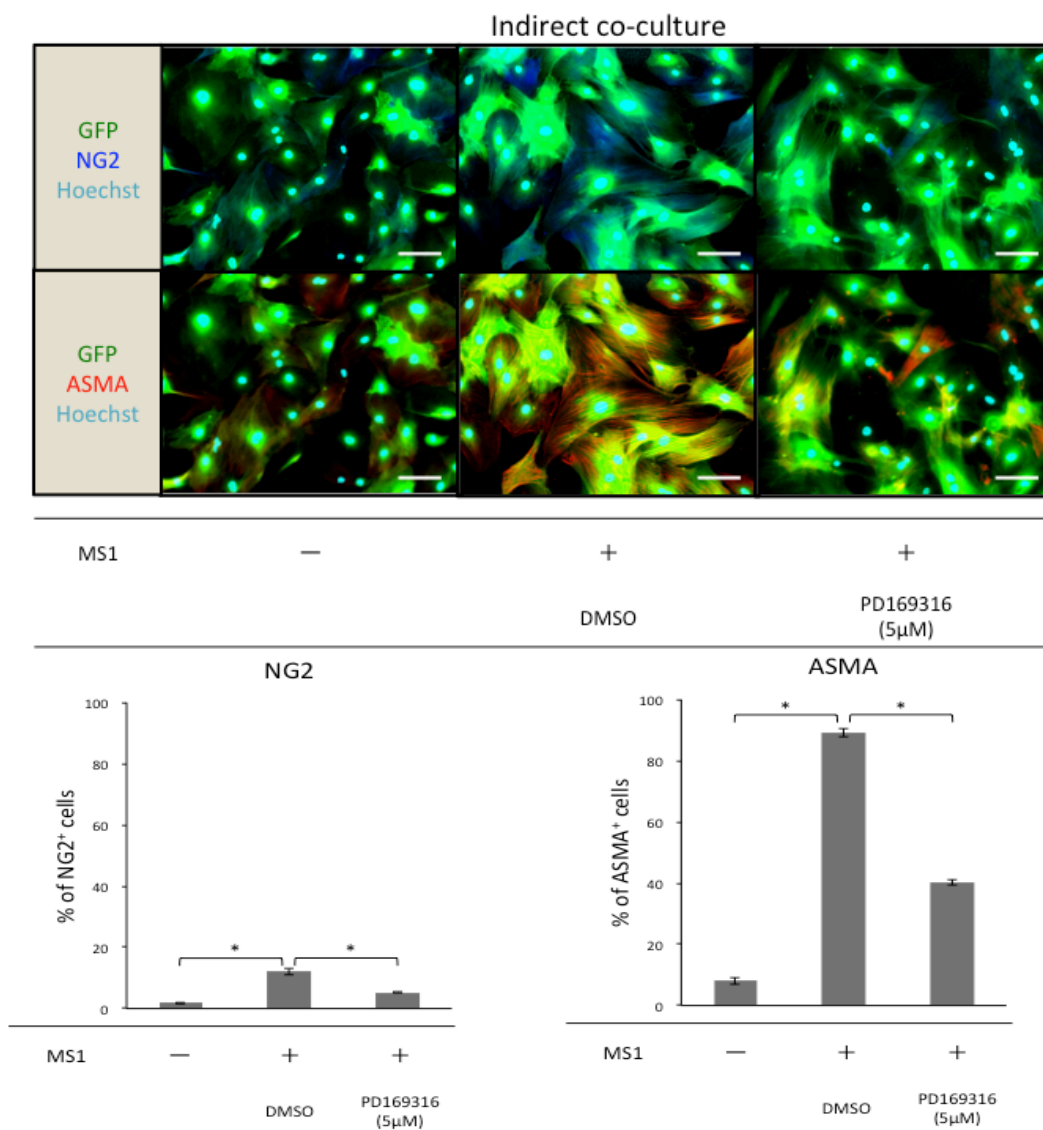


図 14.血管内皮細胞 (MS1) との間接的共培養における DFAT からのペリサイトマーカー発現に対する TGF- β シグナル阻害の影響

Smad2/3 阻害薬である PD169316 (5 μ M) またはコントロールとして DMSO 存在下に GFP-DFAT と MS1 との間接的共培養を 96 時間行い、ペリサイトマーカー NG2 と ASMA の発現を蛍光免疫染色にて検討した。核は Hoechst 33342 を用いて染色した。上図：代表的な免疫染色像。Scale bar: 100 μ m。下図：ランダム 3 視野内にある NG2、ASMA 陽性細胞数をカウントし、GFP 陽性細胞に占める比率を計測した。表示するデータは triplicate dish からであり、定量結果を mean \pm SD で示す。(* : p<0.05 One-way ANOVA, Turkey's multiple comparison test)

ケ) 引用文献

1. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008;215(1):210-222. doi:10.1002/jcp.21304.
2. Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321(4):967-974. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.055.
3. Oki Y, Watanabe S, Endo T, Kano K. Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells Can Trans-Differentiate into Osteoblasts In Vitro and In Vivo only by All-Trans Retinoic Acid. *Cell Struct Funct.* 2008;33(2):211-222. doi:10.1247/csf.08038.
4. Kazama T, Fujie M, Endo T, Kano K. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can transdifferentiate into skeletal myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;377(3):780-785. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.046.
5. Sakuma T, Matsumoto T, Kano K, et al. Mature, adipocyte derived, dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. *J Urol.* 2009;182(1):355-365. doi:10.1016/j.juro.2009.02.103.
6. Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama S-I, et al. Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(5):565-575. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.004.
7. Ohta Y, Takenaga M, Tokura Y, et al. Mature adipocyte-derived cells, dedifferentiated fat cells (DFAT), promoted functional recovery from spinal cord injury-induced motor dysfunction in rats. *Cell Transplant.* 2008;17(8):877-886.

8. Nur R, Fukuda N, Matsumoto T, et al. Implantation of dedifferentiated fat cells ameliorates habu snake venom-induced chronic renal dysfunction in tenascin-C-deficient mice. *Nephron Exp Nephrol.* 2008;110(3):e91-e98. doi:10.1159/000166995.
