原 著

ブタ下肢虚血モデルに対する脱分化脂肪細胞自家移植の効果

河内 秀臣^{1,2)} 松本 太郎³⁾ 風間 智彦³⁾
 山元 智衣³⁾ 加野浩一郎⁴⁾ 前田 英明¹⁾
 河野 通成¹⁾ 塩野 元美^{1,5)} 田中 正史¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部外科学系心臓血管外科学分野

²⁾ 社会医療法人一成会木村病院血管外科

³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

⁴⁾ 日本大学生物資源科学部応用生物科学科

⁵⁾ 板橋区医師会病院

The Effect of Autologous Dedifferentiated Fat Cell Transplantation in a Pig Model of Hindlimb Ischemia

Hideomi KAWACHI^{1,2)}, Taro MATSUMOTO³⁾, Tomohiko KAZAMA³⁾,
 Chii YAMAMOTO³⁾, Koichiro KANO⁴⁾, Hideaki MAEDA¹⁾,
 Michinari KONO¹⁾, Motomi SHIONO^{1,5)} and Masashi TANAKA¹⁾

¹⁾ Department of Cardiovascular Surgery, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan

²⁾ Department of Vascular Surgery, Kimura Hospital, Tokyo, Japan

³⁾ Department of Functional Morphology, Division of Cell Regeneration and Transplantation,
 Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan

⁴⁾ Laboratory of Cell and Tissue Biology, Collage of Bioresource Science, Nihon University, Fujisawa, Japan

⁵⁾ Itabashi Medical Association Hospital, Tokyo, Japan

Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells are multipotent cells that have characteristics similar to those of mesenchymal stem cells (MSCs). In the present study, we examined the effect of autologous DFAT cell transplantation on blood flow recovery in a pig model of hindlimb ischemia. Hindlimb ischemia was created by ligation and resection of bilateral femoral arteries in pigs. Immediately after (Protocol 1) or one week after (Protocol 2) resection, DFAT cells (1×10^7 /body) were intramuscularly injected into one side of the hindlimb as a DFAT limb. The same amount of saline was also injected into another side of the hindlimb as a control limb. The transcutaneous oxygen tension (TcPO₂) of hindlimbs was measured every week, and the vascular density of ischemic muscle tissue was evaluated at 4 weeks after transplantation. In both protocols, the average TcPO₂ was higher in the DFAT limb than in the control limb after transplantation. Immunohistochemical analysis revealed that the number of alpha-smooth muscle actin-positive vessels in the ischemic muscle tissue was significantly increased in the DFAT limb compared to that in the control limb. No histological abnormalities, such as tumor formation, were found in the transplanted tissue and major organs. These findings suggest that autologous transplantation of DFAT cells showed a therapeutic effect on blood flow recovery without any adverse effects in the pig model of hindlimb ischemia.

Key words: dedifferentiated fat cell, cell therapy, critical limb ischemia, angiogenesis

脱分化脂肪細胞, 細胞治療, 重症下肢虚血, 血管新生

(J. Nihon Univ. Med. Ass., 2020; 79 (3): 133–143)

はじめに

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) の罹患率が急増している¹⁾。PAD は四肢動脈の慢性的な動脈硬化性変化に伴い発症する疾患であり、下肢に虚血症

状を呈する。PAD は重篤化すると重症下肢虚血 (critical limb ischemia: CLI) に至り、無治療であれば高率で下肢切断に至る。下肢切断は日常生活動作や生活の質を著しく低下させると共に、生命予後を悪化させる。PAD の治療は薬物療法や運動療法など保存的な治療から始まり、重症例では血管内治療やバイパス手術等の血行再建

受付：2020 年 5 月 7 日，受理：2020 年 5 月 10 日

本論文の要旨は、第 41 回日本血管外科学会総会（平成 25 年 5 月 30 日，大阪）にて発表された。

術が行われる。しかし CLI 患者の 25~50% は、自家静脈グラフトが得られない、広範囲の末梢動脈病変を有する、重篤な合併症を有する等の理由により、血行再建術の適応とならない²⁻⁴⁾。

