

ウサギ下肢虚血モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果

(自家細胞と他家細胞の比較)

(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程

外科系循環器外科学専攻

鈴木 沙季

2020 年

指導教員 田中 正史

【背景】

近年、食生活の欧米化による生活習慣病の増加と高齢化に伴い末梢動脈疾患(peripheral artery disease: PAD)の患者数は著しく増加している。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。PADの治療は運動療法、食事療法、内服加療などの保存的治療から始まり、重症になれば血管内治療やバイパス手術などの外科的血行再建術が行われる。しかしながら、全身状態不良のため手術に耐えられない症例や、治療適応のない末梢病変を主因としたCLIも多数存在する。

近年、難治性PADに対しては、遺伝子治療や細胞治療による血管再生治療が注目を浴びている。Matsumoto^[1]らは、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養で体外培養することで生じてくる脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)が高い増殖能と間葉系幹細胞(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。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。DFATはMSCと同様にヒト主要組織適合遺伝子複合体であるHLA-DRの発現を欠くため、免疫原性が低いと考えられることから、DFATは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。

【目的】

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。

【方法】

実験動物は、日本白色種家ウサギ(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、天井培養法を用いて調製した。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、green fluorescent protein (GFP)でラベリングした DFAT を腓腹筋内に投与し、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である isolectin B4 (IB4)を用いて腓腹筋組織に対する免疫組織学的検討を行い、腓腹筋組織での GFP 陽性細胞局在および形質解析を行った。

DFAT 移植実験では、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(transcutaneous oxygen tension: TcPO₂)の測定を行い、両群の血流改善効果を比較検討した。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。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。

【結果】

GFP でラベリングした DFAT を腓腹筋内に投与し、2週間ごとに腓腹筋を摘出して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 陽性領域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。自家移植した個体、他家移植した個体ともに移植後6週目まで GFP 陽性細胞の生着が確認された。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 陽性を示す微小血管の存在が認められた。GFP、IB4 二重陽性を示す細胞には、管腔を形成するものと管腔を形成しないものの2種類が確認された。以上の結果より、虚血筋肉組織への DFAT 移植により自家、他家移植を問わず少なくとも6週間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 を移植することにより両者の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 ± 23.5 mmHg、他家群 48.5 ± 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 ($p < 0.05$) に分枝数が多かった。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となった。また、細胞移植を行った腓腹筋の HE 染色による組織学的検討の結果、リンパ球浸潤などの免疫拒絶反応を示す所見や、細胞の腫瘍性増殖、石灰化などの異常分化を示す所見は認められなかった。

【考察】

DFAT 局在・形質解析実験において、移植した DFAT は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。また、自家 DFAT を移植した個体、他家 DFAT を移植した個体ともに移植後 6 週目まで GFP 陽性細胞の生着が確認され、その一部は血管内皮細胞マーカー IB4 を発現していた。この実験結果より、他家移植であっても 6 週間までは生着性を有し、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。他家 DFAT が長期間生着性を維持した理由として、ウサギ DFAT にはヒト DFAT と同様に MHC クラス II 分子複合体が発現していないことが一因と考える。MHC クラス II 分子複合体が発現していないことにより免疫拒絶反応が起こらず、自家同様に長期間生着することが可能であったと考えられる。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。

自家 DFAT と他家 DFAT 移植による血流改善効果を検討した実験では、虚血部位の TcPO₂ は自家群と他家群で有意差を認めなかった。この理由として、移植 4 週目までは他家 DFAT も自家 DFAT と同程度に虚血組織を中心に移植部

