

脱分化脂肪細胞移植による血管再生細胞治療

— ウサギ下肢虚血モデルを用いた自家細胞移植と他家細胞移植の比較 —

松本太郎¹⁾, 鈴木沙季²⁾³⁾, 田中正史³⁾, 副島一孝⁴⁾, 三木敏生⁵⁾, 大島猛史⁶⁾,
加野浩一郎⁷⁾, 坂井学⁸⁾, 中山智宏⁹⁾, 枝村一弥¹⁰⁾, 片岡則之¹¹⁾, 檜村勉⁴⁾,
李予昕¹⁾, 月村直樹¹²⁾, 秋田大輔¹²⁾, 風間智彦¹⁾Vascular regenerative cell therapy by dedifferentiated fat cells :
Comparison of autologous cell transplantation and allogenic cell
transplantation using a rabbit hind limb ischemia modelTaro MATSUMOTO¹⁾, Saki SUZUKI²⁾³⁾, Masashi TANAKA³⁾, Kazutaka SOEJIMA⁴⁾,
Toshio MIKI⁵⁾, Takeshi OSHIMA⁶⁾, Koichiro KANO⁷⁾, Manabu SAKAI⁸⁾, Tomohiro NAKAYAMA⁹⁾,
Kazuya EDAMURA¹⁰⁾, Noriyuki KATAOKA¹¹⁾, Tsutomu KASHIMURA⁴⁾, Yuxin LI¹⁾,
Naoki TSUKIMURA¹²⁾, Daisuke AKITA¹²⁾, Tomohiko KAZAMA¹⁾

要旨

脱分化脂肪細胞 (DFAT) は成熟脂肪細胞を天井培養することにより調製される間葉系幹細胞 (MSC) に類似した細胞である。DFATはMSCと同様にMHCクラスII分子を発現していないことから、自家移植のみならず、他家移植でもその治療効果が期待できる。本研究では、ウサギ下肢虚血モデルに自家DFATまたは他家DFATを虚血筋肉内に移植し、その生着性や血流改善効果を比較検討した。その結果、自家、他家DFATは共に移植後6週間まで虚血筋肉組織に検出された。自家DFATは他家DFATに比べ、側副血行路二次分枝の数や、平滑筋細胞を伴う成熟度の高い微小血管の数を有意に増加させた。以上より、側副血行路発達作用や、新生血管の成熟化作用は、他家DFATに比べ自家DFATで優れていることが示唆された。

1. はじめに

近年、生活習慣病の増加や高齢化に伴い末梢動脈疾患 (Peripheral artery disease: PAD) の患者数が増加している。PADは重篤化すると重症下肢虚血 (Critical limbs ischemia: CLI) に陥り、下肢切断に至る例も稀ではない。CLI治療の第一選択は血管内治療やバイパス手術などの外科的血管再建術である。しかし、全身状態不良のため手術に耐えられな

い症例や、末梢病変を主因とした治療適応のない症例が多数存在する。このような治療法のないCLI患者に対し、遺伝子治療や細胞治療による血管再生治療は下肢大切断を回避する最終手段と考えられている。Matsumotoら¹⁾は、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を「天井培養」という方法で培養することにより得られる脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) が、高い増殖能と間葉系幹細胞

1) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野
2) 日本大学医学部社会医学系医学教育学分野
3) 日本大学医学部外科学系心臓血管外科学分野
4) 日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野
5) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野
6) 日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学系耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野
7) 日本大学生物資源科学部応用生物科学科
8) 日本大学生物資源科学部獣医内科学研究室
9) 日本大学生物資源科学部獣医放射線学研究室
10) 日本大学生物資源科学部獣医放射線学研究室
11) 日本大学工学部機械工学科
12) 日本大学歯学部歯学科歯科補綴学第II講座
松本太郎: matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

