

## 論文の内容の要旨

氏名：加藤 礼保納

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：ヌードマウス下肢虚血モデルに対するヒト脱分化脂肪細胞移植の血管再生効果

【背景】近年、重症下肢虚血(critical limb ischemia: CLI)に対する新しい治療法として、細胞治療による血管再生治療が注目されている。脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT)は、成熟脂肪細胞を天井培養することにより調製される多能性細胞であり、少量の脂肪組織から大量調製できるため、新たな血管再生治療用細胞として期待されている。一方、ヒト DFAT の血流改善効果の作用メカニズムや、脂肪由来幹細胞(adipose-derived stem cell: ASC)といった既存の治療用細胞との差異は明確になっていない。

【目的】免疫不全ヌードマウス下肢虚血モデルに、臨床グレードヒト DFAT を虚血筋肉内投与し、側副血管の発達や虚血筋肉組織における微小血管の増生を組織学的に評価した。同時にヒト ASC 移植群との比較により血管再生に関する作用の差異を検討した。

【方法】 ヒト皮下吸引脂肪組織から、既報に従い DFAT と ASC を調製した。10 週齢の BALB/c-nu マウス(雄性)の左大腿動脈を結紮し、下肢虚血モデルを作製した。虚血作製 2 日後に 3 群に群分けし、DFAT 群はヒト DFAT( $5 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ )、ASC 群はヒト ASC( $5 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ )、Control 群は生理食塩水( $200 \mu\text{l}$ )をそれぞれ虚血肢の内転筋群に筋肉内投与を行った(各群  $n = 10$ )。下肢の肉眼的虚血性変化は Modified ischemia score を用いてスコア化し、経時的に群間比較を行った。移植 19 日後に下肢筋組織を摘出し、組織切片標本を作製した。側副血管の組織学的評価は、大腿筋群のヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin Eosin : HE) 染色標本を用いて虚血側と健常側の血管壁面積比を測定し、群間比較を行った。また腓腹筋血管密度の組織学的評価は、腓腹筋組織切片を Isolectin B4 (IB4)および  $\alpha$ -smooth muscle actin (ASMA) に対する抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、IB4+血管数、IB4+ASMA+血管数をそれぞれ計測し、群間比較を行った。

【結果】移植後 19 日目の観察終了時点における Modified ischemia score は、DFAT 群 > ASC 群 > Control 群の順で虚血性変化の程度が軽い傾向にあった。虚血側と健常側の側副血管壁面積比は、DFAT 群 > ASC 群 > Control 群の順に高く、DFAT 群は Control 群や ASC 群に比べて有意( $p < 0.05$ )に高いことが示された。虚血側腓腹筋の血管密度を定量評価した結果、IB4+血管数、IB4+ASMA+血管数ともに、DFAT 群 > ASC 群 > Control 群の順に多く、特に IB4+ASMA+血管数においては、DFAT 群は Control 群や ASC 群に比べて 2 倍以上と有意( $p < 0.01$ )に多いことが示された。

【結論】ヌードマウス下肢虚血モデルに対する移植実験を行った結果、DFAT は ASC に比べ側副血管を発達させる作用が強いことを明らかにした。また DFAT は ASC に比べ虚血筋肉組織における血管新生作用が強く、特に平滑筋細胞を伴う成熟度の高い血管を有意に増やすことを明らかにした。ASC といった既存の治療用細胞に比べ、DFAT は侵襲性、効率性、安全性のみならず、血管再生作用の面でも優位性が高いことが示された。