近年、血行再建不能の PAD 症例に対して骨髓単核球、末梢血単核球、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) などの細胞を移植することによる血管再生細胞治療が行われ、一定の成績を得ている⁵⁻⁷⁾。しかし、骨髓単核球移植は全身麻酔下に多量の骨髓を採取する必要があり、全身状態不良例では適応とならない。末梢血単核球移植は有効細胞成分と考えられている CD34⁺ 細胞の濃度や機能に個体差があり、治療効果が安定しないことが明らかになっている。骨髓 MSC や脂肪組織に含まれる MSC (脂肪組織由来幹細胞, adipose-derived stem cell: ASC) は、培養後もヘテロな細胞集団でその品質はドナー年齢や基礎疾患に影響を受ける。特に糖尿病患者では MSC の多能性が低下することが報告されている^{8,9)}。

ヒトを含む哺乳類の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体外培養することにより得られる脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) は、MSC に類似した形質を示す多能性細胞である¹⁰⁾。DFAT は少量の皮下脂肪から煩雑な選別操作なしに均質な MSC 様細胞を大量調製できるため、これまで自己幹細胞移植が困難と考えられてきた高齢者や全身状態の不良な患者に対しても細胞治療を可能にするドナー細胞として期待されている。DFAT は血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) や肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) など種々の血管新生因子を分泌するとともにペリサイトや血管内皮細胞といった血管構成細胞への分化能を有し、高い血管再生作用を示すことが報告されている¹¹⁻¹³⁾。

本研究では、下肢虚血を作成したブタに対して、皮下脂肪より調製した DFAT を虚血筋肉内に自家移植することにより、DFAT の虚血改善効果を検討した。また、移植部位や主要臓器に腫瘍形成などの有害事象がないか検討することにより DFAT の移植安全性を検証した。

研究材料および方法

1 動物

SPF ブタ (雄性, 30 kg) は埼玉実験動物から購入した。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: AP09M008)。

2 DFAT の調製

脂肪細胞の単離および DFAT の調製は既報¹⁰⁾ に従って行った。プロポフォル 10 mg をブタに静脈注射し、セボフルランを用いて全身麻酔下に頸部を切開して皮下脂肪 10 g を無菌的に採取した。採取した脂肪組織を細

切し、0.1% (W/V) コラゲナーゼ溶液 (Koken) に入れ、37℃ で 1 時間処理して細胞を単離した。孔径 250 μm のフィルターで濾過し、8,000 rpm で 3 分間遠心分離して最上層に浮遊する成熟脂肪細胞を採取した。Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し、20% fetal bovine serum (FBS, JRH Bioscience) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) で完全に満たされた T-25 細胞培養フラスコに脂肪細胞を播種した。成熟脂肪細胞が浮遊し天井に接するようにフラスコを固定して 37℃, 5% CO₂ の条件で培養した (天井培養)。培養 7 日目に培養液を交換し、細胞付着面が底になるようにフラスコを反転して同様の条件で培養を継続した。3 日毎に培養液を交換し、14 日目に 10 cm ディッシュに継代培養を行い、第 1 継代 (P1) の細胞を移植実験に用いた。