9. Obinata D, Matsumoto T, Ikado Y, et al. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model. *Int J Urol.* 2011;18(12):827-834. doi:10.1111/j.1442-2042.2011.02865.x.
10. Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Eng Part A.* 2013;19(15-16):1792-1802. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0380.
11. Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting. *J Plast Surg Hand Surg.* 2015;49(1):25-31. doi:10.3109/2000656X.2014.920712.
12. Matsumine H, Takeuchi Y, Sasaki R, et al. Adipocyte-derived and dedifferentiated fat cells promoting facial nerve regeneration in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 2014;134(4):686-697. doi:10.1097/PRS.0000000000000537.
13. Kashimura T, Soejima K, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. The Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on a Dorsal Skin Flap Model. *J Invest Surg.* 2016;29(1):6-12. doi:10.3109/08941939.2015.1035820.
14. Eberth CJ. *Handbuch Der Lehre Von Den Geweben Des Menschen Und Der Thiere.* Leipzig: W. Engelmann; 1871.

15. Xie C, Ritchie RP, Huang H, Zhang J, Chen YE. Smooth muscle cell differentiation in vitro: models and underlying molecular mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(7):1485-1494.
doi:10.1161/ATVBAHA.110.221101.
16. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 2005;97(6):512-523.
doi:10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7.
17. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(5):630-638.
doi:10.1161/ATVBAHA.107.161521.
18. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell.* 2011;21(2):193-215.
doi:10.1016/j.devcel.2011.07.001.
19. Quaegebeur A, Lange C, Carmeliet P. The Neurovascular Link in Health and Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Neuron.* 2011;71(3):406-424.
doi:10.1016/j.neuron.2011.07.013.
20. Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 1994;8(16):1875-1887.
doi:10.1101/gad.8.16.1875.
21. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 1994;8(16):1888-1896.
22. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, et al. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek,

- reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev.* 1994;8(16):1897-1909.
23. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis. *Cell.* 1996;87(7):1171-1180. doi:10.1016/S0092-8674(00)81813-9.
 24. Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J.* 1993;7(11):1031-1038. doi:10.1096/fj.1530-6860.
 25. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005;57(2):173-185. doi:10.1124/pr.57.2.4.
 26. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* 2005;7(4):452-464. doi:10.1215/S1152851705000232.
 27. Ozerdem U, Grako KA, Dahlin Huppe K, Monosov E, Stallcup WB. NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Developmental Dynamics.* 2001;222(2):218-227. doi:10.1002/dvdy.1200.
 28. Berger M, Bergers G, Arnold B, Hämmerling GJ, Ganss R. Regulator of G-protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood.* 2005;105(3):1094-1101. doi:10.1182/blood-2004-06-2315.
 29. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling. *Molecular Neurodegeneration* 2010 5:1. 2010;5(1):32. doi:10.1186/1750-1326-5-32.
 30. Pouget C, Gautier R, Teillet M-A, Jaffredo T. Somite-derived cells replace ventral aortic hemangioblasts and provide aortic smooth

- muscle cells of the trunk. *Development*. 2006;133(6):1013-1022.
doi:10.1242/dev.02269.
31. Sato Y, Watanabe T, Saito D, et al. Notch mediates the segmental specification of angioblasts in somites and their directed migration toward the dorsal aorta in avian embryos. *Developmental Cell*. 2008;14(6):890-901. doi:10.1016/j.devcel.2008.03.024.
 32. 渡邊拓史, 松本太郎, 萩倉一博, 風間智彦, 高橋昌里. 脱分化脂肪細胞 (DFAT) における血管新生効果の検討. *Journal of Nihon University Medical Association*. 2015;74(5):238-245. doi:10.4264/numa.74.5_238.
 33. Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, et al. The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. *Developmental Cell*. 2012;23(3):587-599. doi:10.1016/j.devcel.2012.08.005.
 34. Sporn MB, Roberts AB. The transforming growth factor-betas: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;593:1-6.
 35. Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, Dijke ten P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*. 2002;21(7):1743-1753. doi:10.1093/emboj/21.7.1743.
 36. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011;147(2):275-292. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024.
 37. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.
 38. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1417-1419. doi:10.1172/JCI39675.

39. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*. 2001;2001(112):re21-re21. doi:10.1126/stke.2001.112.re21.
40. Liu H, Zhang W, Kennard S, Caldwell RB, Lilly B. Notch3 is critical for proper angiogenesis and mural cell investment. *Circ Res*. 2010;107(7):860-870. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.218271.
41. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(3):165-177. doi:10.1038/nrm2639.
42. Geevarghese A, Herman IM. Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies. *Transl Res*. 2014;163(4):296-306. doi:10.1016/j.trsl.2014.01.011.
43. Hsiao AY, Okitsu T, Onoe H, et al. Smooth muscle-like tissue constructs with circumferentially oriented cells formed by the cell fiber technology. Han A, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0119010. doi:10.1371/journal.pone.0119010.
44. Sato Y, Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol*. 1989;109(1):309-315.
45. Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB. Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol*. 1990;111(2):757-763.
46. Kojima S, Harpel PC, Rifkin DB. Lipoprotein (a) inhibits the generation of transforming growth factor beta: an endogenous inhibitor of smooth muscle cell migration. *J Cell Biol*. 1991;113(6):1439-1445.

47. Kojima S, Rifkin DB. Mechanism of retinoid-induced activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1993;155(2):323-332. doi:10.1002/jcp.1041550213.
48. Flaumenhaft R, Abe M, Mignatti P, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. *J Cell Biol.* 1992;118(4):901-909.
49. Grainger DJ, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Wade DP, Lawn RM. Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein(a). *Science.* 1993;260(5114):1655-1658.
50. Yee JA, Yan L, Dominguez JC, Allan EH, Martin TJ. Plasminogen-dependent activation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) by growing cultures of osteoblast-like cells. *J Cell Physiol.* 1993;157(3):528-534. doi:10.1002/jcp.1041570312.
51. Flaumenhaft R, Kojima S, Abe M, Rifkin DB. Activation of latent transforming growth factor beta. *Adv Pharmacol.* 1993;24:51-76.
52. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol.* 2015;47:54-65. doi:10.1016/j.matbio.2015.05.006.

