5-27

脱分化脂肪細胞を用いた血管再生医療の基礎研究

日大生産工（院）　○小宮山　翔吾
日大・医学　　松本　太郎
日大生産工　　野呂　知加子

1. 緒言

末梢動脈の狭窄をきたす疾患に、閉塞性動脈硬化症(ASO)や閉塞性血栓性血管炎(TAO)がある。このような虚血性疾患の治療戦略として、薬物療法による内科的治療法やバイパス手術及びインターベンション療法などの外科的治療法が主流である。しかし、これら虚血性疾患の中で特に重症虚血疾患に対しての治療は難渋することが多く、年間約 8 万人の患者が下肢切断を受け QOL（生活の質）が障害されている。このような重症患者を対象に、細胞治療による下肢の機能改善を目的とした血管新生療法が注目されている。

虚血性疾患における細胞治療に関する研究は、2000 年代に入り盛んに行われ、特に骨髄単核球細胞移植の有用性[1]、また最近では、末梢血単核球移植も骨髄単核球移植と同様に治療的血管新生の効果が明らかになった[2]。しかし、どちらの治療法も共通して、治療に必要な幹細胞数の調整のためには 600-1000ml 以上の骨髄液、または血液の採取が必要であり患者に対する負担が大きいなどの問題点があり、必ずしも万人に適応できる治療法とはいえない。

脱分化脂肪細胞（dedifferentiated fat cells, DFAT）は、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である。DFAT は、成熟脂肪細胞マーカーの発現が消失している一方で、骨、軟骨、平滑筋のマーカーが発現していることから、多能性間葉系前駆細胞の形質を持った細胞群であると考えられる[3]。間葉系細胞は、強力に血管新生を促進させる細胞として知られており、その性質を持つ DFAT にも同様の効果があると考えられている。また DFAT は、少量の成熟脂肪細胞分画から高純度の細胞を調製できる事から、特に高齢者に対する血管再生医療の新たな細胞ソースとして期待される。

以前、我々は下肢虚血モデルマウスに DFAT または末梢血単核球細胞を移植し血流改善能の比較検討を行った結果、DFAT 群が有意に改善する事を示した[4]。今回は、引き続き DFAT の血流改善能を検討するため、DFAT と DFAT 調製過程で採取できる脂肪由来幹細胞(ASC)及び皮膚由来 fibroblast をいずれも同一個体マウスから調製し同様の実験を行なった。本研究では、強力な血管新生促進作用を有する細胞として知られる ASC と DFAT の血管新生能の比較検討を目的としている。

