

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590951
 研究課題名（和文）脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植による血管新生療法の試み
 研究課題名（英文）Therapeutic angiogenesis using adipose-derived regenerative cells

研究代表者
 新谷 理 (SHINTANI SATOSHI)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：20309777

研究成果の概要（和文）：

脂肪組織由来間葉系前駆細胞（ADRCs）は、様々な血管新生増強因子を分泌する細胞として注目されている。我々は、マウス下肢虚血モデルへのADRCs移植が虚血骨格筋における血管新生を増強することを確認した。さらに、ADRCsがVEGF-Cを放出していることに着目し、難治性リンパ浮腫組織におけるリンパ管新生増強効果や炎症細胞浸潤抑制効果による浮腫軽減をきたすことを見いだした。その機序としてM2型マクロファージの関与が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

It has been known that adipose-derived regenerative cells (ADRCs) secrete multiple angiogenic growth factors. We reported that ADRCs implantation improve severe ischemia and seems to be a useful strategy of therapeutic angiogenesis. Next, we focused on VEGF-C that ADRCs released. ADRCs therapy increased lymphatic capillary density and significantly reduced tissue edema. We consider that BM derived M2 macrophages plays an important role in postnatal lymphangiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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・循環器内化学

キーワード：血管新生療法、脂肪由来間葉系前駆細胞、リンパ管新生、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

我々が臨床導入を行った TACT study は、我が国最初の循環器領域における重症虚血性疾患への再生医療として注目されたが、依然治療抵抗性を呈する重症症例も存在して

いる。原因として、動脈硬化因子の管理不良や複数因子の合併が考えられている。一般に生体における幹細胞／前駆細胞の存在部位として、骨髄、末梢血および再対決のみならず、骨格筋や脂肪組織が注目されており、脂

肪組織由来間葉系前駆細胞 (ADRCs) 移植による血管新生療法は、TACT study に対し治療抵抗性を示す患者にとって新たな治療手段のひとつになりうると考えられた。

2. 研究の目的

- (1) ADRCs は培養過程でいかなる性状や特徴を獲得していくのか？
- (2) どのような機序で虚血組織における血管新生を増強するのか？
- (3) ADRCs 移植は、BM-MNCs 移植と同等もしくはそれ以上の血管新生増強効果を有するか？
- (4) ADRCs 移植はリンパ管新生を増強しリンパ浮腫を改善させるか？

3. 研究の方法

- (1) ADRCs 分化誘導および放出されるサイトカインの検討 (培養実験)
マウス ADRCs は、単径部皮下脂肪組織をコラゲナーゼ融解し遠心分離後、DMEM 培養で単離する。
継代培養を行い、免疫染色やフローサイトメーターによる細胞表面抗原の検出を行い、どのような細胞特性を獲得していくかを検討する。
培養細胞や培養上清を回収し、PCR や Western blot analysis を行い、放出されるサイトカインの検討を行う。
- (2) ADRCs 移植によるマウス下肢虚血モデルにおける血管新生増強効果の検討
マウス下肢虚血作成後に虚血骨格筋へ ADRCs を移植する。対照群として、生食移植群と成熟脂肪細胞移植群をおく。
血管新生増強効果は、細胞移植 3 週後にレーザードプラによる皮下血流測定、免疫組織染色による毛細血管密度の測定を行う。
細胞移植後、末梢流血中のサイトカイン濃度および骨髄からの EPC 動員への影響を検討する。
- (3) ウサギ下肢虚血モデルにおける ADRCs 移植は BM-MNCs 移植と同等の血管新生増強効果を有するか (前臨床試験)
ウサギ片側下肢虚血作成 1 週間後、ランダムに 3 群に分け、それぞれ ADRCs、BM-MNCs、生食を筋注法で虚血骨格筋へ移植する。細胞は全て自己のものを使用する。
血管新生増強効果は、細胞移植 4 週後に下肢血管造影による側副血行発達 (アンギオグラフィックスコア)、レーザードプラによる皮下血流測定、免疫組織染

