

機関番号 : 32665

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2009~2011

課題番号 : 20590707

研究課題名 (和文) 高齢者に対する再生医療実現を目指した新規細胞ソースの開発

研究課題名 (英文) Development of a novel cell source for regenerative medicine in elderly patients

研究代表者

松本 太郎 (MATSUMOTO TARO)

日本大学・医学部・教授

研究者番号 : 50366580

研究成果の概要 (和文) : 種々の年齢の患者から脂肪組織の提供を受け、脱分化脂肪細胞 (DFAT) を調製し、効率的な骨、血管分化誘導法を検討した。その結果、ドナー年齢に無関係に骨髓脂肪細胞から調製した DFAT は高い骨分化能を示し、1%低酸素条件下で培養した DFAT 培養上清は高い血管新生能を示すことなどを明らかにした。卵巣摘出による骨粗鬆症モデル動物において DFAT 移植は骨密度を増加させた。また下肢虚血モデルマウスにおいて DFAT 移植は、末梢血単核球移植よりも高い血流改善作用を示した。以上の結果より、高齢者の骨粗鬆症や下肢虚血性疾患に対して、DFAT を用いた細胞治療は有用であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : We examined efficient induction of osteogenic and angiogenic differentiation in mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells, which were prepared from adipose tissue of patients of various ages. The results showed that DFAT cells prepared from bone marrow adipocytes exhibited high osteogenic potential regardless of donor age. Conditioned media from cultured DFAT cells under low (1%) oxygen condition showed strong angiogenic activity. DFAT cell transplantation increased bone density in an animal model of osteoporosis induced by ovariectomy. In a mouse ischemic hind limb model, an increase in blood flow was observed in DFAT cell-transplanted mice, compared to that in peripheral blood mononuclear cell-transplanted mice. These results suggest that DFAT cells may be an attractive cell source for cell-based therapy in elderly patients with osteoporosis and peripheral artery disease.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 内科系臨床医学・内科学一般 (含心身医学)

キーワード : 老年医学、再生医療、脂肪細胞、脱分化脂肪細胞、血管新生、間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景  
近年、骨髓の間質細胞より得られる間葉系幹

細胞 (MSC) が高い増殖能と多分化能を有することが明らかにされ、骨、軟骨、血管、心筋

などの再生を目的とする細胞治療の臨床試験が開始されている。MSCを用いた再生医療はES細胞などと異なり、自己細胞から不全臓器を根治できる可能性を秘めていることから大きな期待がかけられている。一方、MSCには、(1)骨髄に0.001%と微量に存在する細胞を付着培養して得られる細胞集団であるため、他細胞の混入が避けられない。(2)すでに骨髄機能が低下している高齢者や骨髄が未発達の小児では、骨髄採取が困難であることや幹細胞数が極端に少ないため、必要な細胞数を調製できない。といった問題点がある。再生医療を万人に適応できる一般的な治療法にするためには、より安全で低侵襲的に採取でき、簡便に大量調製が可能な移植用細胞の開発が望まれる。

我々は皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を体外で培養し、脱分化させることにより、高い増殖能とMSCと同等の多分化能を示す細胞群（脱分化脂肪細胞 dedifferentiated fat cells, DFAT）を調製する培養法を確立した（国際特許公開 PCT/JPN2004/007322, 加野浩一郎）。現在までに、年齢1歳から81歳までの計21名の患者より外科手術時に廃棄される脂肪組織の提供を受け、脱分化脂肪細胞を調製し、その特性解析を行っている。その結果、(1)約1gの皮下脂肪組織から全例においてDFATが調製でき、長期継代培養および凍結保存が可能であること、(2)調製した細胞は、成熟脂肪細胞に由来する細胞であるため、他細胞の混入がほとんどなく非常に純度が高い細胞群であること、(3)調製した細胞から採取した患者の年齢に関係なく高い分化度を示す骨、軟骨を誘導することが可能なことなどを確認している（Matsumoto T et al. J Cell Physiol, 215:210-222, 2008）。DFATは骨髄幹細胞などに比べ、少量の皮下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、今まで細胞移植療法が困難と考えられてきた患者に対する再生医療の新たな細胞源として期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、脱分化脂肪細胞から、臨床応用に適応可能な効率的な骨および血管組織分化誘導法を確立する。そして骨粗鬆症や下肢虚血性疾患といった高齢者に好発する難治性疾患のモデル動物を作成し、脱分化脂肪細胞移植の有効性や安全性を検討する。これらの実験を通じて特に高齢者を対象とした脱分化脂肪細胞移植法の確立とその臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 効率的な骨組織誘導法の確立