3 DFAT の分化誘導実験

DFAT の脂肪、骨、軟骨への分化能は既報の方法^{10, 14)} に従って確認した。脂肪分化誘導は、DFAT を 3 cm ディッシュにコンフルエントに到達するまで培養した後、脂肪分化誘導培地 10% FBS, 1 mM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 0.5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich), 1 $\times$ insulin transferring selenium (ITS, Invitrogen) 含有 DMEM にて 3 週間培養した。脂肪細胞への分化は、細胞を 4% パラホルムアルデヒドで 1 時間固定後、50% エタノールで 3 分処理し Oil red-O (Sigma-Aldrich) で 15 分間染色し評価した。骨分化誘導は、DFAT を 3 cm ディッシュにコンフルエントに到達するまで培養した後、骨分化誘導培地 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich), 50 μM L-ascorbic acid-2-phosphate (Sigma-Aldrich) にて 3 週間培養した。骨芽細胞への分化は、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色および Alizarin red S 染色を行い評価した。軟骨への分化誘導は、DFAT を 3 cm ディッシュにコンフルエントに到達するまで培養した後、軟骨分化誘導培地 1% FBS, 50 μM L-ascorbic acid-2-phosphate, 40 $\mu\text{g/ml}$ proline, 100 $\mu\text{g/ml}$ pyruvate, 10 ng/ml transforming growth factor (TGF)- β 3, 100 nM dexamethasone, 1 $\times$ ITS 含有 DMEM にて 3 週間培養した後、Alcian blue 染色を行い軟骨細胞への分化を評価した。細胞の観察および写真撮影は、倒立式顕微鏡 (ECLIPSE TE-2000-U, Nikon) を用いて行った。またペレット培養法による軟骨分化誘導として、DFAT 1 $\times$ 10⁶ 個を 15 ml polypropylene tube 内に沈降後、軟骨分化誘導培地 NH ChondroDiff Medium (Miltenyi Biotec) 800 μl を用いて培養を行った。培養液の交換は 3 日毎に施行し、3 週間後、形成される軟骨様細胞凝集塊を実体顕微鏡で観察し写真撮影した。

4 下肢虚血モデル作製

ブタ下肢虚血モデルの作成法は既報¹⁵⁾ にしたがって

行った。11 頭のブタに対してセボフルレン吸入全身麻酔下に両側鼠径部に斜切開を置いて大腿動脈を確保した。浅深大腿動脈分岐部より末梢まで剥離し、10 cm の長さを結紮切離した。出血がないことを確認して皮膚を縫合した。術後下腿前脛骨筋領域の経皮酸素分圧 (TcPO₂) を測定し、その低下によって灌流領域の虚血を確認した。

5 DFAT 移植方法

プロトコール 1 では、虚血作製直後に同一個体の皮下脂肪組織から調製した DFAT 1×10^7 個を 10 ml の生理食塩水で懸濁し、片側の虚血肢筋肉内に 10 カ所に分けて投与した (DFAT 肢)。対側の虚血肢には生理食塩水 10 ml を同様に 10 カ所に分けて筋肉内投与した (Control 肢)。プロトコール 2 では虚血作製から 1 週間後に DFAT と生理食塩水を同様に投与した。検討数は、プロトコール 1 では $n=6$ 、プロトコール 2 は $n=5$ とした。各プロトコールのブタは普通飼料で投与後 4 週間まで飼育した。

6 血管造影検査

虚血作製時と細胞移植 4 週間後に血管造影検査を行った。セボフルラン全身麻酔下に頸動脈から造影用カテーテルを挿入し、大動脈終末部からイオメロン 300 (ブラッコ・エーザイ) を投与した。診断用 X 線高電圧装置 (KXO-80C, 東芝メディカルシステムズ) を用いて下肢血管の透視およびフィルム撮影を行い、側副血行路の発達を評価した。

7 TcPO₂ 測定

虚血作製時、DFAT 移植時、移植後 1 週間毎に両側下腿前脛骨筋領域の TcPO₂ を測定した。セボフルラン全身麻酔下にブタを仰臥位に固定して下肢を剃毛し、専用の両面テープとコンタクト液を使用してキャリブレーションした電極 (tc Sensor E5250, Radiometer) を装着し、経皮血液ガスモニターシステム (TMC400 monitor, Radiometer) を用いて TcPO₂ を測定した。約 20 分後、計測値の変動が消失し安定したポイントを測定値とした。

