

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
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科学系循環器外科学専攻

河野 通成

修了年 2018 年

指導教員 塩野 元美

I. 緒言

血液は主に酸素や栄養を全身に補給するため循環しているが、動脈が血液循環の供給を、静脈とリンパ管が還流を担っている。その動脈が種々の要因で狭窄・閉塞すると、循環障害をきたし臓器障害が生じる。その中で四肢の末梢動脈に循環障害を来す疾患が末梢動脈疾患(peripheral artery disease : PAD)と総称される。下肢虚血が原因で運動制限が生じるために生活の質(Quality of life : QOL)が低下し、重篤な場合は下肢切断にまで至ることもある。下肢 PAD の罹患率については現在世界中で 2 億人以上が罹患しているとされている。米国ではおよそ 800~1200 万人が PAD に罹患していると推定されており、PAD の罹患率は全人口の 4.3%であり、年齢別では 40-49 歳 0.9%、50-59 歳 2.5%、60-69 歳 4.7%、69 歳以上 14.5%であった。また REACH (Reduction of Atherothrombosis for Continued Health) Registry によると、症候性 PAD 患者の 4.7%が CAD、1.2%が CVD を合併し、1.6%が両方を合併していた。PAD 患者の死因は CAD が 40-60%、CVD が 10-20%、その他の血管イベントが約 10%を占める。PAD の診断には問診が重要であり、間欠性跛行の有無、冷汗、疼痛について聴取し整形外科的疾患との鑑別が重要となる。その後、足関節上腕血圧比、足趾上腕血圧比、トレッドミル運動負荷試験、皮膚灌流圧 (skin perfusion pressure : SPP)、経皮的酸素分圧 (transcutaneous oxygen tension : TcPO₂)、超音波検査、CT (Computerized Tomography)、MRI (Magnetic resonance imaging)、X 線血管造影検査等、非侵襲的な検査から必要に応じて施行し、運動療法、薬物療法 (抗血小板療法、糖尿病等のリスクファクター治療)、血行再建術、血管新生療法等の治療を行う。特に近年、幹細胞移植による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

細胞群(脱分化脂肪細胞 dedifferentiated fat cell : DFAT)が、高い増殖能と間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell : MSC)と同等の多分化能を示すことを明らかにした。DFAT はドナー年齢に影響されず少量の脂肪組織から調製できるため、新たな治療用のドナー細胞として大いに期待される

II.目的

DFAT は年齢を問わず少量の脂肪組織から純度の高い細胞を調製できるため血管再生治療用細胞源として期待できる。今後の臨床応用に向け、患者の状態に合わせ細胞移植のタイミングを変えたり、細胞を大量調製し、それを複数回移植することを考慮した場合、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。

III.対象

日本白色家ウサギ(雄性, 2.5kg)は、東京実験動物社から購入した。動物実験は、日本大学医学部動物実験委員会の指針に従い、日本大学動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号 : AP15M019)。

IV.方法

日本白色家ウサギ(雄性、2.5kg)の皮下脂肪組織から DFAT を調製した。細胞凍結は

STEM-CELLBANKER DMSO Free GMP grade(TAKARA BIO INC.)を使用し-80 度で保存を行った。新鮮 DFAT、凍結・解凍した DFAT を核染色剤である 7-amino-actinomycin D(7-AAD)を用いて染色し、フローサイトメーターを使用し死細胞率を定量評価した。次に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(生理食塩水5ml、Control 群、n=6)、自家新鮮 DFAT(Fresh DFAT 群、 1×10^5 /5ml、n=6)、自家凍結・解凍後 DFAT(Thawed DFAT 群、 1×10^5 /5ml、N=5)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(Transcutaneous oxygen tension : TcPO₂)の測定を行うとともに、血管内皮細胞マーカーである isolectin B4 (IB4)と血管平滑筋マーカーである α -smooth muscle actin(ASMA)を用い、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。定量結果は、mean \pm SD で表した。TcPO₂ の3群間の比較は、two-way analysis of variance, Tukey's multiple comparison analysis を用いて統計学的処理を行い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。血管密度の3群間の比較は、one-way analysis of variance, Tukey's multiple comparison analysis を用いて統計学的処理を行い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

V.結果

計 17 匹の日本白色家ウサギ皮下脂肪組織より自家移植に用いる DFAT の調製を行い、その形態学的変化を観察した。検討した17頭のウサギにおいて、培養の失敗や有害事象なく DFAT を調製することが可能であった。以上の結果より、ブタやヒトと同様の方法で少量の日本白色家ウサギ皮下脂肪組織より DFAT が容易に調製でき

