

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592188

研究課題名(和文) ヒト脂肪組織由来幹細胞を用いた新たな骨格筋再生療法の開発

研究課題名(英文) Novel regenerative therapy for skeletal muscle injury using human adipose tissue-derived regenerative cells

研究代表者

横田 和典 (Yokota, Kazunori)

広島大学・大学病院・教授

研究者番号：20403529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：Celutionによって酵素と遠心分離で単離した脂肪組織由来再生細胞(ADRC)を、ヌードラットの前脛骨筋損傷モデルに対して、損傷部に注入した(ADRC群)。また、ヒト単核球を注入した群(MNC群)とPBSのみを注入した群(PBS群)を作製した。ADRC群では損傷後1週および4週において、MNC群やPBS群と比べて筋収縮力が有意に大きく、組織学的評価では、新生血管と再生筋を多く認め、瘢痕形成が有意に縮小されていた。また、損傷部に血管内皮細胞や筋芽細胞への分化が示唆されたADRCを認めたが、その数は非常に少なかった。

研究成果の概要(英文)：Human adipose tissue-derived regenerative cells (ADRCs) can be isolated easily and aseptically from unwanted subcutaneous fat without culturing. We investigated whether the transplantation of human adult ADRCs into skeletal muscle injury models promotes the repair of muscle tissues. This was done by locally injecting human ADRCs into the injured site after the laceration of the nude-rat tibialis anterior muscle. Phosphate-buffered saline (PBS) and bone marrow mononuclear cells (MNCs) were injected as negative control and positive control, respectively. After injury, recovery of the muscle strength was accelerated by the transplantation of ADRCs compared to the administration of PBS or MNCs. Moreover, the transplantation of ADRCs also enhanced angiogenesis and myogenesis, but the number of vascular or muscular cells labeled with the human cell-specific maker was limited in the injury site.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 骨格筋再生 骨格筋損傷 骨格筋萎縮

### 1. 研究開始当初の背景

筋肉、腱、靭帯、骨、軟骨、神経など身体活動を担う器官は「運動器」と呼ばれ、主に整形外科領域で扱う組織である。さらに、これらの組織の形成・維持・修復などには、血管が密接に関係しており、整形外科領域で扱う組織は多彩である。これらの中でも骨、軟骨、神経などの組織における再生治療の研究・臨床は著しい発展を遂げているが、骨格筋の修復・再生に関しては立ち後れていると言わざるを得ない。骨格筋損傷、機能低下に有用な治療法が未確立であることが理由のひとつとして挙げられる。

高齢、疾病などによる長期臥床において筋力低下を来した場合、その機能回復にはリハビリテーションが不可欠である。しかし、原疾患、あるいは他の障害のため思うようにリハビリテーションが進行しないことも少なくない。また、リハビリテーションを進めるに際してもその経済的、環境的、人的負担は計り知れない。近年唱えられている『ロコモティブシンドローム (運動器症候群)』を回避し、健やかな生活を営むためにも筋力の効率的回復に繋がる医療技術の発展は待望久しい。また、機能回復が期待し難いケースにおいても筋肉量の増大は臨床的効果をもたらす。褥瘡形成は骨が体表に突出した部位に好発することが知られている。例えば高齢者の仙骨部は長期臥床、寝返りが不能な症例においては褥瘡が最も発生しやすい部位であるが、この背景に殿筋が廃用により萎縮し、仰臥位でより負担を受けることが挙げられる。同様の機序により、大転子部、脊椎棘突起部等の褥瘡は発生しやすいことが知られている。これらのケースにおいて萎縮した筋の増大する治療が存在すれば褥瘡予防・治療に直結する画期的ツールとなりうる。さらに、スポーツ外傷の中で、『いわゆる肉離れ』に代表される骨格筋損傷は関節捻挫に次いで多い損傷でありながら有効な治療法は確立されているとはいえない。現在、骨格筋損傷の治療は保存療法が一般的であり、治療期間は長く、その間に安静と物理療法、疼痛を伴わない程度の軽い運動療法により加療される。重度の骨格筋損傷において損傷部周囲は癒痕形成のため元の筋力や筋柔軟性には戻りにくく、活動レベルの高い選手ほど休止期間や機能回復という点で大きな影響を受ける。また、軽度損傷においても早期の活動復帰を焦るあまり再発や他器官の合併症に悩まされる例も少なくない。骨格筋損傷から早期かつ確実に復帰する治療法の確立もまた取り組むべき課題と言える。

我々のグループでは、これまでに「血管再生を介した運動器再生」をテーマとして、様々な研究に取り組んできた (Yokota K et al. *Acta Orthop* 2008, Nakasa T, Yokota K et al. *J Biomed Mater Res A* 2008)。さらに最近では、ヒト末梢血由来 CD34/CD133 陽性細胞を用いた組織再生研究を中心に行っ