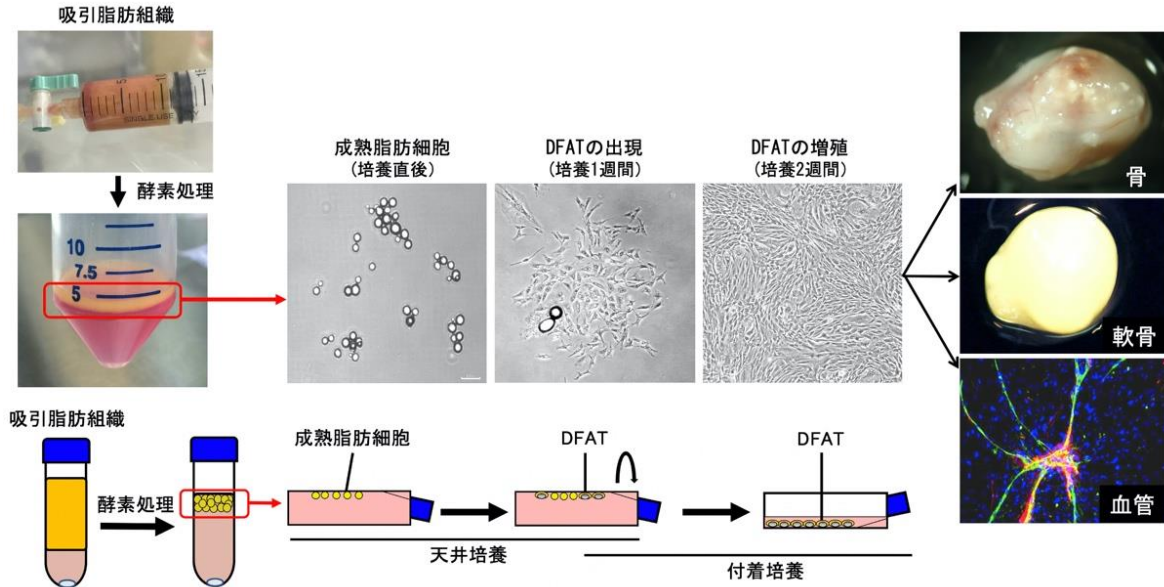


図1 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の調製法

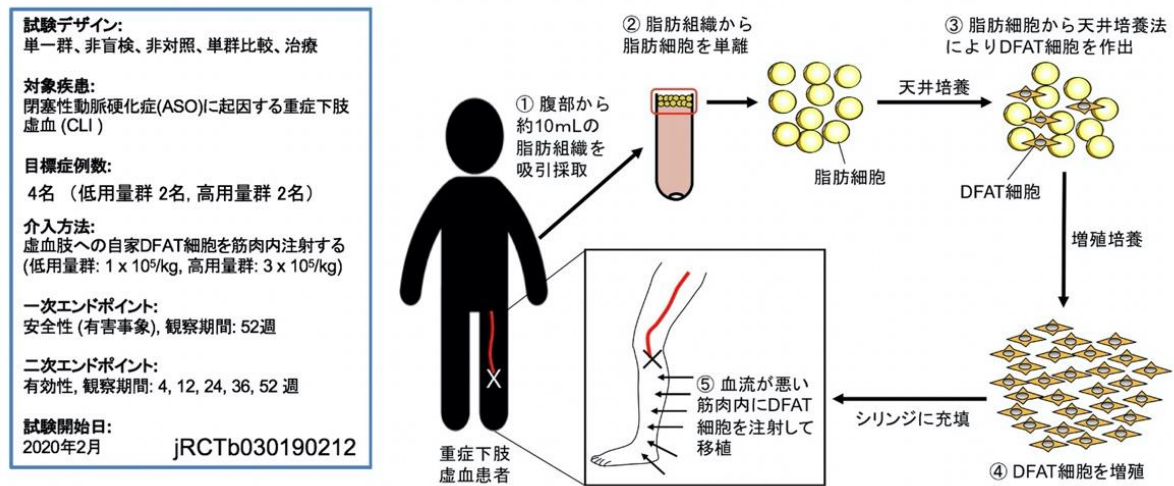


図2 重症下肢虚血 (CLI) に対する自家DFAT移植による血管再生治療

(Mesenchymal stem cell: MSC) に類似した多分化能を有することを明らかにした (図1)。

DFATは、ドナー年齢に影響されず少量の脂肪組織から大量に調製することが可能であり、新たな血管再生治療用細胞として期待されている。現在、日本大学医学部附属板橋病院にてCLIに対する自家DFAT移植による血管再生治療のFirst-in-Human試験を実施している (図2)。DFATはMSCと同様にMHCクラスII分子であるHLA-DRの発現を欠き、免疫原性が低いと考えられることから、自家移植用のみならず、他家移植用細胞としてもその治療効果

が期待できる。一方、虚血筋肉内投与における自家DFATと他家DFATの生着性や血流改善効果の差異はこれまでに明らかになっていない。

本研究では、ウサギ下肢虚血モデルに対して自家DFATと他家DFATを虚血筋肉内に移植し、その生着性や血管への分化能、血流改善効果を比較検討した。

2. 対象及び方法

