

トピックス

# 脂肪組織由来細胞を用いた血管新生細胞治療

## アディポサイトカインを利用した再生医療

大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学

中神 啓徳

同内分泌・代謝内科

前田 和久

### 背景

近年の細胞治療あるいは遺伝子治療のトランスレーショナル・リサーチにより、様々な分野で難治性疾患の克服の可能性が膨らみつつある。

細胞再生医療においては骨髄細胞や胚性幹細胞を用いた基礎研究およびその応用が試みられているが、安全面や倫理面の問題からその臨床応用は非常に限られた分野であるのが現状である。

近年脂肪組織に骨髄由来の間葉系幹細胞と同様の細胞群が存在することが報告され、より簡便な細胞用治療の供給源として期待されている。骨髄細胞は多くの幹細胞を含んでいるものの多量の採取を必要とし、例えば自己骨髄細胞を用いた血管新生治療には患者から数100mLの骨髄細胞を全麻酔下で採取する必要がある。近年末梢血からの幹細胞の採取も試みられているが、さらに大量の血液が必要とされている。

そこで我々は安全かつ簡単に採取できる脂肪細胞に着目し、血管新生治療への応用の可能性について検討した。

### 方法および結果

#### 1. 脂肪組織由来幹細胞の培養系の確立とその特徴

ヒト脂肪組織をコラゲナーゼ処理した後に遠心分離して脂肪組織に潜在する前脂肪細胞を得た。この細胞は通常の分化誘導刺激により脂肪細胞へと高率に分化(adipogenesis)する一方で、5 mMメルカプトエタノール刺激により神経細胞にも分化可能であった

(neurogenesis)。これを我々はAdipose tissue derived stromal cells(ADSC)と定義した。マウス白色脂肪組織から同様の方法でADSCを培養した後に、表面抗原をFACSで検討した。

その結果、幹細胞のマーカーとして知られているSca1が90%以上の細胞で陽性を示した。さらに詳細な解析では造血系幹細胞のマーカーであるCD45などが陰性であったのに対して、間葉系幹細胞のマーカーであるCD44が70%以上の細胞で陽性を示し、骨髄由来の間葉系幹細胞に非常に似通ったパターンを呈した。

興味深いことには、この細胞は培養することで非常に均一な細胞集団となり、数回継代培養した後もまだ未分化の細胞マーカーを呈していた。

これまでの検討で、脂肪組織からは分泌蛋白質(アディポサイトカイン)<sup>1)</sup>や、様々な生理機能を有する脂質<sup>2)</sup>が放出され、遠隔臓器に影響を及ぼしていることが報告されている。

そこでADSCにおいても、これら因子の定量を試みたところ、血管系から分泌されるよりも多くの増殖因子が分

白色脂肪組織 → コラゲナーゼ処理 → 遠心 → 培養皿への接着



図 脂肪由来未分化細胞による血管新生治療の試み

泌されており，中でも近年大阪大学で血管新生治療の遺伝子治療が試みられている肝細胞増殖因子( Hepatocyte Growth Factor )が非常に多く分泌されていることが分かった．

また最近このHGFの血中濃度とBody Mass Indexが相関することも報告されており<sup>3)</sup>，血管新生作用を有するアディポサイトカインとしてのHGFの意義は極めて興味深いと考えられた．

## 2．血管新生治療への応用

成人での血管新生には，内皮細胞の増殖能，遊走能，管腔形成能が必須であるが，ADSCから分泌される血管新生作用を有するサイトカインがこれにどのような作用を与えるかに関して検討を行った．

ヒト大動脈由来の血管内皮細胞とADSCの共培養系などでの検討を行った結果，ADSCと血管内皮細胞を共培養させた場合のほうが血管内皮細胞同士を共培養させた場合よりも，細胞増殖能が有意に亢進した．さらに，細胞の遊走能，管腔形成能についても検討したところ，ADSCと血管内皮細胞を共培養した場合のほうが内皮細胞同士を共培養させた場合よりも有意に遊走

能，管腔形成能が亢進していた．

これらの血管内皮細胞の増殖能，遊走能は，VEGF( vascular endothelial growth factor )あるいはHGFの中和抗体の投与により有意に抑制された．つまり，ADSCからは血管内皮細胞の増殖能，遊走能，管腔形成能を亢進させ血管新生を誘導させる内皮細胞活性因子が分泌されており，ADSCによって血管新生が促進されると考えられた．

さらに，マウス下肢虚血モデルを用いてADSCが血管新生を誘導できるかどうかを検討した．マウス白色脂肪組織より調整したADSCs培養し，マウス下肢虚血モデルの虚血部位に  $1 \times 10^6$  個注入し，レーザードップラーイメージング法を用いて皮下の血流を測定，2週，4週間後の左右血流比を比較した．

その結果，ADSCs注入群では生理食塩水を注入したコントロール群と比較して左右血流比が有意に改善していた．このことから，動物モデルでもADSCs注入により虚血部位の血流を改善することが明らかになった．さらに虚血部位の切片における内皮細胞特異的マーカーであるCD31陽性細胞を観察したところ，ADSC注入群のほう

がコントロール群よりも有意に増加していた．これによりADSCは虚血部位の血管内皮細胞を増殖させることが示された( 図 )．

## 考察および将来への展望

本研究で，骨髄細胞と同様に脂肪由来未分化細胞を用いての血管新生治療の可能性が示唆された．今後，臨床応用を視野に入れ，Clinical Gradeの細胞培養系でGMP基準に準拠した方法での培養系の確立が必要と考えられる．

## 文 献

- 1 ) Maeda K, Okubo K, Shimomura I, et al.: Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene* 1997, 190 ( 2 ): 227-235.
- 2 ) Maeda K, Cao H, Kono K, et al.: Hotamisligil Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metabolism* 2005, 11 : 107-119.
- 3 ) Rehman J, Considine RV, Bovenkerk JE, et al.: Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. *J Am Coll Cardiol* 2003, 41 : 1408-1413.