種々の年齢(1-81歳)の患者の皮下脂肪組織から調製したヒトDFATを人工骨基質( $\beta$ -TCP/collagen スポンジ)に播種し、数種類の骨誘導培地にて3週間培養した。アルカリホスファターゼ染色およびアリザリンレッドS染色にてそれぞれの骨分化能を比較検討した。また患者の異なる部位の脂肪組織(皮下、骨髄)からそれぞれDFATを調製し、上記の方法で骨分化能を比較検討した。

### (2) 効率的な血管誘導法の確立

種々の年齢(1-81歳)の患者の皮下脂肪組織から調製したDFATを低酸素条件下および正常酸素条件下で培養し、培養上清を採取した。これらの培養上清の血管新生能をヒト臍帯静脈内皮細胞を用いたin vitro管腔形成アッセイを用いて、比較検討した。

### (3) 骨粗鬆症モデルに対するDFAT移植実験

日本白色家ウサギの両側卵巣を摘出後5ヶ月間飼育し、閉経性骨粗鬆症モデルを作成した。両側大腿骨の骨密度を二重エネルギーX線法により測定し、骨密度低下を確認後、皮下脂肪組織を摘出し、DFATを調製した。そして卵巣摘出7ヶ月後に、調製したDFAT( $1 \times 10^8$ )を右大腿骨骨髄内へ移植した。左大腿骨にはコントロールとして同量の生理食塩水を注入した。移植1ヶ月後に両側大腿骨を摘出し、X線学的、組織学的に骨組織の再生能を比較検討した(n=8)。

### (4) 下肢虚血モデルに対するDFAT移植実験

免疫不全(SCID)マウスの右側大腿動脈を結紮切除し下肢虚血モデルを作成した。このマウスに対し、DFAT(DFAT群,  $1 \times 10^5$ , n=8)、末梢血単核球(PBMNC群,  $1 \times 10^5$ , n=8)、または生理食塩水(Saline群, n=8)を虚血筋肉組織に移植した。そして経時的にレーザードップラー血流計による血流測定を行い、血行改善効果を評価した。また移植4週間後に虚血筋肉組織を摘出し、組織学的検討を行い、各群の血管密度を比較検討した。

### (5) DFAT移植に伴う生着性、安全性の検討

マウス下肢虚血モデルを用いてDFATの細胞移植に伴う生着性、安全性を検討した。C57BL/6マウスの片側大腿動脈を結紮し、下肢虚血モデルを作成後、GFPトランスジェニックマウスより調製したDFAT( $1 \times 10^5$ )を、虚血部位に筋肉内投与した。そして経時的に組織学的検討を行い、DFATの生着性や血管構成細胞への分化能、さらに移植安全性を評価した。次に免疫不全(NOD-SCID)マウスの片側大腿動脈を結紮し作成した下肢虚血モデルに対し、QTrackerにて蛍光標識したヒトDFAT( $1 \times 10^5$ )を両側の大筋筋肉内に投与した。

そして移植6ヶ月に至るまで経時的に両側大腿筋組織、肺、肝臓、腎臓、脾臓を採取し、肉眼的、組織学的に移植細胞の局在、分布、腫瘍形成の有無について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 効率的な骨組織誘導法の確立

効率的な骨分化誘導法の検討を行った結果、10<sup>-6</sup> m all-trans レチノイン酸と 50 mM β-グリセロリン酸を含有した培養条件にて、高い骨芽細胞への分化指向性を示すことが明らかになった。DFATのドナー年齢による骨分化能の差異を検討した結果、ドナー年齢に無関係にアルカリホスファターゼ強陽性、アリザリンレッドS陽性の高度な石灰化を伴う骨組織を誘導することができた(最高ドナー年齢 81歳)。また皮下脂肪組織に比べて、骨髄脂肪組織から調製したDFATはより成熟度の高い骨組織に分化しやすいことが明らかになった。以上の結果より、高齢者から調製したDFATからでも、分化度の高い骨組織を誘導できることが明らかになった。