実験動物は、日本白色家ウサギ（雄性, 2.5 kg）を用いた。実験は日本大学動物実験委員会および日本大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て実施した（承認番号: AP17M032, AP18MED042, 2016医8）。DFATの調製は、ウサギ皮下脂肪組織から既報¹⁾に従い調製した。下肢虚血モデルは、大腿深動脈分岐の約1cm中枢で総大腿動静脈を結紮切離し、末梢側は膝窩動脈、伏在動脈の分岐部より約1cm末梢で静脈も含めて結紮切離することで作製した。

DFATの局在・形質解析実験では、右大腿動静脈を結紮切離したウサギの下肢虚血モデルに対して、レンチウイルスベクターを用いてGFP標識した自

家または他家DFATを腓腹筋内に注射した。移植後2週, 4週, 6週目に腓腹筋を摘出し、抗GFP抗体および血管内皮細胞マーカー Isolectin B4 (IB4) を用いて免疫組織学的検討を行い、GFP陽性細胞の局在および形質解析を行った(図3)。

DFAT移植による血管再生効果の比較実験では、同様に右大腿動静脈を結紮切離したウサギの下肢虚血モデルに対して、虚血作製1週間後に自家DFAT (1×10^6 cells, 自家群, n=6) または他家DFAT (1×10^6 cells, 他家群, n=6) を下肢全体に筋肉内注射した。移植4週間後に患側と健側の経皮的酸素分圧 (TcPO₂) の測定を行い、両群の血流改善効果を比較検討した(図4)。