研究業績

後藤 俊平

I	発表	①一般発表	55			
		②特別発表	なし			
II	論文	①原著論文	4	(共	4)	
		②症例報告	4	(単	2/共	2)
III	著書		1			

以上

I 発表

① 一般発表

1. 後藤俊平、飯野正敏、木村正幸、福長 徹、菅本祐司、宮本健志、久保嶋麻里、大橋研介、今西俊介：両側に発症した糖尿病性乳腺症の1例、静岡県外科医会、静岡、2008年3月
2. 古賀寛之、鈴木健司、西村欣也、稲田英一、後藤俊平、岡崎任晴、山高篤行：肺分画症に対し胸腔鏡下左下葉切除術し得た一例、第20回小児QOL研究会、新潟、2009年10月
3. 後藤俊平、古賀寛之、山高篤行、岡崎任晴：胃粘膜下腫瘍で発見された異所性膵の1例、第44回日本小児外科学会関東甲信越地方会、群馬、2009年10月
4. 古賀寛之、鈴木健司、西村欣也、宮野 剛、後藤俊平、稲田英一、岡崎任晴、山高篤行：肺分画症に対し胸腔鏡下左下葉切除を施行した1例、第29回日本小児内視鏡外科・手術手技研究会、鹿児島、2009年10月
5. 古賀寛之、鈴木健司、西村欣也、稲田英一、後藤俊平、岡崎任晴、山高篤行：小児内視鏡外科における機能温存と低侵襲の追求 肺分画症に対し胸腔鏡下左下葉切除術し得た一例、第29回日本小児内視鏡外科・手術手技研究会、鹿児島、2009年10月
6. 古賀寛之、鈴木健司、西村欣也、稲田英一、後藤俊平、岡崎任晴、山高篤行：小児内視鏡外科における機能温存と低侵襲の追求 肺分画症に対し胸腔鏡下左下葉切除し得た一例、第22回日本内視鏡外科学会総会、東京、2009年12月
7. Goto Shumpei, Okazaki Tadaharu, Koga Hiroyuki, Lane Geoffrey J, Yamataka Atsuyuki: Ectopic pancreas presenting as a submucosal gastric tumor: A case report and literature review. 第47回日本小児外科学会学術集会、愛知、2010年6月
8. 後藤俊平、加藤善史、古賀寛之、山高篤行：開腹操作を要する直腸肛門奇形に対するscope-assistによるGeorgeson法、第30回日本小児内視鏡外科・手術手技研究会、神奈川、2010年10月

9. 後藤俊平、加藤善史、古賀寛之、山高篤行：開腹操作を要する直腸肛門奇形に対するScope-assistによるGeorgeson法、第23回日本内視鏡外科学会総会、神奈川、2010年10月
10. 中村弘樹、古賀寛之、後藤俊平、山高篤行、岡崎任晴：先天性短食道（serpentine-like syndrome）の1例、第45回日本小児外科学会関東甲信越地方会、2010年10月
11. 花岡俊晴、後藤俊平、武藤頼彦、成島一夫、菅本祐司、福長 徹、木村正幸、飯野正敏：左乳腺腫瘍を契機に診断された多発性骨髄腫（plasmacytoma）の1例、第73回日本臨床外科学会総会、東京、2011年11月
12. 福長 徹、飯野正敏、木村正幸、菅本祐司、成島一夫、武藤頼彦、花岡俊晴、細田利史、後藤俊平、松原久裕：外科病棟のクリニカルパス適応率向上を目指した「ステップ式」オールインワンパスの作成と導入、第73回日本臨床外科学会総会、東京、2011年11月
13. 後藤俊平、飯野正敏、木村正幸、福長 徹、菅本祐司、成島一夫、武藤頼彦、花岡俊晴、細田利史：Interval appendectomy時に発見された虫垂癌の一例、静岡県外科医会第221回集会、静岡、2012年3月
14. 細田利史、飯野正敏、木村正幸、福長 徹、菅本祐司、成島一夫、武藤頼彦、花岡俊晴、後藤俊平：当院における外鼠径ヘルニア女児例に対する腹腔鏡下経皮的腹膜外ヘルニア閉鎖術（LPEC）の現状、静岡県外科医会第221回集会、静岡、2012年3月
15. 武藤頼彦、飯野正敏、木村正幸、福長 徹、菅本祐司、成島一夫、花岡俊晴、後藤俊平：音声付きビデオとオリジナル解説集に基づく内視鏡手術教育について、静岡県外科医会第221回集会、静岡、2012年3月
16. 花岡俊晴、武藤頼彦、成島一夫、菅本祐司、福長 徹、木村正幸、飯野正敏、後藤俊平、細田利史、松原久裕：胃癌術後13年を経過して縫合し膿瘍による吻合部瘻孔を形成した一例、第48回日本腹部救急医学会総会、石川、2012年3月
17. 武藤頼彦、飯野正敏、木村正幸、福長 徹、菅本祐司、成島一夫、細田利史、後藤俊平、花岡俊晴、松原久裕：当院における大腸癌イレウスの治療方針、第48回日本腹部救急医学会総会、石川、2012年3月

