

脱分化脂肪細胞（DFAT）における
血管新生効果の検討

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系小児科学専攻

渡邊 拓史

2015 年

指導教員 高橋 昌里

【緒言】既存の血管より、生理的・病的条件下で新たな血管が発生する現象を血管新生¹と言う。この血管新生に関与している分子機序や細胞動態を応用して、虚血組織の血流を確保し、組織障害や壊死を軽減させようとする治療法は、治療的血管新生と呼ばれている。その歴史は血管新生因子の遺伝子治療から始まり、現在は骨髄単核球細胞や間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell: MSC）などの移植による細胞治療の可能性が期待され、臨床研究も開始されているが、長期的成績と二重盲検試験に関して有効性を示す結果が出ておらず、現在なお標準治療として確立していない²⁻⁴。

Matsumoto ら⁵は脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法を用いて、体外で脱分化培養する事により生じてくる繊維芽細胞様の形態をした細胞群が高い増殖能と MSC と同等の多分化能を持っている事を明らかにした。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 を虚血部位へ移植すると DFAT が血管新生因子を分泌し、血管新生が誘導される事が確認されている⁶。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製が可能であるため、再生移植用細胞ソースとして早期の臨床応用が期待出来る。

【目的】 PAD や Burger 病、虚血性心筋症などの難治性虚血性疾患において、細胞移植による治療的血管新生は有効な治療法である可能性がある。また DFAT は MSC や ASC に類似した形質を示すことから、従来のパラクライン効果による血管新生作用に加え DFAT 自身がペリサイトに分化することにより、

より成熟度の高い新生血管を誘導する可能性も示唆される。

一方で、DFAT の血管新生メカニズムに関連し、DFAT が血管内皮細胞にどのような作用を与えるかについては十分に解明されていない。本研究は、DFAT と血管内皮細胞を共培養する事により、細胞間相互作用による血管内皮細胞の遊走能や増殖能、管腔形成能の変化を ASC と比較して検討した。さらに血管内皮細胞との共培養により、DFAT が血管構成細胞の 1 つであるペリサイトへ分化する可能性について ASC と比較して検討した。

【方法】

■実験細胞

green fluorescent protein (GFP) 標識 DFAT・ASC は、以前の研究⁷において GFP トランスジェニックマウス皮下脂肪より調製され、凍結保存された細胞を作成者より譲渡を受け、解凍・培養して実験に使用した。また、ヒト DFAT・ASC は日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理委員会の承認を得て（実験番号 RK-121012-3）、患者（63 歳、女性）から提供を受けた皮下脂肪組織より既報²⁷に従って調製後、凍結保存された細胞を解凍・培養して使用した。

マウス臍臓由来内皮細胞である MS1 は Karolinska Institutete(Sweden)より譲渡されたものを使用した。ヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cell: HUVEC)、ヒト線維芽細胞はクラボウ血管新生キット (KZ-1000, Kurabo)に付属している細胞をマニュアルに従い培養した。

■血管内皮細胞（MS1）の増殖に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

セルカルチャーインサート内にマウス DFAT あるいは ASC を 1×10^4 、プレート底面にマウス血管内皮細胞（MS1） 5×10^3 を播種し、48 時間共培養した。血管内皮細胞の核染色を行い、蛍光顕微鏡にて撮影し、ランダム 5 視野内にある血管内皮細胞数をカウントし、MS1 単独（Control 群）、DFAT 共培養（DFAT 群）、ASC 共培養（ASC 群）で比較した。実験は triplicated dish で行った。

■血管内皮細胞(MS1)の遊走に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

セルカルチャーインサート内に血管内皮細胞（MS1） 5×10^3 、プレート底面に DFAT あるいは ASC 2×10^4 を播種し、8 時間共培養した。セルカルチャーインサート裏面に遊走した血管内皮細胞の核染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて撮影した。ランダム 5 視野にある血管内皮細胞数をカウントし、非共培養群と共培養群で比較した。実験は triplicated dish で行った。

■ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）管腔形成に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

ヒト繊維芽細胞をストローマとする HUVEC 管腔形成システムにヒト DFAT または ASC（P4）を播種し、共培養を行った。培養 11 日後、HUVEC の管腔形成を CD31 に対する免疫染色にて可視化した。CD31 免疫染色像より、解析ソフトウェアを用いて Control 群、DFAT 群、ASC 群の管腔長および管腔面積を測定し、比較した。