8 組織学的検討

移植後 4 週間後に TcPO₂ 測定、血管造影検査終了後に致死量のペントバルビタールを静脈内投与し、安楽死させた。血管密度の評価として、両下肢の大腿四頭筋から筋組織を採取し、10% 緩衝ホルマリン溶液 (Wako) で固定し、パラフィン包埋を行い、5 μ m スライス切片標本を作成した。標本を脱パラフィン処理後、target retrieval solution (Dako Cytomation) を使用して 15 分煮沸し、抗原賦活化処理した。10% ヤギ血清含有 PBS を 1 時間反応させ、非特異的反応の阻害処理を行った。洗浄後一次抗体としてマウス平滑筋 α アクチン (α smooth muscle

actin; ASMA) 抗体 (1:100 希釈, Sigma-Aldrich) とウサギ von Willebrand factor (vWF) 抗体 (1:100 希釈, Sigma-Aldrich) を 4℃ で一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:1,000 希釈, Invitrogen) と Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:1,000 希釈, Invitrogen) を室温で 60 分間反応させた。PBS で 4 回洗浄し、Hoechst 33342 (1:2000 希釈, Invitrogen) を室温で 30 分間反応させ、核染色した。超純水で 3 回洗浄し Fluoromount G (Southern Biotech) で封入した。蛍光顕微鏡 Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon) で観察し、Lumina Vision ソフトウェア (Mitani Corporation) を用いて写真撮影した。ランダム 3 視野を撮影し vWF 陽性 ASMA 陽性血管数と vWF 陽性 ASMA 陰性血管数を計測した。

細胞移植による安全性の評価として、安楽死後、移植筋肉組織、肺、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し肉眼的観察を行った。その後、各組織を 10% 緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋を行い、5 μ m スライス切片標本を作成した。脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡 (Olympus BX51, Olympus) にて観察を行った。

9 統計処理

TcPO₂ の結果は mean $\pm$ SD でグラフに示した。DFAT 肢と Control 肢の比較は Mann-Whitney U-test を用いて統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。統計解析は Graphpad Prism ソフトウェア (GraphPad Software Ver4.0) を用いて実施した。

結 果

1 DFAT の調製

計 11 頭のブタより皮下脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離し、天井培養を行った。培養前のフラスコ天井側の観察では、脂肪滴を有する単胞性脂肪細胞のみが認められた (Fig. 1a, Pre)。培養 4 日目には脂肪細胞が非対称的に分裂し、線維芽細胞様形態を呈する DFAT が認められるようになった (Fig. 1a, Day 4)。培養 7 日目には増殖した DFAT がコロニー形成する所見が認められた (Fig. 1a, Day 7)。フラスコを反転させ、付着培養にて培養を継続すると約 14 日後にはコンフルエントに到達するまで増殖した (Fig. 1a, Day 14)。DFAT の調製は、実験を行った 11 頭全頭で失敗なく、第一継代で移植に必要な細胞数 (1×10^7) を得ることができた。

調製した DFAT が多分化能を有することを確認するために、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化誘導培地で 3 週間培養を行った。脂肪分化誘導培地で培養を行った結果、多胞性の脂肪滴を有する脂肪細胞が認められるようになり、Oil red-O 染色により脂肪細胞の特徴である中性脂肪の蓄積が確認された (Fig. 1b, Adipogenic)。ま

Fig. 1 Pig dedifferentiated fat (DFAT) cells.

(a) Morphology of adipocytes before (Pre) and after (Day 4, Day 7, and Day 14) the ceiling culture. Arrows represent DFAT cells. Bars: 200 μ m. (b) Multilineage differentiation potential of DFAT cells. The differentiation potential to adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes was evaluated. Bars: 1 mm in a micromass pellet and 100 μ m in others.

た骨分化誘導培地で培養を行った結果、多くの細胞が骨芽細胞の特徴である ALP 陽性となり、また Alizarin red S 陽性のカルシウム沈着が認められるようになった (Fig. 1b, Osteogenic). 軟骨分化誘導培地で培養を行った結果、軟骨細胞に特徴的な Alcian blue 染色陽性の細胞凝集塊

が認められ、またペレット培養により、細胞外マトリックスに富む軟骨様の細胞凝集塊が誘導された (Fig. 1b, Chondrogenic). 以上の結果より、DFAT が多分化能を有する事を確認した。

Fig. 2 The pig model of hindlimb ischemia.