18. 福長 徹、飯野正敏、木村正幸、菅本祐司、成島一夫、武藤頼彦、花岡俊晴、細田利史、後藤俊平、松原久裕：当科における大腸穿孔に対する緊急手術の治療方針、第48回日本腹部救急医学会総会、石川、2012年3月
19. 細田利史、飯野正敏、木村正幸、福長 徹、菅本祐司、成島一夫、武藤頼彦、花岡俊晴、後藤俊平、古屋武史、越永従道：当科における吊り上げ鉤を用いた単孔式腹腔鏡下虫垂切除術とその位置付け、第49回日本小児外科学会学術集会、神奈川、2012年5月
20. 武藤頼彦、飯野正敏、木村正幸、福長 徹、菅本祐司、成島一夫、花岡俊晴、後藤俊平、松原久裕：当院で経験した食道ステント留置症例11例の検討、第66回日本食道学会学術集会、長野、2012年6月
21. 福長 徹、飯野正敏、木村正幸、菅本祐司、成島一夫、武藤頼彦、花岡俊晴、細田利史、後藤俊平、松原久裕：高齢者食道癌の手術戦略 -多彩な術式からbest choiceを目指して-、第66回日本食道学会学術集会、長野、2012年6月
22. 成島一夫、菅本祐司、後藤俊平、花岡俊晴、武藤頼彦、細田利史、福長 徹、木村正幸、飯野正敏、松原久裕：V-Loc 180 クロージャーデバイスを用いた腹腔鏡下直腸手術でのSST吻合、第67回日本消化器外科学会総会、富山、2012年7月
23. 花岡俊晴、武藤頼彦、成島一夫、菅本祐司、福長 徹、木村正幸、飯野正敏、後藤俊平、細田利史、松原久裕：教育用動画ファイルを自作して学ぶ腹腔鏡下虫垂切除術、第67回日本消化器外科学会総会、富山、2012年7月
24. 武藤頼彦、飯野正敏、木村正幸、福長 徹、菅本祐司、成島一夫、花岡俊晴、後藤俊平、松原久裕：当院における85歳以上の超高齢者、悪性疾患手術の現状、第67回日本消化器外科学会総会、富山、2012年7月
25. 福長 徹、飯野正敏、木村正幸、菅本祐司、成島一夫、武藤頼彦、花岡俊晴、細田利史、後藤俊平、松原久裕：当院における食道がんの手術戦略 -食道外科専門医のハードルは高いが-、第67回日本消化器外科学会総会、富山、2012年7月
26. 菅本祐司、飯野正敏、木村正幸、福長 徹、成島一夫、武藤頼彦、花岡俊晴、細田利史、後藤俊平、松原久裕：当院における内視鏡下肝切除術の現状と手術手技、第67回日本消化器外科学会総会、富山、2012年7月