■マウス血管内皮細胞（MS1）の管腔形成に対する DFAT・ASC 共培養の影響検討

またコラーゲンボールに付着させた MS1 1.5×10^4 を DFAT または ASC を含浸させたコラーゲンゲル、またはコラーゲンゲルのみで三次元培養し、MS1 の管腔形成を経時的に位相差顕微鏡を用いて観察した。以上の実験は triplicated dish で行った。

■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・ASC からのペリサイトマーカの発現解析

GFP マウスより調製した DFAT あるいは ASC と MS1 を間接的または直接的に 72 時間共培養を行い、4%PFA により固定した。固定した DFAT あるいは ASC を、マウス抗 NG2 抗体、マウス抗 CD31 抗体を用いて免疫染色を行った。Hoechst33342 で核染色を行った後に、作成した標本を共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。

■リアルタイム RT-PCR 法を用いた血管内皮細胞（MS1）との共培養による DFAT・ASC からのペリサイトマーカ遺伝子の発現解析

GFP マウスより調製した DFAT あるいは ASC と MS1 を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、ペリサイトマーカ遺伝子の発現をリアルタイム RTPCR 法を用いて解析した。ペリサイトマーカ遺伝子として NG2、RGS5、PDGFR β を検討した。 β アクチン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、 β アクチン mRNA に対

する相対的定量解析（Comparative Ct 法）を行った。

■統計処理

実験により得られた定量結果は $\text{mean} \pm \text{SD}$ にて表した。2 群間の比較には Mann-Whitney U test、3 群間の比較には one-way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison にて統計解析を行った。P < 0.05 を有意差とした。統計処理は PRISM5（GraphPad Software）を用いて行った。

【結果】

■血管内皮細胞（MS1）の増殖に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

DFAT 群、ASC 群は Control に比べて有意に MS1 の増殖能が高まった。一方、DFAT 群と ASC 群との間には有意差は認められなかった。以上の結果より、DFAT・ASC は血管内皮細胞の増殖を刺激する事が明らかになった。

■血管内皮細胞(MS1)の遊走に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

DFAT 非共培養群と比較して DFAT 共培養群では有意に MS1 の遊走能が高まった ($p < 0.05$)。一方、ASC 非共培養群と比較して ASC 共培養群との比較では有意差が認められなかった。以上の結果より、DFAT は血管内皮細胞の遊走を刺激するが、ASC ではその効果は認められなかった。

■ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）管腔形成に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

ヒト繊維芽細胞をストローマとする HUVEC 管腔形成アッセイでは、DFAT 群、ASC 群で HUVEC の管腔長および管腔面積は有意に増加した ($p < 0.05$)。ASC を添加したウェルでも有意に HUVEC 管腔形成の誘導が増加した ($p < 0.05$)。DFAT 群と ASC 群との間には有意差は認められなかった。

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

コラーゲンボールに付着させた MS1 管腔形成アッセイでは、DFAT 群、ASC 群は Control 群に比べ明らかにコラーゲンボールから派生する発芽的管腔形成が促進する事が明らかになった。以上の結果より DFAT および ASC は血管内皮細胞の管腔形成を促進する事が明らかになった。

■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・ASC からのペリサイトマーカーの発現解析

DFAT 単独培養では全ての DFAT が GFP を発現しており、NG2 は陰性であった。MS1 との 72 時間の Indirect coculture により、約 10%の DFAT が NG2 を発現した。MS1 との 72 時間の Direct coculture では NG2 陽性を示す DFAT が高頻度（約 20%）に認められた。NG2 陽性を示す細胞はすべて内皮細胞マーカー CD31 陰性であり、内皮細胞はペリサイトに分化しない事を確認した。一方、ASC 単独培養では全ての ASC が GFP 陽性であり、共培養前より一部

の細胞に NG2 陽性細胞が認められた。MS1 との 72 時間の Indirect coculture、Direct coculture にて GFP 陽性かつ NG2 陽性細胞が検出されたが、その出現率は共培養前に比べ明らかな差は認められなかった。