(a) Angiographic images of femoral arteries before (left panel) and after (right panel) excision. Arrows represent ligation points. Broken lines represent defects of blood flow. (b) Time course changes in TcPO₂ before and after femoral artery excision. The arrow indicates the time point of the femoral artery excision. Data shows mean $\pm$ SD.

2 ブタ下肢虚血モデルの作製

下肢虚血モデルは既報¹⁵⁾を参考にして、全身麻酔下にブタの両側の大腿動脈を浅深大腿動脈分岐部より末梢側約 10 cm を結紮切離し、下肢虚血を作成した。下肢虚血作成前後に血管造影をすることによって、大腿動脈末梢側の浅・深大腿動脈が両側共に途絶している事を確認した (Fig. 2a)。虚血作成による下腿前脛骨筋領域の TcPO₂ の変化と自然推移を Fig. 2b に示す。虚血作成前の TcPO₂ は 95 mmHg であったが、虚血作成直後には 0 mmHg になった。その後 1 週毎に 5 週間後まで TcPO₂ を測定したところ、1 週間後には約 40 mmHg まで改善し、その後も徐々に自然に回復する傾向を認めたが、術前の値までは回復しなかった (Fig. 2b)。合計 2 頭のブタで検討した結果、虚血作成後の TcPO₂ の推移は、個体差はあるものの類似したデータが得られ、また両側を比較するとほぼ一致した値を示した。この結果を基に、本モデルを用いて細胞移植の効果を検討した。

3 DFAT 移植の血流改善効果

プロトコル 1

虚血作製と同時に片側に自家 DFAT 移植 ($1 \times 10^7/10$ ml, DFAT 肢)、また対側に生理食塩水 10 ml 投与 (Control 肢) を行った。投与後 1 週間毎に両側虚血下肢の TcPO₂ を測定し、投与から 4 週間後に下肢の X 線血管造影、大腿筋組織の免疫組織学的検討を行った。

それぞれの個体の TcPO₂ の推移 (Fig. 3a) と、その平均の推移を表したグラフ (Fig. 3b) を示す。虚血作製直後には、TcPO₂ は全例で 0 mmHg となった。検討したほぼ全例の個体において、投与 1, 2 週間後の TcPO₂ は、Control 肢に比べ DFAT 肢で高値を示した (Fig. 3a)。統計解析を行った結果、投与 1 週間後と 2 週間後において DFAT 肢が Control 肢に比して有意に TcPO₂ が高いことが明らかになった (Fig. 3b, $p < 0.05$)。3, 4 週間後も Control 肢に比べ DFAT 肢が高い傾向が持続したが、両肢間に統計学的有意差は認められなかった。

投与 4 週間後に行った血管造影では両下肢とも側副血行路を介して下肢の血管が造影されたが、Control 肢に

Fig. 3 Time course changes in TcPO₂ in the study protocol 1.

(a) Data from each individual animal. (b) Comparison of changes in TcPO₂ between DFAT limbs and control limbs. The arrow indicates the time point of cell transplantation. Data shows mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ vs control limbs.

Fig. 4 Representative angiographic image in the study protocol 1.

比べ DFAT 肢で側副血行路がより発達している傾向を認めた (Fig. 4).

血管に対する蛍光免疫組織染色では、DFAT 肢で vWF⁺ASMA⁺ を示す平滑筋細胞を伴う成熟微小血管が多い傾向が認められた (Fig. 5a). ランダム 3 視野で微小血管数を定量評価したところ、vWF⁺ASMA⁺ を示す血管数

は、DFAT 肢では 116 ± 20 、Control 肢では 65 ± 8 であり、DFAT 肢で有意に増加していた (Fig. 5b 右図, $p < 0.05$). 一方、vWF⁺ASMA⁻ を示す血管数は、DFAT 肢で 34 ± 8 、Control 肢で 36 ± 4 と有意差は見られなかった (Fig. 5b 左図). 以上の結果より、虚血筋肉組織への DFAT 移植は、血管平滑筋を伴う微小血管や側副血管の発達を促進し、移植早期の血流改善に寄与することが明らかになった.