位に生着しており、自家 DFAT と同等の血管新生作用を発揮した結果であると推測される。また、この移植実験において、自家 DFAT 移植は他家 DFAT 移植に比較して、①側副血行路二次分枝数が有意に多くなっていた、②平滑筋を伴ったより成熟度の高い微小血管の増生が有意に大きかった、の 2 点が明らかとなった。側副血行路発達に関しては動脈新生(arteriogenesis)、虚血部位における微小血管の増生に関しては血管新生 (angiogenesis) が関与すると考えられている。動脈新生に関与するサイトカインは、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、matrix metalloproteinase (MMP)、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)、transforming growth factor- β (TGF- β)、platelet-derived growth factor (PDGF) などが確認されており、血管新生に関与するサイトカインは vascular endothelial growth factor (VEGF)、PDGF、TGF- β などが確認されている^{[2]-[4]}。これらのサイトカインのうち、MCP-1、TIMP-1、TIMP-2、PDGF、TGF- β については DFAT で発現していることが確認されており^[5]、DFAT は動脈新生、血管新生いずれに対しても促進的に作用していると考えられる。そして自家 DFAT の方が他家 DFAT と比較して宿主細胞との細胞間相互作用がより円滑に行われると推測されることから、今回の結果に繋がったと考えられる。

現在再生医療細胞として広く使用されている骨髄 MSC や脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ASC) は採取に伴う侵襲が比較的高く、高齢者や全身状態不良患者、基礎疾患の有無などで採取が困難な症例が存在する。また、純度の高い細胞を得るためには通常継代を 3 回程度繰り返す必要があり、継代培養を繰り返すことで増殖能や分化能が低下することが明らかになっている^[6]。一方、DFAT は骨髄 MSC や ASC と比較して、少量の脂肪組織から大量調製が可能であり侵襲性が低いことと、初代培養から多細胞の混入がほとんどない純度の高い細胞を調製可能であるという利点があり、治療用細胞ソースとして極めて有望であると考えられる。現在、日本大学では CLI 患者に対する自家 DFAT 細胞を用いた臨床研究が予定されている。一方、本研究結果からは、他家 DFAT を用いた細胞治療も十分に治療効果が望めることが明らかになった。細胞医薬品の開発を考えた場合、他家細胞は均質な細胞を大量生産できることから、特にコスト面で有利であるといえる。今後、他家 DFAT が自家 DFAT と同等の治療効果、安全性を示すかどうかについては、ヒト DFAT を用いた前臨床試験を行い検証する必要がある。

【結論】

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。その結果、①自家 DFAT、他家 DFAT は共に少なくとも移植後6週間までは虚血筋肉組織に生着し、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。②細胞移植による血流改善効果は、自家 DFAT と他家 DFAT との間に明らかな差は認められなかった。一方、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。DFAT は血管新生のみならず動脈新生による側副血行路発達を介して虚血筋肉組織の血流を改善させることが明らかになった。他家 DFAT 移植の血流改善効果は自家 DFAT 移植に比べ非劣勢であったが、側副血行路の発達を促進させ、虚血組織に成熟度の高い血管を形成させる作用に関しては、自家 DFAT の方が勝っていることが示唆された。バンキングの容易性などを考慮すると、今後、血管再生治療用細胞として DFAT は自家細胞医薬品のみならず他家細胞医薬品としても開発する意義があると思われる。今後の更なる研究が望まれる。

【引用文献】

- [1] T. Matsumoto *et al.*, “Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 215, no. 1, pp. 210–222, 2008.
- [2] J. P. Cooke and D. W. Losordo, “Modulating the Vascular Response to Limb Ischemia: Angiogenic and Cell Therapies,” *Circ. Res.*, vol. 116, no. 9, pp. 1561–1578, 2015.
- [3] P. Carmeliet, “Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis,” *Nat. Med.*, vol. 6, no. 4, pp. 389–395, 2000.
- [4] W. Cai and W. Schaper, “Mechanisms of arteriogenesis,” *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 40, no. 8, pp. 681–692, 2008.
- [5] S. Kikuta *et al.*, “Osteogenic Effects of Dedifferentiated Fat Cell Transplantation in Rabbit Models of Bone Defect and Ovariectomy-Induced Osteoporosis,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 19, no. 15–16, pp. 1792–

1802, 2013.

- [6] K. McIntosh *et al.*, “The Immunogenicity of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes In Vitro,” *Stem Cells*, vol. 24, no. 5, pp. 1246–1253, 2006.