

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17026

研究課題名(和文) 吸引脂肪由来血管内皮細胞の単離・回収法の確立および再生医療への応用

研究課題名(英文) Isolation and expansion of vascular endothelial cells from human lipoaspirates.

## 研究代表者

齋藤 夏美 (Saito, Natsumi)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：70638246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：難治性潰瘍など虚血・線維性の組織に対する治療では、組織を肥沃化(幹細胞を補充)し、血管新生・血流改善することが重要である。血管新生に必要な血管内皮前駆細胞は、全身の血管に存在するものの血管を容易に採取できないことから、これまで臨床導入の検討に入ることが困難だった。人体に豊富に存在するヒト脂肪組織は、毛細血管網に富み、外科的に安全に採取可能で、血管新生再生医療の重要なツールとなりうる組織である。本研究の主たる成果は、ヒト脂肪組織由来血管内皮前駆細胞(Adipose derived Endothelial Progenitor Cell; AEPC)の純化培養に世界で初めて成功したことである。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：血管系の研究分野では、それぞれの組織から調製した血管内皮細胞・前駆細胞に対する研究がなされている。ヒト脂肪組織に存在するAEPCは、これまで純化培養法が確立されていなかったために基礎的データの蓄積ができなかったが、今回、AEPCの純化培養に成功したことにより、データ取得が可能な段階になった。本研究では、AEPCの血管内皮細胞としての性質、前駆細胞としての性質に関する細胞特性解析を行い、新規の知見を提供できた。社会的意義：純化AEPC/AECを獲得できたことにより、再生医療の新たな候補ツールを得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial progenitor cells are one of important cell populations to play pivotal roles in angiogenesis and wound healing. In this study, we developed a purification method of adipose derived endothelial progenitor cell (AEPC) from human lipoaspirates. Expanded AEPC was performed characterization and functional analysis in comparison with human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). AEPC was comparable to HUVEC in colony forming unit capacity, tube formation capacity, and expression profile of endothelial cell markers.

研究分野：形成外科学

キーワード：再生医療 血管内皮前駆細胞 血管内皮細胞 脂肪幹細胞 脂肪組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

難治性皮膚潰瘍は、糖尿病、放射線治療後の障害、血管病変などの理由により、血流障害から組織が虚血・線維化し、壊死する疾患である。現行の難治性潰瘍の治療は、軟膏、バイオマテリアル等による保存的治療や、バイパス、皮膚移植、皮弁移植などの外科的治療が行われているが、いずれも姑息的である。これまで、このような状況を解決するための方策として、多分化能を持つ間葉系幹細胞を病的組織へ投与する方法の安全性と有効性の検討が、基礎研究、及び臨床研究にて進められてきた。これは、病的組織で欠乏が想定される幹細胞を外から補充することにより、本来の正常組織のように幹細胞から必要な細胞が適宜分化することにより創傷治癒が促進されることに期待している。しかし、間葉系幹細胞が、前駆細胞を経て、内皮細胞へ生体内で分化し血管新生することに期待するよりは、血管内皮前駆細胞/血管内皮細胞を直接投与する方法で、より確実な効果が得られる可能性が想定された。また、内皮前駆細胞と間葉系幹細胞を併用投与する方法では、間葉系幹細胞の単独投与と比較して、より高い治療効果が得られる可能性も想定された。血管内皮細胞の調製は、大血管(臍帯静脈や大動脈など)からの調製法がすでに確立しているが、大血管は性質上採取のハードルが高く、実質的に自家細胞移植治療のための組織源とすることは難しいため、臨床導入の検討は極めて限定的にしか進んでいない。

脂肪組織は、人体に豊富に存在し脂肪吸引術により安全に採取可能で、間葉系幹細胞(Adipose derived Stem Cell; ASC)に富み、その調製法がすでに確立しているため、再生医療の有力な次世代治療ツールと位置付けられている。加えて、毛細血管網にも富んでいるため、ASCだけでなく血管内皮前駆細胞(Adipose derived Endothelial Progenitor Cell; AEPC)/血管内皮細胞(Adipose derived Endothelial Cell; AEC)も豊富で、内皮細胞の移植細胞源としての可能性を秘めている。しかし、AEPC/AECの純化培養法は、これまで確立していなかった。大血管からの調製は、管腔内部に酵素反応液を注入するという比較的簡便な操作により内皮細胞を高純度で調製することが可能であるが、この方法は脂肪組織の毛細血管網からの調製へ転用することは困難だった。AEPC/AEC純化の際の最大の問題は、AEPC/AECが培養過程で混在するASCに容易に駆逐されるという脆弱性にあり、AEPC/AEC以外の細胞種との分離が重要と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、AEPC/AECの純化培養法の確立、及びその特性を明らかにすることを目指した。

脂肪組織は、体積の大部分を占める成熟脂肪細胞のほか、ASC、AEPC/AEC、周皮細胞、線維芽細胞、血液由来細胞、細胞外マトリックスなどから構成されている。酵素処理により、成熟脂肪細胞以外を間質血管細胞群(Stromal Vascular Fraction; SVF)として回収する方法が広く知られている。そこでまず、SVFからAEPC/AECを純化培養する方法の確立に挑戦する。次に、得られた純化培養AEPC/AECの細胞特性(コロニー形成能、管腔形成能、血管内皮細胞・幹細胞マーカーの発現)について、代表的な内皮細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞と比較して検証する。