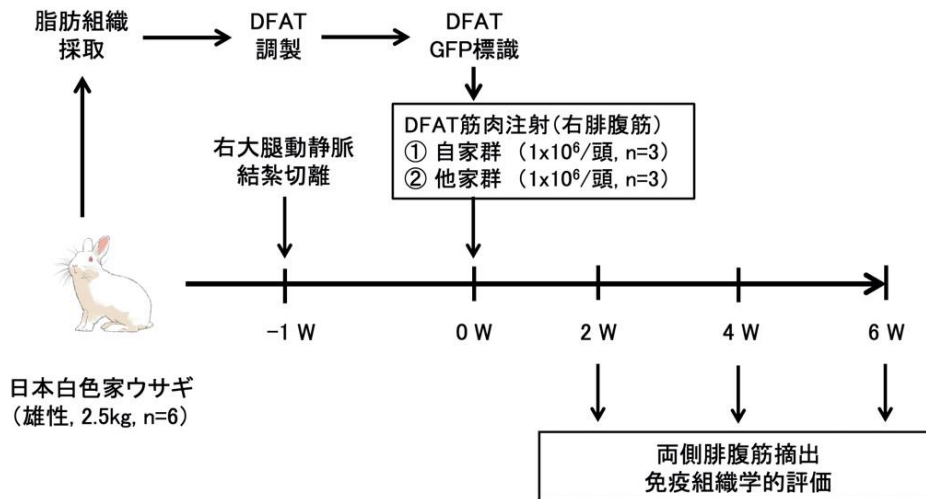


図3 虚血筋組織へ移植したDFATの局在・形質に関する比較実験

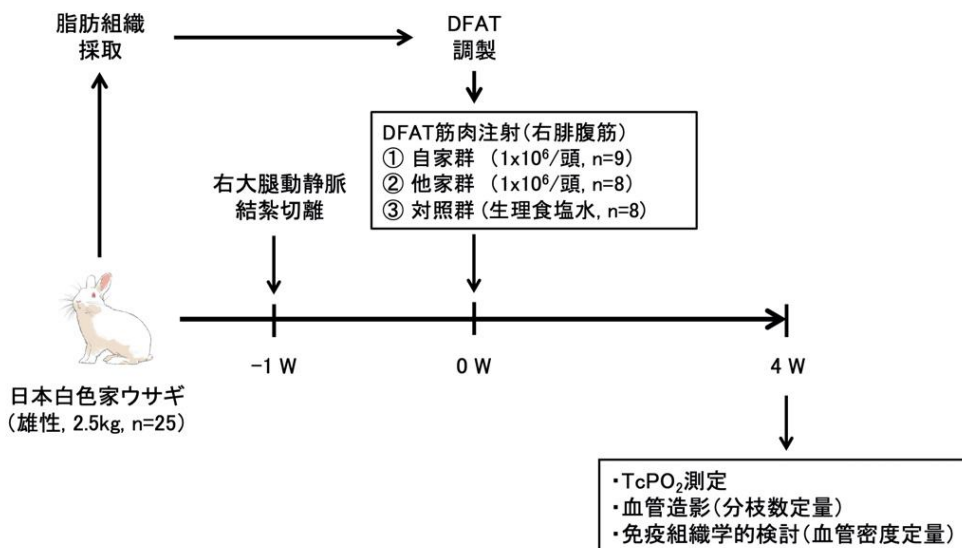


図4 DFAT移植による血管再生効果の比較実験

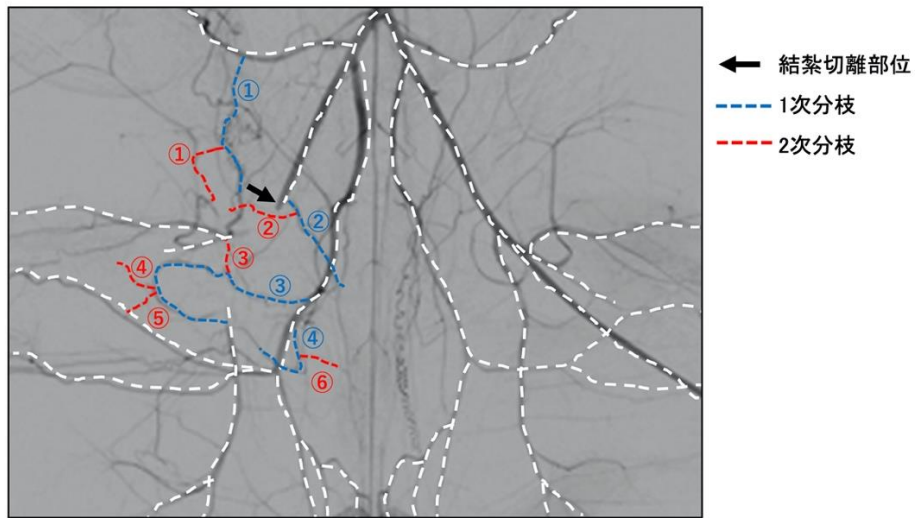


図5 血管造影による側副血行路1次分枝, 2次分枝の定量方法

また下肢血管造影を行い、両群の側副血行路の発達程度を一次分枝数、二次分枝数に分けて定量評価した(図5)。さらに腓腹筋を摘出し組織切片を作成後、血管平滑筋マーカーである抗平滑筋 α アクチン(ASMA)抗体とIB4を用いて免疫組織学的検討を行い、両群のIB4陽性血管数とIB4、ASMA二重陽性血管数を定量評価した。定量結果はmean \pm SDで示した。TcPO₂、側副血行路数、血管密度の2群間比較は、Mann-Whitney's U testを用いて統計学的処理を行い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