色による毛細血管密度の測定を行う。ABI に相当する虚血/正常下腿血圧比は生理的指標であり、術直後より 1 週間ごとに行う。

- (4) ADRCs 移植によるマウス尾部リンパ浮腫モデルにおけるリンパ管新生増強効果の検討
上記研究結果により、ADRCs は様々なサイトカインを放出することを確認した。我々は、リンパ管新生増強サイトカインである VEGF-C が放出されていることを確認し、現行の治療法では、十分な患者 QOL が保たれていないリンパ浮腫に対する新たな治療戦略として ADRCs 移植を行った。
マウス尾部リンパ浮腫モデルを作成し、ADRCs もしくは生食を皮下注射で移植する。リンパ浮腫は経時的に尾部短径を測定する。また、細胞移植 4 週間後には尾部組織標本の免疫学的組織染色を行い、新生リンパ管の定量評価、間質の増大や炎症細胞の浸潤についても評価する。
- ## 4. 研究成果
- (1) ADRCs 分化誘導および放出されるサイトカインの検討 (培養実験)
ADRCs は、培養過程において血管内皮細胞へ分化するのではなく平滑筋細胞へ分化していることが蛍光免疫組織染色で明らかになった。細胞表面抗原による検討では、Sca-1 陽性、c-kit 陰性、Lin 陰性より幹・前駆細胞といった未分化細胞ではあるが、CD34、CD31、flk-1 が陰性であり、内皮の特性を獲得していないことが明らかとなった。さらに ADRCs から SDF-1 α 、VEGF といった血管新生増強サイトカインが放出されていることも明らかになった。
 - (2) ADRCs 移植によるマウス下肢虚血モデルにおける血管新生増強効果の検討
ADRCs 移植により、末梢流血中へ SDF-1 α 、VEGF などが放出され、骨髄からの EPC 動員が増強することが明らかになった。細胞移植 3 週間後には、ADRCs 移植群で、生食群や成熟脂肪細胞移植群と比較して有意に血管新生が増強した。また、SDF-1 中和抗体を投与することにより血管新生増強効果が消失することも確認された。
 - (3) ウサギ下肢虚血モデルにおける ADRCs 移植は BM-MNCs 移植と同等の血管新生増強効果を有するか (前臨床試験)
細胞移植 4 週間後には、生食群と比較

し有意に血管新生が増強した。ADRCs 群と BM-MNCs 群間に治療効果の差は認めなかった。

(4) ADRCs 移植によるマウス尾部リンパ浮腫モデルにおけるリンパ管新生増強効果の検討

リンパ浮腫組織に移植した ADRCs から VEGF-C が放出されていることが確認された。ADRCs 移植により、浮腫により腫脹した尾部短径が縮小した。免疫組織染色による検討においても、ADRCs 移植により、リンパ管新生を増強させ、炎症細胞の浸潤を抑え、組織浮腫を軽減させることが明らかとなった。その機序として骨髄由来の M2 型マクロファージの動員が関与していると考えられ、現在、検討中である。

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 8 件)

1. 新谷 理: ヒト皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法の試み: 特集: 血管・心筋再生はどこまで来たか [治す] PAD に対する再生治療 Heart View 2011 Vol 15 No. 8. 90-96. メジカルビュー社 (査読無)
2. Kondo K, Shibata R, Unno K, Shimano M, Ishii M, Kitoh T, Shintani S, Walsh K, Ouchi N, Murohara T. Impact of a single intracoronary administration of adiponectin on myocardial ischemia/reperfusion injury in a pig model. *Circ Cardiovasc Interv.* 2010; 3(2): 166-173. (査読有)
3. 室原豊明, 新谷 理, 小椋康弘, 清水優樹: 血管再生療法は重症虚血肢を救えるか: CARDIAC PRACTICE 2010 Vol. 21 No. 2. 27-34. メディカルレビュー社 (査読無)
4. Shumiya T, Shibata R, Shimizu Y, Ishii M, Kubota R, Shintani S, Murohara T.