## 3. 研究の方法

ヒト脂肪組織からの純化培養AEPC/AECの獲得

- 1) ヒト吸引脂肪組織から酵素反応によりSVFを調製する方法について、既存の酵素の組成、濃度を改変し、AEPC/AECを最大限に回収するために最適化された酵素反応条件を決定する。
- 2) 通常のSVF培養では、AEPC/AECがASCに駆逐されて純化することができない。磁気細胞分離法(MACS)を利用して、純化AEPC/AECを得る。
- 3) 基礎研究で得た知見をもとに、臨床グレードの酵素に置き換えてAEPC/AECを得る。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

AEPC/AEC の細胞特性

- 1) 血管内皮の特性 (血管内皮細胞・幹細胞マーカーの発現、管腔形成能、コロニー形成能) について、臍帯静脈内皮細胞との比較から検証する。
- 2) AEPC/AEC の継代培養を繰り返すことによる細胞特性の変化を検証する。

4. 研究成果

ヒト脂肪組織からの純化培養 AEPC/AEC の獲得

AEPC/AEC を最大限に回収するための SVF 抽出用の酵素組成、及び濃度について検討した。通常、SVF 調製で使用する Collagenase (Col) に加えて、カルシウム (Ca)、DNase 1 (DN)、TrypLE™ Express、Dispase、Poloxamer-188 (Pol) 等の組み合わせから、SVF 中に AEPC/AEC が高比率で回収される組成を検討し、0.2% (w/v) Collagenase、3 mM カルシウム、1,000 U/mL DNase 1 の酵素液と吸引脂肪を 1:1 で混合し、37℃、30分、120 rpm 振盪の条件で、安定して高

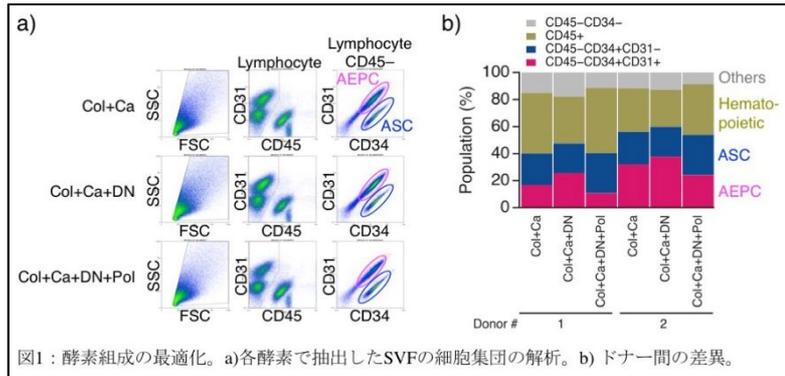


図1：酵素組成の最適化。a)各酵素で抽出したSVFの細胞集団の解析。b) ドナー間の差異。

比率の AEPC を回収可能なことを確認した。結果の一部を図に示した (図 1)。

SVF を直接培養皿に播種した場合、培養初期 (1-5 日) で AEPC/AEC の細胞接着、増殖を確認することができた。しかし、培養後期 (5 日以降) では、急速に ASC が増殖し、AEPC/AEC は駆逐された。そこで、内皮細胞に発現する細胞表面抗原での磁気細胞分離法 (MACS) により、標的細胞の純度を上げる方法を検討した。複数の抗原に対する検討の結果、最終的に CD45 と

CD31 に対する抗体マイクロビーズを連続的に使用した分離で、血管内皮細胞を高比率で含む細胞集団を安定的に分画できることが分かった。しかし、AEPC/AEC を高比率で含む集団 (CD45-CD31+) を培養皿に播種すると、分画時に混入した少数の ASC (CD45-CD31-) が爆発的に増殖し、AEPC/AEC の培養継続は困難だ

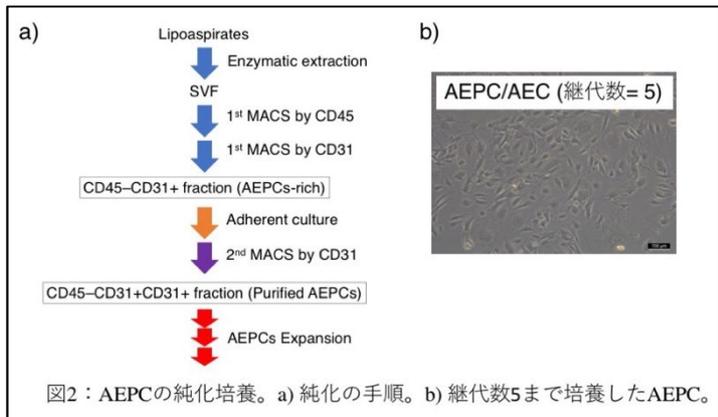


図2：AEPCの純化培養。a) 純化の手順。b) 継代数5まで培養したAEPC。

った。そこで、ASC が爆発的に増殖するタイミングよりも前 (5 日まで) に、再度 CD31 に対する抗体マイクロビーズで分離、培養したところ、ASC に駆逐されない AEPC/AEC を世界で初めて純化培養することに成功した。この細胞集団は、継代培養を繰り返しても ASC に駆逐されず、培養を継続できた (図 2)。