3. 結果

GFP標識した自家または他家DFATを腓腹筋内に投与し、2週間ごとに腓腹筋の凍結組織切片を作成し、抗GFP抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、DFATの局在・形質解析を行った。その結果、GFP陽性細胞は筋繊維の間質に分布し、特に虚血が強く筋繊維の萎縮が強い部位に集積する傾向が認められた(図6)。

自家群、他家群ともに移植後4週目までGFP陽性細胞の生着が認められた(図7)。移植後6週目でも微量ながらGFP陽性細胞が検出され、その数は自家群で多い傾向にあった。

GFP陽性細胞の集積が認められた部位では、GFP陽性で血管内皮マーカーIB4陽性を示す細胞の存在が認められた(図8)。

以上の結果より、虚血筋肉組織へのDFAT移植に

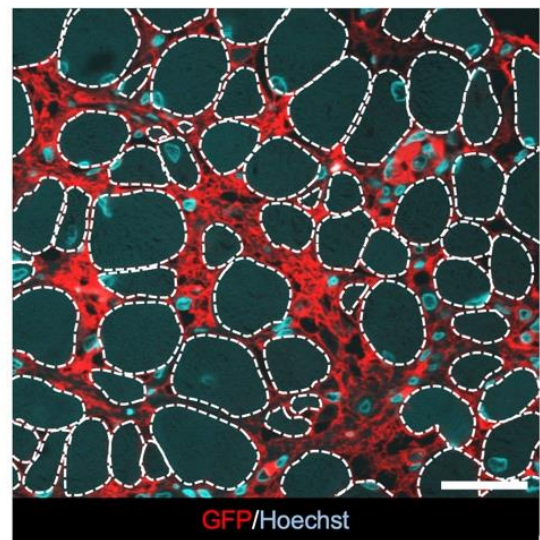


図6 GFP陽性DFATの虚血筋肉組織内の局在(破線は虚血により萎縮した筋繊維を示す, Scale bar: 100 μ m)

より自家、他家移植を問わず4週間以上にわたり細胞の生着が認められ、その一部は血管内皮細胞の形質を獲得していることが示された。

次にウサギ下肢虚血モデルを作製し、自家DFATまたは他家DFAT移植による血管新生効果を比較検討した。移植4週間後のTcPO₂の実測値は、自家群69.5 \pm 23.5 mmHg、他家群48.5 \pm 15.2 mmHg、健側との比では、自家群79.4 \pm 26.2%、他家群76.8 \pm 22.2%といずれも自家群のTcPO₂値の方が高い傾向にあったが、両群間に有意差は認めなかった。血管