2. 実験

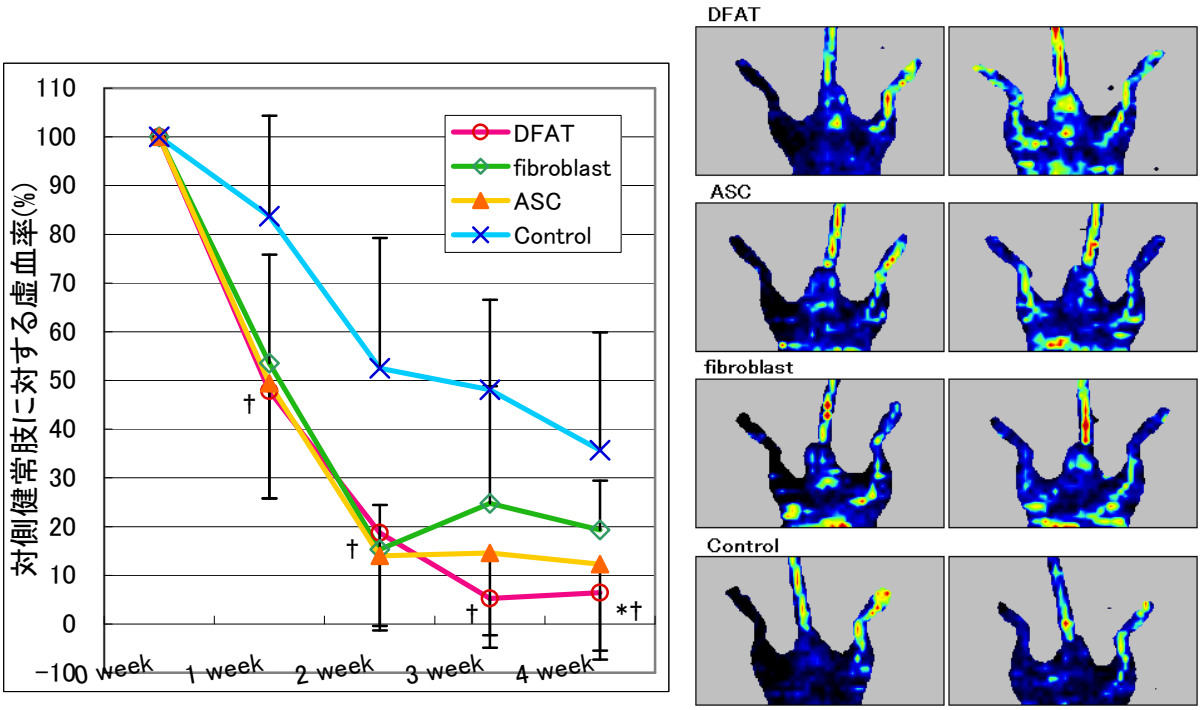
2.1　下肢虚血モデルマウス作製及び細胞移植

免疫不全マウス(7 週齢, ♂)に対して吸入麻酔下に、左大腿動脈を結紮・切除し、急性下肢虚血モデルを作製した。DFAT 1×10^5 個を生理食塩水 100 μl で懸濁し、虚血組織近傍に筋肉内投与を行った(N=8)。同様の操作を、ASC と fibroblast についても行った(各 N=7)。Control

---

Basic Research for Therapeutic Angiogenesis by Using Dedifferentiated Fat Cells

Shogo KOMIYAMA, Taro MATSUMOTO, and Chikako NORO



†：P<0.05 vs Control　＊：P<0.05 vs fibroblast　　1 week　　4 week

図 1　レーザードップラー血流計による血流評価

として、生理食塩水 100μl を投与した群も作製した(N=7)。経時的に、レーザードップラー血流計にて健常側との血流差を測定した。

2. 2　虚血組織の免疫組織学的評価

4 週後、患側虚血筋組織の組織切片標本を作製し、血管内皮細胞（Isolectin B_4）、血管平滑筋細胞（α-平滑筋アクチン）に対する免疫染色（蛍光抗体法）を行い、各群の虚血組織における血管密度を比較検討した。

3.　結果及び考察

DFAT, ASC 及び fibroblast 群は、Control 群と比較して移植後 1, 2 週目において有意な血流増加を認め、4 週目において DFAT 群は fibroblast 群との比較で有意な血流増加を認めた。DFAT 群と ASC 群では、観察期間中に有意な差は認められなかった。

また免疫染色において、DFAT 群と ASC 群は Control 群と比較して虚血組織における血管密度の有意な増加を認めた。

以上より、DFAT は fibroblast より強力で ASC とほぼ同等の血管新生促進作用を有する事が明らかになり、少量の脂肪組織から高純度に調製できる DFAT は虚血性疾患に対する有効なドナー細胞である事が示唆された。

4.　参考文献

1) Tateishi-Yuyama, E. et al.; Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, **360**, 2002:427-435.

2) Tateno K. et al.; Critical Roles of Muscle-Secreted Angiogenic Factors in Therapeutic Neovascularization. *Circ Res.* **98**,2006:1194-1202.

3) Matsumoto, T. et al.; Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J. Cell. Physiol.* **215**,2008:210-222.

4) 小宮山翔吾,松本太郎,野呂知加子,日本大学生産工学部第 42 回学術講演会ポスター発表