ることが明らかになった。Fresh DFAT と Thawed DFAT の死細胞率の比較結果、Fresh DFAT では死細胞率は 0.033%であったのに対し、Thawed DFAT では 10.5%であり、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を安定して作成するための至適条件を検討した結果、左大腿動静脈をその分枝を含めて結紮切離を行い、内側広筋部位、仰臥位、FiO₂ 0.5 の条件下で TcPO₂ を測定することにより、再現性の高い下肢虚血の作成と経時的な評価法を確立するに至った。下肢虚血モデルにおける DFAT 移植効果を検討した結果、TcPO₂ は投与後 2 週目で Control 群に対し、Fresh DFAT 群は有意に高値を示した。以後 Fresh DFAT 群と Control 群の比較では Fresh DFAT 群の方が有意に高値を示した。一方 Thawed DFAT 群は、投与後 2 週目までは Control 群と有意差はなかったが、3 週以降 Control 群に対し、Thawed DFAT 群は有意に TcPO₂ 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。腓腹筋組織の免疫組織学的検討では、血管内皮細胞マーカーである IB4 陽性血管数を定量した結果、Fresh DFAT 群は 55.5 ± 11.7 個、Thawed DFAT 群は 54.3 ± 6.2 個、Control 群は 33.3 ± 8.2 個であった。さらに平滑筋細胞を伴う成熟度の高い血管を示す IB4, ASMA 二重陽性血管数を定量した結果、Fresh DFAT 群は 32.7 ± 4.3 個、Thawed DFAT 群は 35.5 ± 3.9 個、Control 群は 16.3 ± 5.8 個であり、DFAT 群は Control 群に比べて、有意(p<0.05)に虚血肢の血管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。また移植した 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。

VI. 考察

凍結・解凍 DFAT はフローサイトメーターを用いた死細胞率の定量評価では、新鮮 DFAT と比較し死細胞数は有意に多くなっていたが、経皮的酸素分圧、虚血筋肉組織の免疫染色による血管数の比較では移植後1ヶ月以降では有意差を認めなかった。本実験では細胞移植時に死細胞も含め投与しており、細胞数の減少が移植後早期の血流改善に影響している可能性が高い。今後 DFAT の解凍後生存率を増加させることができるかまた死細胞除去について検討する価値がある。DFAT 移植に関して、これまでマウス、ラット、ウサギ、ブタ等の虚血組織に移植し、血管新生効果を明らかにしてきた。DFAT 移植による微小血管の増生作用は主にサイトカイン分泌を介したパラクライン効果が治療効果の主体を占めると考えられている。本実験でも移植 DFAT の局在・形質解析では自家移植した DFAT は約3週間の経過で生着が確認できなくなり、長期間生着しないことが示された。このような理由から、DFAT の血管新生作用は、主にサイトカイン分泌を介したパラクライン効果によるものと思われる。また DFAT の長期の生着を認めなかった点から、パラクライン効果による血管新生が行われた後は運動による理学療法により虚血改善効果が持続した可能性がある。理学療法の重要性とともに今後の課題として、DFAT の追加投与によりパラクライン効果によりさらなる虚血改善効果を得られるか検討する必要がある。今回虚血部位に移植した DFAT は組織修復が進むに従い細胞数が減弱し、長期に生着することはなかったとの結果が出ており、今後凍結・解凍 DFAT を用い複数回投与、至適投与間隔について検討する必要がある。また生着率を高める最適な移植方法についても検討し

ていく必要がある。

VII. 結論

本研究では、日本白色家ウサギを用いて皮下脂肪組織より DFAT を調製し、下肢虚血モデルに対する新鮮・凍結解凍 DFAT の自家移植の有効性および安全性を検討した。その結果、①少量のウサギ皮下脂肪組織より高増殖能をもつ DFAT が容易に調製できた。②下肢虚血部位への DFAT 自家移植は、微小血管の増生を有意に促進し血流改善作用を示すことが明らかとなった。③凍結解凍 DFAT は新鮮 DFAT に比べ解凍後の生存率や移植後早期の $TcPO_2$ 改善効果に問題は残るが、長期的に観察すると血流改善作用や微小血管増生に差がないことが示された。④移植後 8 週間まで有害事象は特に認められず DFAT 自家移植が安全に行えることが確認できた。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。