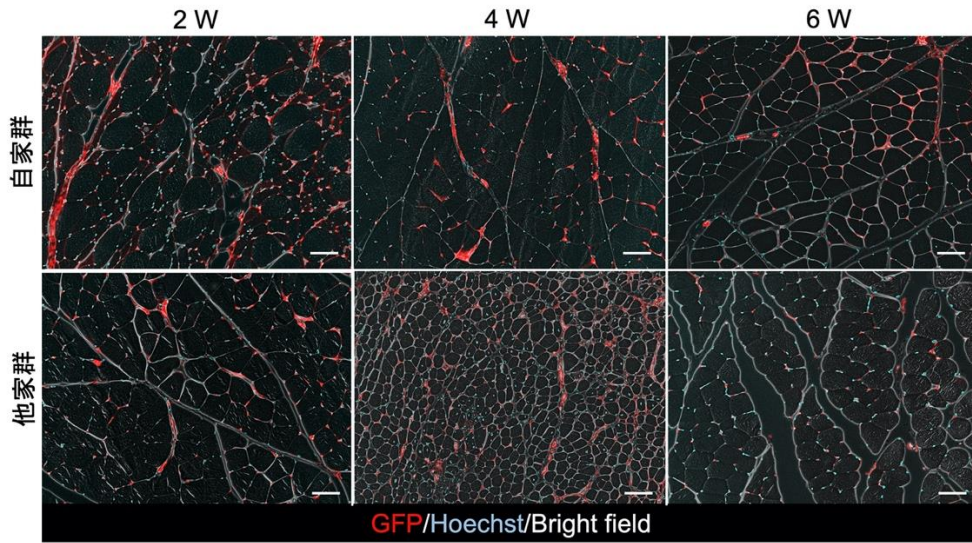


図7 移植したGFP標識DFATの局在変化
(Scale bar: 100 μ m)

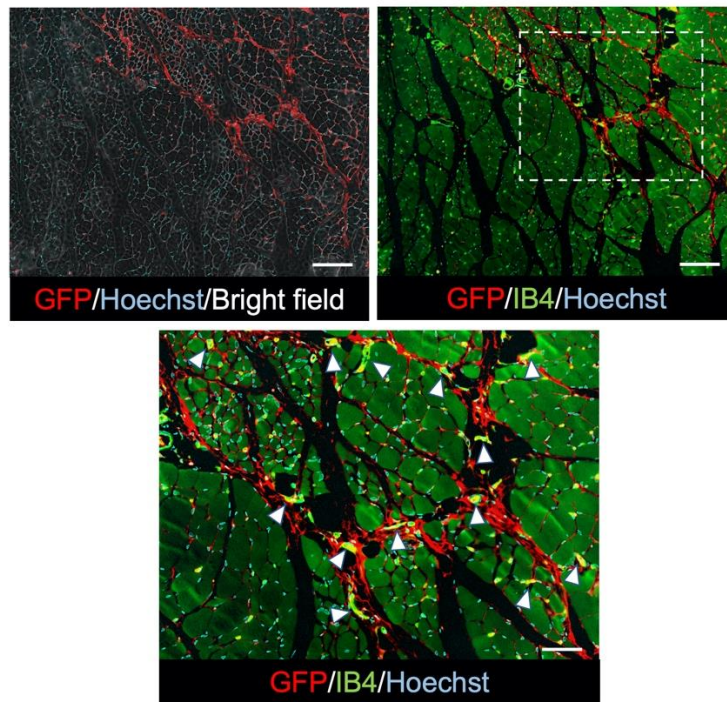


図8 移植したGFP標識DFATの形質変化
(矢頭: GFP⁺IB4⁺細胞, Scale bar: 上段200 μ m, 下段100 μ m)

造影検査による側副血行路発達の評価を行った結果、一次分枝数は自家群で 16.0 ± 2.0 本、他家群で 14.5 ± 1.1 本と両群間に有意差を認めなかったが、二次分枝数は自家群で 17 ± 1.2 本、他家群で 14 ± 0.9 本と自家群の方が有意 ($p < 0.05$) に分枝数の増加を認めた。次に腓腹筋を摘出して切片標本を作成し、両群の血管密度の比較を行った。血管内皮細胞

マーカーIB4陽性血管数を定量した結果、自家群で 212.0 ± 58.6 個、他家群で 197.5 ± 98.5 個であり、両群間に有意差は認められなかった。一方、IB4とASMA二重陽性の血管数を定量した結果、自家群で 33.0 ± 7.5 個、他家群で 22.0 ± 3.0 個であり、自家群で有意 ($p < 0.05$) に血管密度が増加していた。以上の結果より、DFAT自家移植は、他家移植に比べ