27. 井上幹也、石塚悦昭、平野隆幸、蘇我晶子、後藤俊平、川島弘之、細田利史、大橋研介、杉藤公信、池田太郎、越永従道：小児鼠径ヘルニア嵌頓症例の検討、第48回日本周産期・新生児医学会学術集会、埼玉、2012年7月
28. 平野隆幸、大橋研介、鈴木有佳里、石塚悦昭、蘇我晶子、後藤俊平、石岡茂樹、川島弘之、金田英秀、井上幹也、杉藤公信、池田太郎、越永従道：先天性側彎を合併したH型気管食道瘻の1例、第47回日本小児外科学会関東甲信越地方会、新潟、2012年10月
29. 大橋研介、池田太郎、平野隆幸、石塚悦昭、蘇我晶子、後藤俊平、石岡茂樹、川島弘之、金田英秀、井上幹也、杉藤公信、越永従道：食道盲端に異所性胃粘膜を認めた先天性食道閉鎖症の1例、第47回日本小児外科学会関東甲信越地方会、新潟、2012年10月
30. 杉藤公信、吉澤信輔、植草省太、川島弘之、後藤俊平、金田英秀、古屋武史、細田利史、益子貴行、大橋研介、井上幹也、池田太郎、越永従道：進行神経芽腫の集学的治療における小児外科医の役割、第113回日本外科学会定期学術集会、福岡、2013年4月
31. 杉藤公信、星野真由美、後藤俊平、金田英秀、古屋武史、細田利史、大橋研介、井上幹也、池田太郎、越永従道：片側小児鼠径ヘルニアにおける対側発症の予測、第50回日本小児外科学会学術集会、東京、2013年5月
32. 石塚悦昭、池田太郎、大橋研介、平野隆幸、蘇我晶子、後藤俊平、川島弘之、細田利史、井上幹也、杉藤公信、越永従道：胎児期に腹腔内嚢胞性腫瘤を指摘された腸管重複症の一例、第50回日本小児外科学会学術集会、東京、2013年5月
33. 後藤俊平、杉藤公信、細田利史、大橋研介、井上幹也、池田太郎、越永従道：重症染色体異常児に対する外科医の役割、第50回日本小児外科学会学術集会、東京、2013年5月
34. 川島弘之、池田太郎、井上幹也、石塚悦昭、平野隆幸、蘇我晶子、後藤俊平、石岡茂樹、金田英秀、大橋研介、杉藤公信、越永従道：腹腔鏡補助下腸管翻転法により経肛門的切除し得た大腸ポリープの一例、第50回日本小児外科学会学術集会、東京、2013年5月
35. 平野隆幸、川島弘之、池田太郎、石塚悦昭、蘇我晶子、後藤俊平、細田利史、大橋研介、井上幹也、杉藤公信、越永従道、矢ヶ崎 博、加藤麻衣子、