プロトコル 2

DFAT 移植による虚血改善効果が、虚血作成時の急性炎症の抑制や細胞生存に作用した可能性を除外するために、虚血作成から 1 週間後にプロトコル 1 と同様の方法で、DFAT 移植を行い、その効果を検討した.

それぞれの個体の TcPO₂ の推移 (Fig. 6a) と、その平均の推移を表したグラフ (Fig. 6b) を示す. 虚血作成直後には、TcPO₂ は全例で 0 mmHg となり、虚血作成 1 週間後には、両側とも同程度に自然回復を示した. DFAT 投与から 1 週間後 (虚血作成 2 週間後) には、全例において

Fig. 5 Histological evaluation of neovascularization in the study protocol 1.

(a) Representative photomicrographs of microvessels in each limb. Bars: 100 μ m. (b) Comparison of numbers of vWF⁺ASMA⁻ and vWF⁺ASMA⁺ vessels between in DFAT limbs and control limbs. Data shows mean $\pm$ SE. * $P < 0.05$.

DFAT 肢が Control 肢に比して TcPO₂ 高値を示した (Fig. 6a). 統計解析を行った結果, 投与 1 週間後 (虚血作成 2 週間後) において DFAT 肢が Control 肢に比して有意に TcPO₂ が高いことが明らかになった (Fig. 6b, $p < 0.05$). 一方, 投与 2 週間後以降では DFAT 肢で高い傾向を示すものの両肢間に有意差を認めなかった.

DFAT 投与から 4 週間後に行った血管造影では, 両下肢とも側副血行路を介して下肢の血管が造影された.

側副血行路の発達の程度は, プロトコール 1 と同様に Control 肢に比べ DFAT 肢でより発達が顕著な傾向を認めた (Fig. 7).

血管に対する蛍光免疫組織染色では, DFAT 肢で Control 肢に比べ vWF⁺ASMA⁺ を示す血管が多い傾向が認められた (Fig. 8a). ランダム 3 視野で微小血管数を定量評価したところ, vWF⁺ASMA⁺ を示す血管数は, DFAT 肢では 126 ± 38 , Control 肢では 47 ± 11 であり,

Fig. 6 Time course changes in TcPO₂ in the study protocol 2.

(a) Data from each individual animal. (b) Comparison of changes in TcPO₂ between DFAT limbs and control limbs. The arrow indicates the time point of cell transplantation. Data shows mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ vs control limbs.

Fig. 7 Representative angiographic image in the study protocol 2.

プロトコル 1 と同様に、DFAT 肢で有意に増加していた (Fig. 8b 右図, $p < 0.05$). 一方、vWF⁺ASMA⁺ を示す血管数は、DFAT 肢で 48 ± 15 、Control 肢で 36 ± 5 と DFAT 肢で高い傾向は認められるものの、両者間に統計学的有意差は見られなかった (Fig. 8b 左図).

以上の結果から、虚血作成 1 週間後に DFAT 移植を行っても、比較的成熟した微小血管の増加や側副血行路の発達が起こり、移植後早期の虚血改善効果を示すことが明らかとなった。

4 DFAT の移植安全性評価

DFAT 移植から 4 週間後に移植部位周囲組織、肺、肝臓、腎臓、脾臓の肉眼的および組織学的観察を行った。その結果、検討した全ての個体において、DFAT の腫瘍性変化や異常分化は認めず、他臓器への転移など所見も認めなかった。これらの結果より、自家 DFAT が安全に移植できることが確認できた。

Fig. 8 Histological evaluation of neovascularization in the study protocol 2.