側副血行路二次分枝の発達や虚血筋肉組織における平滑筋細胞を伴う微小血管増生に関してより高い効果を示すことが明らかになった。

4. 考 察

DFAT局在・形質解析実験において、移植したDFATは自家細胞、他家細胞ともに6週間までは検出可能であり、その一部は血管内皮細胞の形質を獲得することが示された。MSCは高い免疫寛容能を有し、その機序としてMHCクラスII分子複合体やCD40, CD80, CD86といった副刺激因子を発現していないことが明らかにされている²⁾。我々はヒトDFATもMHCクラスII分子複合体であるHLA-DRを発現していないことを報告している¹⁾。今回の研究にて、他家DFATが長期間生着性を維持できた理由として、ウサギDFATもMHCクラスII分子複合体を発現していないことにより、高い免疫寛容能を有していることが一因と考える。一方、他家移植が自家移植と同等の生着性を示すか否かについては、検討数を増やした群間比較を行い、評価する必要がある。

移植したDFATの血管内皮細胞への分化については、以前の報告にて、DFATはmethylcellulose mediumといった特定の培養条件下で培養することにより血管内皮細胞に分化することが示されている³⁾。またin vitroにおけるDFATの内皮細胞への分化はBone morphogenetic protein (BMP) 4とBMP9の同時刺激により促進することが報告されている⁴⁾。In vivoにおけるDFATの血管内皮細胞への分化メカニズムは今後さらなる検討が望まれる。

DFAT移植による血管再生効果の比較実験では、DFAT移植により側副血行路の発達が促進することが明らかになった。側副血行路発達に関わる分子機構は、動脈新生と呼ばれている⁵⁾。まず刺激を受けた血管内皮細胞からMonocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) やGranulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) が分泌され、単球・マクロファージを側副血行路周辺に動員する。これらの動員された免疫細胞は、血管新生因子であるVascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)などを分泌するとともに、細胞外基質のリモデリング因子であるMatrix metalloproteinase (MMP), Tissue inhibitor of metallopro-

teinase (TIMP) を分泌することにより、動脈新生が誘導される。我々は以前の研究にて、これらのサイトカインのうち、VEGF-A, MCP-1, TIMP-1, TIMP-2がDFATで高発現していることを報告している^{6,7)}。したがって、移植したDFATによる側副血行路の発達促進機序は、DFATから分泌されるこれらのサイトカインのパラクライン作用によると推測される。そして本研究において自家DFATが他家DFATより側副血行路の発達が良好であった理由として、自家DFATの方が宿主免疫細胞の影響を受けずに、細胞間相互作用がより円滑に行われることが一因と考えられる。

5. 結 語

自家DFAT、他家DFATは共に移植後6週目までは虚血筋肉組織に検出され、その一部は血管内皮細胞の形質を獲得していることが明らかとなった。また自家DFATは他家DFATに比べ、側副血行路二次分枝の形成および平滑筋細胞を伴う成熟度の高い微小血管の新生を有意に促進することが明らかとなった。これらの結果より、DFAT自家移植は側副血行路発達促進などを介した高い治療効果が期待できると考えられる。

謝辞

本研究は第4期日本大学理事長・学長特別研究の助成を受けて行われたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; 215(1): 210-222.
- 2) Contreras-Kallens P, Terraza C, Oyarce K, Gajardo T, Campos-Mora M, Barroilhet MT, et al. Mesenchymal stem cells and their immunosuppressive role in transplantation tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2018; 1417(1): 35-56.
- 3) Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109(5):656-663.
- 4) Jumabay M, Abdmaulen R, Urs S, Heydarkhan-Hagvall S, Chazenbalk GD, Jordan MC, et al. Endothelial differentiation in multipotent cells derived from mouse and human white mature adipocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 53(6):790-800.

- 5) Fung E, Helisch A. Macrophages in collateral arterio-genesis. *Front Physiol* 2012; 3:353.
- 6) Watanabe H, Goto S, Kato R, Komiyama S, Nagaoka Y, Kazama T, et al. The neovascularization effect of dedifferentiated fat cells. *Sci Rep* 2020; 10(1):921.
- 7) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, Kazama M, Kano K, Ryu J, 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.