- 麦島秀雄：外科切除を行った小児ムコール症の2例、第50回日本小児外科学会学術集会、東京、2013年5月
36. 細田利史、石塚悦昭、平野隆幸、蘇我晶子、後藤俊平、川島弘之、大橋研介、井上幹也、杉藤公信、池田太郎、越永従道：当院における低出生体重児に対する外科治療成績、第50回日本小児外科学会学術集会、東京、2013年5月
37. 小野賀功、大橋研介、後藤俊平、花田 学、細田利史、杉藤公信、池田太郎、越永従道：胆道穿孔で発症した胆道閉鎖症の1例、第36回日本膵・胆管合流異常研究会、兵庫、2013年9月
38. 小野賀功、大橋研介、後藤俊平、花田 学、細田利史、杉藤公信、池田太郎、越永従道：腸間膜裂孔に小腸が嵌入・捻転した絞扼性腸閉塞の1例、第48回日本小児外科学会関東甲信越地方会、茨城、2013年10月
39. 川島弘之、杉藤公信、後藤俊平、細田利史、古屋武史、大橋研介、池田太郎、越永従道：S状結腸原発カポジ肉腫様血管内皮種の一例、第55回日本小児血液・がん学会学術集会、福岡、2013年11月
40. 杉藤公信、後藤俊平、花田 学、細田利史、金田英秀、古屋武史、大橋研介、池田太郎、越永従道：小児solid pseudopapillary tumor of the pancreasの手術成績、第55回日本小児血液・がん学会学術集会、福岡、2013年11月
41. 平野隆幸、杉藤公信、石塚悦昭、蘇我晶子、後藤俊平、川島弘之、細田利史、大橋研介、井上幹也、池田太郎、越永従道：外科切除を行った肺ムコール症の1例、第55回日本小児血液・がん学会学術集会、福岡、2013年11月
42. 大橋研介、越永従道、池田太郎、杉藤公信、細田利史、後藤俊平、小野賀功：栄養療法が奏功したボタン電池誤飲による気管食道瘻の1例、第29回日本静脈栄養学会学術集会、神奈川、2014年2月
43. 後藤俊平、池田太郎、前岡瑛里、小野賀功、花田 学、古屋武史、細田利史、杉藤公信、越永従道：卵管留水腫を伴う卵管捻転に対し、卵巣固定を行った一例、第51回日本小児外科学会学術集会、大阪、2014年5月
44. 細田利史、越永従道、池田太郎、杉藤公信、大橋研介、花田 学、後藤俊平、蘇我晶子、小野賀功：臍ヘルニアに対して、より深い臍窩を形成するために腹直筋後鞘のみを閉鎖する術式、第51回日本小児外科学会学術集会、大阪、2014年5月

45. 大橋研介、小野賀功、後藤俊平、花田 学、細田利史、古屋武史、池田太郎、越永従道：新生児臍部ストーマ造設法の” tips and tricks”、第51回日本小児外科学会学術集会、大阪、 2014年5月
46. 杉藤公信、古屋武史、後藤俊平、花田 学、川島弘之、金田英秀、益子貴行、大橋研介、池田太郎、越永従道、井上幹也、細田利史、石岡茂樹、浅井 陽、星野真由美、後藤博志：限局性腹腔内膿瘍を伴う虫垂炎に対する interval appendectomyへの取り組み、第51回日本小児外科学会学術集会、大阪、 2014年5月
47. 小野賀功、大橋研介、後藤俊平、花田 学、細田利史、杉藤公信、池田太郎、越永従道：胎児期に発症した小腸捻転症の2例、第51回日本小児外科学会学術集会、大阪、 2014年5月
48. 前岡瑛里、古屋武史、花田 学、池田太郎、小野賀功、後藤俊平、細田利史、大橋研介、杉藤公信、越永従道：鈍的腎外傷後仮性動脈瘤を認め、塞栓術後に腎摘した小児の1例、第50回日本小児放射線学会学術集会、兵庫、2014年6月
49. 前岡瑛里、花田 学、古屋武史、池田太郎、小野賀功、後藤俊平、細田利史、大橋研介、杉藤公信、越永従道：鈍的腎外傷後仮性動脈瘤に対し、塞栓術を先行し腎摘出を行った小児の1例、第49回日本小児外科学会関東甲信越地方会、千葉、2014年10月
50. 後藤俊平、杉藤公信、大橋研介、前岡瑛里、石塚悦昭、橋本 真、星 玲奈、渡邊揚介、蘇我晶子、植草省太、花田 学、石岡茂樹、川島弘之、小沼憲祥、益子貴行、古屋武史、越永従道：超低出生体重児における外科的胎便排泄障害関連疾患の予測、第52回日本小児外科学会学術集会、兵庫、2015年5月
51. 橋本 真、小沼憲祥、後藤俊平、石岡茂樹、益子貴行、益子貴行、大橋研介、加野浩一郎、松本太郎、越永従道：脱分化脂肪細胞からのiPS細胞 (induced pluripotent cell: iPS cell) の樹立、第52回日本小児外科学会学術集会、兵庫、2015年5月
52. 石塚悦昭、杉藤公信、小野賀功、平野隆幸、蘇我晶子、後藤俊平、花田 学、石岡茂樹、川島弘之、細田利史、大橋研介、井上幹也、池田太郎、越永従道：卵巣原発胎児型横紋筋肉腫の1例、第52回日本小児外科学会学術集会、兵庫、2015年5月