##### (2) 効率的な血管誘導法の確立

DFATのドナー年齢による血管新生能の差異を検討した結果、ドナー年齢に無関係にDFAT培養上清は高い血管内皮細胞管腔形成能を示すことが明らかになった。また1%低酸素条件下で培養したDFAT培養上清は、正常酸素条件下で培養したDFAT培養上清に比べ、より高い血管新生活性を示すことが明らかとなった。

##### (3) 骨粗鬆症モデルに対するDFAT移植実験

マイクロCTにて大腿骨海面骨の骨密度を測定した結果、コントロール側に比べ、DFAT注入側では、頸部海面骨の骨密度が有意に高値を示した。また組織学的にもDFAT注入側では頸部海面骨の骨構造が密であり、石灰化骨の形成促進が認められた。以上の結果より、骨粗鬆症の骨密度低下に対して、DFATを用いた細胞治療が有用であることが示唆された。

##### (4) 下肢虚血モデルに対するDFAT移植実験

NOD-SCIDマウス下肢虚血モデルに対し、DFAT移植を行い、血流改善効果を検討した。その結果、DFAT群では、Saline群やPBMNC群に比べ、移植3週間後より有意に血流改善が認められた。また免疫組織学的検討の結果、DFAT群の虚血筋組織では、Saline群に比べ、血管密度が有意に増加していた。これらの結果から、DFAT移植による血流改善効果は、末梢血単核球に比べて優れていることが明らかになった。

##### (5) DFAT移植に伴う生着性、安全性の検討

C57BL/6マウス下肢虚血モデルにGFPトランスジェニックマウスより調製したDFATを筋肉内投与し、経時的にDFATの生着性や移植安全性を評価した。その結果、移植したDFATは、主

に虚血瘰癧部位を中心に生着し、移植2ヶ月後まで検出可能であった。生着したGFP陽性DFATの一部は、脂肪細胞、筋線維芽細胞、血管内皮細胞などに分化している所見が認められた。移植後3ヶ月間にわたり、移植細胞の異常増殖や異所性骨形成などの異常分化所見は認められなかった。またNOD-SCIDマウス下肢虚血モデルに対し、蛍光標識したヒトDFATを筋肉内投与し同様の検討を行った。その結果、虚血組織内では移植1ヶ月、正常組織では移植15日までは移植部位を中心にDFATが検出された。一方、虚血組織内では移植2ヶ月、正常筋組織では移植1ヶ月後からは移植したDFATはほとんど検出されなくなり、その後も検討したすべての組織において、細胞の増殖性変化や腫瘍形成などの有害事象は検出されなかった。以上の結果より、DFATは虚血瘰癧組織に効率的に生着し、腫瘍原性や異常分化を示さず安全に移植できることが確認された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Yamamoto C, Matsumoto T (9人中5番目) 他: Zinc-finger transcriptional factor Sall1 induces angiogenesis by activation of the gene for VEGF-A. Hypertension Research 査読有 32(2): 143-148, 2010
- ② Saito K, Matsumoto T (8人中3番目), Iribe Y (8人中4番目) 他: Moderate low temperature preserves the stemness of neuronal stem cells and suppresses apoptosis of the cells via activation of the cold-inducible RNA binding protein. 査読有 Brain Research, 1358:20-29, 2010
- ③ Matsumoto T (11人中1番目), Watanabe H 他: Appropriate doses of granulocyte-colony stimulating factor reduced atherosclerotic plaque formation and increased plaque stability in cholesterol-fed rabbits. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 査読有 17(1):84-96, 2010
- ④ Hagikura K, Matsumoto T (14人中6番目) 他: Low invasive angiogenic therapy for myocardial infarction by retrograde transplantation of mononuclear cells expressing the VEGF gene. International Journal of Cardiology 査読有 142(1):56-64, 2010
- ⑤ Sakuma T, Matsumoto T (9人中2番目), Kano K (9人中3番目) 他: Mature adipocyte derived dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth

- muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. *Journal of Urology* 査読有 182 (1):355-365, 2009
- ⑥ Matsubara Y, Kano K, Kondo D, Mugishima H, Matsumoto T: Differences in adipocytokines and fatty acid composition between two adipocyte fractions of small and large cells in high-fat diet-induced obese mice. *Annals of Nutrition & Metabolism* 査読有 54(4):258-267, 2009
- ⑦ Jumabay M, Matsumoto T (10人中2番目), Kano K(10人中4番目): Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocytes phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 査読有 47(5):565-575, 2009
- ⑧ Matsumoto T, Mugishima H: Non-hematopoietic stem cells in umbilical cord blood. *International Journal of Stem Cells* 査読有 2(2):83-89, 2009
- ⑨ Konuma N, Matsumoto T (10人中3番目), Iribe Y (10人中6番目) 他: Mouse embryonic stem cells give rise to gut-like morphogenesis, including intestinal stem cells, in the embryoid body model. *Stem Cells and Development* 査読有 18(1):113-125, 2009

[学会発表] (計12件)

- ① 松本太郎, 入部雄司, 加野浩一郎 他: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の特性と臨床応用に向けた取り組み. (シンポジウム) 第10回日本再生医療学会総会, 東京, 2011. 3. 2
- ② Kazama T, Kano K, Matsumoto T 他: Dedifferentiated fat (DFAT) cells convert into cardiomyocytes phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats with myocardial infarction. The 8th Annual Meeting of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS 2010) (Symposium), Dallas, USA, 2010. 10. 22
- ③ 松本太郎: 脱分化脂肪細胞 (招聘講演) 第1回脂肪組織由来幹細胞療法コンセンサス会議, 神戸, 2010. 8. 21
- ④ 松本太郎: 血管新生の分子機構および新規血管新生療法の臨床応用に向けた取り組み (特別講演) 第2回 Stroke Science Academy, 博多, 2010. 7. 9
- ⑤ Matsumoto T, Kano K, Iribe Y 他: Dedifferentiated fat cells as a new cell source for regenerative medicine in patients with cardiovascular diseases.

- (シンポジウム) 第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 岐阜, 2010. 7. 15
- ⑥ 松本太郎: 成熟脂肪細胞を細胞源とする再生医療の取り組み (特別講演) 第38回形成外科新宿フォーラム, 東京, 2010. 2. 26
- ⑦ 松本太郎: 幹細胞に関する最近の話題と新規細胞治療法の開発 (ランチョンセミナー) 第51回日本小児血液学会・第25回日本小児がん学会, 舞浜, 2009. 11. 27
- ⑧ Matsumoto T: Dedifferentiated fat cells as a new cell source for regenerative medicine. The 7th Annual Meeting of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS 09) (Symposium), Daegu, Korea, 2009. 10. 15
- ⑨ Matsumoto T, Kano K, Wada M 他: Dedifferentiated fat cells as a new cell source for regenerative medicine. (Workshop) The 9<sup>th</sup> World Congress on Inflammation, Tokyo, Japan, 2009. 7. 8
- ⑩ 松本太郎, 加野浩一郎, 入部雄司他: 脱分化脂肪細胞(DFAT)による心血管病の再生医療. (シンポジウム) 第25回医工学治療学会 大阪, 2009. 4. 12
- ⑪ 松本太郎, 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた再生医療への取り組み. (プレナリー). 第10回記念循環器再生医療研究会, 東京, 2008. 11. 29
- ⑫ 松本太郎: 血管新生療法 現状と展望. (特別講演) 第13回日本血管病理研究会, 東京, 2008. 10. 18

[図書] (計3件)

- ① 松本太郎: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) (脂肪組織由来幹細胞療法コンセンサス会議, 脂肪組織由来幹細胞療法の基礎), 臨床評価, 38(4):761-765, 臨床評価刊行会, 2011. 5
- ② 大日方大亮, 松本太郎, 高橋悟: 脱分化脂肪細胞(DFAT)による尿道平滑筋再生, 排尿障害プラクティス, 18(4):7-14, メディカルレビュー社, 2010. 12
- ③ 松本太郎, 福田昇: 脱分化脂肪細胞(DFAT)を細胞源とする再生医療, 医学のあゆみ, 230(8):553-555, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2009. 8

[その他]

ホームページ

<http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/saisei/dfat.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 太郎 (MATSUMOTO TARO)

日本大学・医学部・教授  
研究者番号：50366580

(2)研究分担者

加野 浩一郎 (KANO KOICHIRO)  
日本大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号：80271039

入部 雄司 (IRIBE YUJI)  
日本大学・医学部・研究員  
研究者番号：20348618

石毛 美夏 (ISHIGE MIKA)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号：90420950

(3)連携研究者

なし