■リアルタイム RT-PCR 法を用いた血管内皮細胞 (MS1) との共培養による DFAT・ASC からのペリサイトマーカ遺伝子の発現解析

DFAT において NG2 の mRNA の発現は Control と比較し Direct coculture、Indirect coculture において有意に増加した ($p < 0.05$)。Direct coculture と Indirect coculture 間の比較においては Direct coculture のほうが有意に発現が増加していた ($p < 0.05$)。RGS5 の mRNA の発現は Control と比較し Direct coculture、Indirect coculture において有意に低下した ($p < 0.05$)。Direct、Indirect 間の比較においては有意差は認められなかった。PDGFR β の発現は Control と比較し Direct coculture、Indirect coculture において有意に増加した ($p < 0.05$)。Direct coculture と Indirect coculture 間の比較においては Direct coculture のほうが有意に発現が増加していた ($p < 0.05$)。ASC においては、全体的に NG2、RGS5、PDGFR β の発現は DFAT と比較すると低い傾向が認められた。

【考察】

DFAT・ASC とともに細胞間相互作用による血管内皮細胞の増殖能、管腔形成能を増加させる事が明らかになった。一方、血管内皮細胞に対する遊走能においては DFAT が ASC に比べ有意に高い事が明らかになった。DFAT と ASC の

サイトカイン発現プロファイルは類似している事が報告されている⁸が、遊走活性を制御する因子において何らかの差異があると思われる。

また DFAT は内皮細胞との共培養によりペリサイトへの分化の可能性が示された。一方、ASC は内皮細胞との共培養にてペリサイト分化の傾向を示さなかった。このような結果の差異が生じた理由として ASC では DFAT に比べ未分化ペリサイトマーカーである RGS5 の基礎発現が低く、またペリサイト分化に重要なシグナルを伝達する PDGFR β の発現誘導が低いという形質に起因している可能性がある。また、ASC 自体が不均一な細胞集団であることや⁸、これを純化させるために継代培養を行うが、この過程で細胞の形質が変化し、多分化能が低下する可能性も指摘されている。ASC は *in vitro* および *in vivo* において高い血管新生作用を示すことが知られており、虚血性疾患に対する血管新生を目的とした ASC 細胞治療の臨床研究⁹⁻¹¹ も始まっている。しかし、今回の検討において血管内皮細胞の遊走能に対する効果やペリサイトへの分化能は DFAT の方が高い可能性が示された。今後、ASC と DFAT の *in vivo* における血管新生効果を直接比較する前臨床試験を行い、両者の治療用細胞としての有用性を評価する必要がある。

【結論】

DFAT は血管内皮細胞に作用し、その細胞増殖能、遊走能、管腔形成能を促進する事が明らかになった。また、血管内皮細胞との直接的および間接的共培養によりペリサイトへ分化する可能性が示唆された。一方、ASC は血管内皮細胞に対し DFAT と同等の細胞増殖能・管腔形成能を示すが、細胞遊走能は低い事

が明らかになった。また、ASC のペリサイトへの分化能は、DFAT に比べ高くない事が示された。DFAT は治療的血管新生における有用な治療用細胞ソースとなりうる可能性がある。

【引用文献】

1. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*. 2000;6:389–395.
2. Lunde, K., Solheim, S., Aakhus, S., Arnesen, H., Abdelnoor, M., Egeland, T., et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*. 2006;355:1199–1209.
3. Rosenzweig, A. Cardiac cell therapy--mixed results from mixed cells. *The New England Journal of Medicine*. 2006;355:1274–1277.
4. Schächinger, V., Erbs, S., Elsässer, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Hölschermann, H., et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*. 2006;355:1210–1221.
5. Matsumoto, T., Kano, K., Kondo, D., Fukuda, N., Iribe, Y., Tanaka, N., et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *Journal of Cellular Physiology*. 2008;215:210–222.
6. Nobusue, H., Endo, T., Kano, K. Establishment of a preadipocyte cell line derived from mature adipocytes of GFP transgenic mice and formation of adipose tissue. *Cell and Tissue Research*. 2008;332:435–446.
7. Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004;110:349–355.
8. Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of Cellular Physiology*. 2006;208:64–76.

9. Bura, A., Planat-Benard, V., Bourin, P., et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytherapy*. 2014;16:245–257.
10. Perin, E. C., Sanz-Ruiz, R., Sánchez, P. L., et al. Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial. *American Heart Journal*. 2014;168:88–95.
11. Gimble, J. M., Bunnell, B. A., Guilak, F. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regenerative Medicine*. 2012;7:225–235.