53. 益子貴行、古屋武史、金田英秀、川島弘之、後藤俊平、大橋研介、杉藤公信、池田太郎、越永従道：当科で経験した小児腎外傷15例の検討、第24回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会、東京、2015年7月
54. 後藤俊平、小沼憲祥、加藤礼保納、土方浩平、日高綾乃、小野賀功、橋本真、星 玲奈、植草省太、浅井 陽、金田英秀、古屋武史、越永従道、加野浩一郎、松本太郎：脱分化脂肪細胞（DFAT）の血管壁細胞への分化、第53回日本小児外科学会学術集会、福岡、2016年5月
55. 後藤俊平、小沼憲祥、小野賀功、橋本 真、渡邊拓史、萩倉一博、越永従道、松本太郎：脱分化脂肪細胞（DFAT）の血管壁細胞分化、第37回日本炎症・再生医学会、2016年6月

② 特別発表

なし

II 論文

①原著論文

1. 福長 徹、飯野正敏、木村正幸、菅本祐司、成島一夫、武藤頼彦、花岡俊晴、細田利史、後藤俊平、松原久裕：【急性虫垂炎の治療方針の変遷と現状】Interval appendectomyを基本方針とする急性虫垂炎の治療、日本腹部救急医学会雑誌、32巻4号 775-779、2012
2. Yamataka Atsuyuki, Goto Shumpei, Kato Yoshifumi, Koga Hiroyuki, Lane Geoffrey J, Okazaki Tadaharu: Fecal and urinary continence after scope-assisted anorectovaginoplasty for female anorectal malformation. *Pediatric Surgery International*. 28 (9) ; 907-12, 2012.
3. Miyano Go, Hayashi Takuo, Arakawa Atsushi, Goto Shumpei, Lane Geoffrey J, Okazaki Tadaharu, Yamataka Atsuyuki: Giant omental lipoblastoma and CD56 expression. *African Journal of Paediatric Surgery*. 10 (1) : 32-4, 2013.

4. Furuya Takeshi, Inoue Mikiya, Sugito Kiminobu, Goto Shumpei, Kawashima Hiroyuki, Kaneda Hide, Masuko Takayuki, Ohashi Kensuke, Ikeda Taro, Koshinaga Tsugumichi: Effectiveness of Interval Appendectomy After Conservative Treatment of Pediatric Ruptured Appendicitis with Abscess. *Indian Journal of Surgery*. 77 (Suppl 3) : 1041-4, 2015.

②症例報告

1. Goto Shumpei, Okazaki Tadaharu, Koga Hiroyuki, Miyano Go, Arakawa Atsushi, Yao Takashi, Lane Geoffrey J, Yamataka Atsuyuki: Ectopic pancreas presenting as a submucosal gastric tumor; case report and literature review. *Pediatric Surgery International*. 27 (1) : 10709, 2011.
2. 細田利史、飯野正敏、木村正幸、福長 徹、菅本祐司、成島一夫、武藤頼彦、花岡俊晴、後藤俊平、金田英秀、池田太郎、越永従道：腹腔鏡補助下に摘出したAbdominoscrotal hydroceleの1例、日大医学雑誌、70巻6号 283-286、2011年
3. 星 玲奈、杉藤公信、渡邊揚介、吉澤信輔、植草省太、川島弘之、後藤俊平、大橋研介、池田太郎、越永従道：肝動脈化学塞栓療法を施行した肝芽種の2例、日本小児外科学会雑誌、50巻2号 257-262、2014年
4. 後藤俊平、池田太郎、前岡瑛里、小野賀功、花田 学、古屋武史、細田利史、杉藤公信、越永従道：【エンジョイ！症例報告：手術・治療の工夫（Ⅱ）】反復する卵管捻転に対する卵巣固定術、小児外科、47巻12号 1310-1313、2015年

Ⅲ 著書

1. 後藤俊平：【治療法が変わってきている身近な疾患】ヒルシュスプルング病・鎖肛、チャイルドヘルス13巻2号、pp104-106、診断と治療社、東京、2010