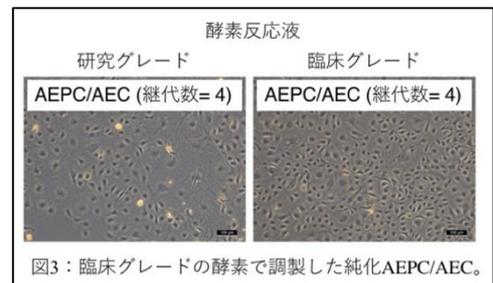


図3：臨床グレードの酵素で調製した純化AEPC/AEC。

更に、臨床導入を目指して臨床グレード (GMP 準拠) の酵素を用いての SVF 調製、AEPC/AEC 純化も実施した。臨床グレードの酵素で純化培養した AEPC/AEC は、研究グレードと比較して細胞数は約 2 倍得られ、細胞形態も類似していた (図 3)。

### AEPC/AEC の細胞特性

純化 AEPC/AEC は、フローサイトメトリー解析より、CD45-CD31+の割合が96%以上を占めた。更に、経時的に血管内皮マーカー、及び幹細胞マーカーの発現プロファイル解析も実施した。純化 AEPC/AEC は継代培養を繰り返しても、CD31、CD105 の発現は維持された。一方、CD34 の発現は、継代数 2 から 3 の早い段階で低下した。これは一般的に幹細胞・前駆細胞が培養系に持ち込まれた途端に、CD34 発現が低下するのと同様の結果だった。加えて、血管内皮細胞マーカーによる細胞免疫染色、管腔形成能試験、コロニー形成能試験を行い、継代培養を繰り返した継代数 5 の AEPC/AEC が、臍帯静脈内皮細胞と同等の血管内皮としての性質、幹細胞としての性質を保持していることが示された(図4)。以上、純化 AEPC/AEC の獲得に世界で初めて成功した。今後は、純化 AEPC/AEC が新たな再生医療ツールとなりうるか？について疾患動物モデルで検証する。

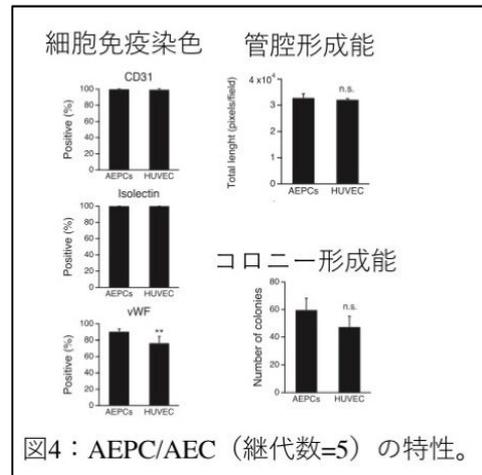


図4：AEPC/AEC（継代数=5）の特性。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Natsumi Saito, Rintaro Asahi, Takako Shirado, Bilguun Odbayar, Kotaro Yoshimura
2. 発表標題 ISOLATION AND EXPANSION OF VASCULARENDOTHELIAL CELLS FROM HUMAN LIPOASPIRATES
3. 学会等名 International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) 15th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Natsumi Saito, Takako Shirado, Masanori Mori, Rintaro Asahi, and Kotaro Yoshimura
2. 発表標題 Isolation and characterization of microvascular endothelial progenitor cells from human lipoaspirates
3. 学会等名 International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) 16th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Natsumi Saito, Rintaro Asahi, Masanori Mori, Takako Shirado, and Kotaro Yoshimura
2. 発表標題 THERAPEUTIC POTENTIAL OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS (AEPCS) FOR DIABETIC SKIN ULCER
3. 学会等名 International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) 17th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 夏美、白土 タカ子、朝日 林太郎、森 正徳、吉村 浩太郎
2. 発表標題 ヒト吸引脂肪組織由来血管内皮前駆細胞の特性解析および臨床応用に向けた検証
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 血管内皮（前駆）細胞を含む細胞集団、その製造方法、及び医薬組成物	発明者 吉村 浩太郎、齋藤 夏美、江藤 ひとみ	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-219467	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脂肪由来血管内皮（前駆）細胞を含む細胞集団を含む医薬組成物	発明者 吉村 浩太郎、齋藤 夏美、森正徳、三木 章伍	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2019-192599	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脂肪組織由来細胞集団の調製	発明者 吉村 浩太郎、白土 タカ子、齋藤 朝日 林太郎、他3名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-219192	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉村 浩太郎  (Yoshimura Kotaro)		
研究協力者	白土 タカ子  (Shirado Takako)		
研究協力者	朝日 林太郎  (Asahi Rintaro)		