Evidence for the therapeutic potential of ex vivo expanded human endothelial progenitor cells using autologous serum. *Circ J.* 2010; 74(5): 1006-1013. (査読有)

5. Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imaizumi M, Kitagawa Y Murohara T Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. Role of SDF-1 and endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:61-66. (査読有)
6. Murohara T, Shintani S, Kondo K. Autologous adipose-derived regenerative cells for therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(24):2784-2790. (査読有)
7. 新谷 理: 細胞移植によるハイブリッド血管新生療法の開発 日本冠疾患学会雑誌 2009 Vol. 15 No. 3 193-197. (査読有)
8. 新谷 理, 室原豊明: 骨髄細胞を用いた血管新生療法: 循環器科 2009 Vol. 66 No.4. 353-358. 科学評論社(査読無)

[学会発表] (計 7 件)

1. 2011 American Heart Association. Orland. 2011.11.14
M2 macrophages contribute to postnatal lymphangiogenesis as lymphatic endothelial progenitors.
Shimizu Y, Shintani S, Shibata R, Izumi Y, Ogura Y, Ishii M, Murohara T.
2. 2011 American Heart Association. Orland. 2011.11.14
Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances

- lymphangiogenesis and improves secondary lymphedema.
Shimizu Y, Shintani S, Shibata R, Izumi Y, Ogura Y, Ishii M, Murohara T.
3. 2011 European Society of Cardiology. Paris. 2011.8.30
Therapeutic lymphangiogenesis with implantation of adipose-derived regenerative cells.
Shimizu Y, Shintani S, Shibata R, Izumi Y, Ogura Y, Ishii M, Murohara T.
4. 第 27 回日本医工学治療学会学術大会
平成 23 年 4 月 24 日 岡山
皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植による血管新生療法—新たな細胞供給源を求めて
新谷 理、室原豊明
5. 7th International Federation of Adipose Therapeutics & Science (IFATS). Daegu Korea. 2009.10.16
Implantation of Adipose-Derived Regenerative Cells Enhances Ischemia-induced Neovascularization. Role of SDF-1-mediated Endothelial Progenitor Cell Mobilization.
Shintani S, Kondo K, Kitagawa Y, Murohara T.
6. 第 30 回日本動脈アフェレンシス学会学術大会
平成 21 年 9 月 12 日 札幌
細胞移植による血管新生療法—新たな細胞供給源を求めて
新谷 理、近藤和久、室原豊明
7. 第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会
平成 21 年 7 月 17 日 下関
脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植による血管再生療法
新谷 理、近藤和久、室原豊明

〔図書〕（計 5 件）

1. 新谷 理: 血管内皮前駆細胞と VEGF「血管再生治療」浅原孝之編 93-96. 診断と治療社、東京 2012 年
2. 新谷 理、泉 雄介、室原豊明: Early EPC と late EPC とは「循環器再生医学の現状と展望」室原豊明編 201-205. メディカルレビュー社、東京 2011 年
3. 新谷 理、室原豊明: 自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法の開発「循環器再生医学の現状と展望」室原豊明編 63-69. メディカルレビュー社、東京 2011 年
4. 新谷 理、近藤和久、小椋康弘、清水優樹、室原豊明: 重症 ASO に対する血管新生療法の開発「閉塞性動脈硬化症診療マスターブック」朔啓二郎編 140-148. 新興医学出版社、東京 2010 年
5. 嶋野祐之、新谷 理、室原豊明: 閉塞性動脈硬化症「薬学生のための新臨床医学—症候および疾患とその治療」市田公美、細山田真編 138-142. 廣川書店、東京 2009 年
6. 研究組織
(1) 研究代表者
新谷 理 (SHINTANI SATOSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 20309777
- (2) 研究分担者
室原 豊明 (MUROHARA TOYOAKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 90299503
- (3) 連携研究者
なし