

## 論文の内容の要旨

氏名：河野 通成

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：ウサギ下肢虚血モデルに対する凍結解凍脱分化脂肪細胞自家移植の効果

**【背景】** 四肢の末梢動脈に循環障害を来す疾患が末梢動脈疾患と総称され、近年血管再生治療が注目を浴びている。我々の研究グループでは、皮下脂肪組織から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と同等の多分化能を示すことを明らかにした。

**【目的】** DFAT を用いた血管再生治療の臨床応用に向け、DFAT の凍結・解凍技術の確立や凍結・解凍し

た DFAT の治療用細胞としての機能解析が必要である。本研究では日本白色家ウサギを用いた下肢虚血モデルを作成し、自家 DFAT 移植による血流改善効果と移植安全性を評価した。さらに臨床グレードの細胞凍結液を用いて、凍結・解凍 DFAT の血流改善効果を新鮮 DFAT と比較検討した。

**【方法】** 日本白色家ウサギの DFAT を調製し、新鮮 DFAT、凍結・解凍した DFAT を核染色し死細胞率を定量評価した。ウサギの左大腿動静脈を結紮切離することにより下肢虚血を作成し、1週間後に生理食塩水、自家新鮮 DFAT、自家凍結・解凍後 DFAT を左側腓腹筋周囲に筋肉内注射した。1週間毎に患側と健側の経皮的酸素分圧(TcPO<sub>2</sub>)の測定を行うとともに、腓腹筋組織に対する免疫組織学的検討を行い、Fresh DFAT、Thawed DFAT の移植の効果および安全性を評価した。また DFAT に蛍光ラベルを施し組織学的に移植した DFAT の局在解析を行った。

**【結果】** Fresh DFAT と Thawed DFAT の死細胞率の比較結果、凍結解凍処理により死細胞数が増加することが示された。ウサギ下肢虚血モデルは左大腿動静脈をその分枝を含めて結紮切離を行い、再現性の高い下肢虚血の作成を確立した。下肢虚血モデルにおける DFAT 移植効果を検討した結果、TcPO<sub>2</sub> は Fresh DFAT 群で投与後 2 週目以降、Thawed DFAT 群は、3 週以降 Control 群に対し、有意に TcPO<sub>2</sub> 高値(p<0.05)を示した。Fresh DFAT 群と Thawed DFAT 群を比較した場合、3 週目と 4 週目で Fresh DFAT 群の方が有意(p<0.05)に高値を示したが、5 週目以降は両群間に有意差を認めなかった。免疫組織学的検討では、DFAT 群は Control 群に比べて、有意(p<0.05)に虚血肢の成熟度の高い血管の密度が増加していた。また移植 8 週間において移植 DFAT の腫瘍性変化や異常分化などの有害事象は認められなかった。蛍光色素ラベルしたウサギ新鮮 DFAT 移植実験では、約 3 週間の経過で生着が確認できなくなった。そして移植した DFAT は一部血管内皮細胞の形質を獲得するものの、血液を伴う機能性血管にはほとんど分化しないことが示された。

**【結論】** ウサギ下肢虚血モデルに対する DFAT の自家移植は簡便・有効かつ安全に実施でき、凍結・解凍を行っても DFAT の高い血管新生効果が期待できることが明らかとなった。DFAT は少量の脂肪組織から簡便に大量の調製が可能であることから、高齢者や全身状態不良患者など、今まで細胞移植が困難とされてきた症例に対する血管新生療法の新たな細胞源として期待できる。