(a) Representative photomicrographs of microvessels in each limb. Bars: 100 μ m. (b) Comparison of numbers of vWF⁺ASMA⁻ and vWF⁺ASMA⁺ vessels between in DFAT limbs and control limbs. Data shows mean $\pm$ SE. * $P < 0.05$.

考 察

細胞治療を臨床応用する場合、大動物を用いた前臨床試験による有効性と移植安全性の検証が必要である。本研究は、難治性 PAD に対する DFAT 細胞治療の前臨床試験として、ブタ下肢虚血モデルに対する DFAT 移植の有効性と安全性を検討した。その結果、少量のブタ皮下脂肪組織より DFAT が容易に調製でき、下肢虚血領域に対する DFAT 自家移植は成熟微小血管の増生と側副血行

路の発達を促進させ、その血流改善効果は移植後 1 から 2 週という早期に現れることが明らかとなった。さらに移植による有害事象は認められず、DFAT 自家移植が安全に行えることが確認できた。

ブタでは再現性の高い下肢虚血モデル作出法が未だ確立していないため、我々は予備実験として最初到大腿動脈を結紮する方法を検討した。しかし灌流領域の TcPO₂ 低下の程度は個体差が大きく、安定したデータが得られなかった。そこで Gluzman ら¹⁵⁾ によって報告された大

腿動脈を結紮切離する方法を採用した。結紮切離する部位や長さを検討した結果、浅深大腿動脈分岐部と末梢側10 cmの部位を結紮し、切離したときにTcPO₂が再現性よく0 mmHgとなる下肢虚血モデルを作出することができた。虚血作成後のTcPO₂の自然経過を観察したところ、1週間で約50%の急速な増加が認められ、その後も徐々に自然改善する傾向が見られたが、5週間の観察期間中に虚血作成前値にまで戻る事はなかった (Fig. 2b)。これにより今回作成したブタ下肢虚血モデルがDFAT移植の効果を判定するのに妥当な大動物モデルである事が確認できた。

本研究では、DFAT移植による虚血筋肉組織の血管増成作用が示された。これまでにDFAT移植による血管増成作用は、マウス、ラット、ウサギ虚血モデルでも同様に報告されている^{11, 12, 16, 17)}。DFATはin vitroで血管内皮細胞¹³⁾やベリサイト¹⁸⁾に分化することが報告されていることから、移植したDFATの一部は血管構成細胞に分化している可能性がある。一方これまでの報告ではDFAT自身が長期的に機能的血管に分化したという所見は得られていない。MSCやASCの血流改善効果は、主にこれらの細胞から分泌される血管新生因子 (VEGF, HGF, SDF-1 等) のパラクライン効果により、虚血組織の血管新生や動脈新生が誘導されることに起因していると報告されている¹⁹⁾。培養上清に分泌されるサイトカイン解析では、DFATは骨髄MSCやASCと非常に類似したサイトカイン分泌プロファイルを示すことが明らかになっている²⁰⁾。したがってDFAT移植による血管増生作用や側副血行路発達促進作用は、主にDFATから放出された血管新生因子によるパラクライン効果を介した機序が考えられる。本研究にてDFAT移植により特に血管平滑筋を伴う成熟度の高い微小血管が増加したことから、DFATは虚血組織において血管成熟化に関与するTGF-βやアンジオポエチンといった血管新生因子を豊富に分泌していることが予想される。今後これらの血管新生因子を中心にDFATの血管再生作用機序を明らかにする必要がある。

DFATの移植安全性に関しては、移植後4週目に移植部位や各重要臓器に腫瘍性変化や石灰化などの異常分化がない事を確認した。この結果は、移植安全性が確立している骨髄MSCやASCと同様にDFATが安全に自家移植できることを示唆している。本研究では30 kgのブタに 1×10^7 個のDFATを筋肉内投与し、有効性と安全性が示された。この投与細胞数は、DFATをヒトに臨床応用する際に重要な参考データとなることが予想される。今後臨床グレードのヒトDFATでも同様の移植安全性が確保できるか検証するために、免疫抑制剤投与により免疫抑制状態としたブタを用いた検討などが必要と思われる。

DFATは、骨髄MSCやASCに比べより少量の脂肪組

織から大量調製が可能で、初代培養から異種細胞の混入率が少なく高純度であること¹⁰⁾から、高齢者や全身状態不良症例に対する治療用細胞ソースとして有望であると考えられる。これまで細胞治療も適応とならず、切断を余儀なくされたようなCLI症例に対して、DFAT移植により救済できる可能性があり、今後の早期臨床応用が期待される。

結 論

ブタ下肢虚血モデルに対する自家DFAT移植は、安全で低侵襲的に実施可能であった。DFAT移植により虚血筋組織では、成熟した微小血管の増加や側副血行路が発達することにより、比較的早期に虚血改善効果が現れ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調製が可能であることから、高齢者や重症心不全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。

謝辞

本論文の主旨を含む学位総括論文は、日本大学リポジトリに公開されています。

本論文に記載するCOIはありません。

文 献

- 1) JSC2015. 末梢閉塞性動脈疾患の治療ガイドライン (JSC2015).
- 2) Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007; **45 Suppl S**: S5-67.
- 3) Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis* 2010; **209**: 10-17.
- 4) Reinecke H, Unrath M, Freisinger E, et al. Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence. *Eur Heart J* 2015; **36**: 932-938.
- 5) Cooke JP, Losordo DW. Modulating the vascular response to limb ischemia: angiogenic and cell therapies. *Circ Res* 2015; **116**: 1561-1578.
- 6) Qadura M, Terenzi DC, Verma S, et al. Concise Review: Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: An Integrated Review of Preclinical and Clinical Studies. *Stem Cells* 2018; **36**: 161-171.
- 7) Fujita Y, Kawamoto A. Stem cell-based peripheral vascular regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2017; **120**: 25-40.
- 8) Rennert RC, Sorkin M, Janusz M, et al. Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations. *Stem Cell Res Ther* 2014; **5**: 79.
- 9) Ferrer-Lorente R, Bejar MT, Tous M, et al. Systems biology approach to identify alterations in the stem cell reservoir of subcutaneous adipose tissue in a rat model of diabetes: effects on differentiation potential and function. *Diabetologia* 2014; **57**: 246-256.
- 10) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage poten-

- tial. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210–222.
- 11) Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama S, et al. Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2009; **47**: 565–575.
 - 12) Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; **109**: 656–663.
 - 13) Jumabay M, Abdmaulen R, Urs S, et al. Endothelial differentiation in multipotent cells derived from mouse and human white mature adipocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2012; **53**: 790–800.
 - 14) Shimizu M, Matsumoto T, Kikuta S, et al. Transplantation of dedifferentiated fat cell-derived micromass pellets contributed to cartilage repair in the rat osteochondral defect model. *J Orthop Sci* 2018; **23**: 688–696.
 - 15) Gluzman Z, Koren B, Preis M, et al. Endothelial cells are activated by angiopoietin-1 gene transfer and produce coordinated sprouting in vitro and arteriogenesis in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **359**: 263–268.
 - 16) Kashimura T, Soejima K, Asami T, et al. The effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on a dorsal skin flap model. *J Invest Surg* 2016; **29**: 6–12.
 - 17) 松村昌治, 松本太郎, 加野浩一郎, 他. 家兎下肢虚血モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 自家移植の効果. 日大医学雑誌 2013; **72**: 86–92.
 - 18) 渡邊拓史, 松本太郎, 萩倉一博, 他. 脱分化脂肪細胞 (DFAT) における血管新生効果の検討. 日大医学雑誌 2015; **74**: 238–245.
 - 19) Zhao L, Johnson T, Liu D. Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases. *Stem Cell Res Ther* 2017; **8**: 125.
 - 20) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Eng Part A* 2013; **19**: 1792–1802.