ている (Nakanishi M, Yokota K et al. *Ann Plast Surg*. 2009)。末梢血中の CD34 陽性細胞は血液幹細胞分画として知られていたが、浅原らがその分画における血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cell; EPC) の存在を 1997 年に *Science* に報告した。さらに CD34 陽性細胞分画中に増殖能、分化能が高く幼弱な細胞集団である CD133 陽性細胞が発見された。申請者らは *in vivo* においてヒト末梢血由来 CD133 陽性細胞を移植することにより骨格筋内の血管再生のみならず骨格筋損傷後の組織再生も促進され、さらに機能的再生に関与していることも確認した (Shi M, Kamei N, Ochi M et al. *Stem Cells* 2009)。CD133 陽性細胞は自家移植が可能であり、倫理上の障壁は高くなく有用な移植ソースとなりうるが、通常末梢血 200 ml から採取可能な細胞数はわずか  $1 \times 10^5$  個程度である。これは先行研究でラット骨格筋損傷モデル 1 匹に投与した細胞数にすぎず、実際の臨床応用に必要な細胞数には遠く及ばない。神戸先端医療センターではバジャー病や閉塞性動脈硬化症などを原因とする下肢虚血の治療として、末梢血由来 CD34 陽性細胞移植を行っており、細胞数の確保のために顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) を連続 5 日間投与した後、10L のアフエレーシスを行うことで、最大約  $1 \times 10^8$  個の CD34 陽性細胞を得ている。しかし、骨格筋損傷や筋萎縮の治療において、G-CSF の投与やアフエレーシスまで行うことは、コストや侵襲の面からあまり現実的ではなく、臨床応用のためには必要細胞数の確保という高いハードルが存在する。そこで、臨床応用に近づくための新たな細胞ソースとして、脂肪組織由来幹細胞に注目した。近年、脂肪組織から骨髄由来間葉系幹細胞や臍帯血由来幹細胞と同様の細胞群の存在が報告されている。本研究で用いる脂肪組織由来幹細胞 (Adipose tissue derived regenerative cell: ADRC) は、特殊な酵素と比重遠心法 (Celution システム, サイトリ・セラピューティクス) で採取するため、培養が不要であり、脂肪組織 100ml から約  $5 \times 10^7$  個の細胞を獲得可能で (1 回に脂肪組織 250ml まで処理可能)、その 70% 以上は CD34 陽性細胞であるとの報告もある。本研究では、Shi らの研究をさらに臨床応用に近づけるべく、CD133 陽性細胞にかわる細胞ソースとして ADRC を使用した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ADRC の投与による骨格筋再生効果とその作用機序を明らかにすることで、ADRC の筋細胞への分化能や血管新生促進能を利用した新たな骨格筋再生治療を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

モデル動物： ヒト由来細胞を用いた異種間の移植実験であるため、免疫応答の面から免

疫不全ラット（ヌードラット）を用いた。ラット骨格筋損傷モデル：前脛骨筋を露出し、筋膜を慎重に剥離し筋腹を露出した。Shiらのモデル(Stem Cells 2009)と同様に筋腹中央を筋線維に直行する向きにメスで切離し(長さ 6mm, 幅 4mm, 深さ 5mm)、これを損傷モデルとした。5-0 ナイロン糸で筋膜を縫合後に ADRC 群では  $1 \times 10^5$  個の ADRC を損傷部へ注入した。コントロール群として、同数のヒト骨髄由来単核球を注入した群 (MNC 群) と PBS を注入した群 (PBS 群) を作製した。

#### 骨格筋損傷モデル



#### 移植後の評価

移植後 1, 4 週に総腓骨神経の電気刺激による前脛骨筋の力学的評価を行った後に、前脛骨筋損傷部の組織を採取し、血管新生、筋再生および移植細胞の生着・分化の評価を行った。

(1) 力学的評価：総腓骨神経に対するパルス周波数 1Hz の電気刺激 (fast twitch) とパルス周波数 50Hz の電気刺激 (tetanus) の 2 種類における前脛骨筋の収縮をトランスデューサーで計測し、その振幅を評価した。

(2) 肉眼的評価：筋損傷部の陥凹を肉眼的評価した。さらに、筋損傷部組織の湿重量を計測した。

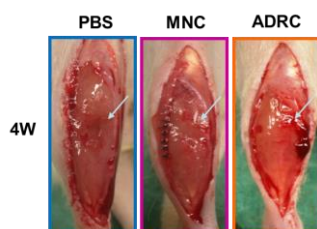
(3) 組織学的評価：筋損傷部組織切片のマッソントリクローム染色を行い、瘢痕組織の面積と再生した筋線維の径を定量的に評価した。

(4) 免疫組織学的評価：筋損傷部組織切片の RECA-1 抗体による免疫染色で、血管密度の計測による血管新生の評価を行った。また、desmin 抗体による免疫染色での desmin 陽性面積の定量により、筋再生を評価した。さらに、抗ヒトミトコンドリア抗体および desmin 抗体もしくは vWF 抗体を用いた二重染色によって、移植細胞の生着と筋芽細胞および血管内皮細胞への分化を評価した。

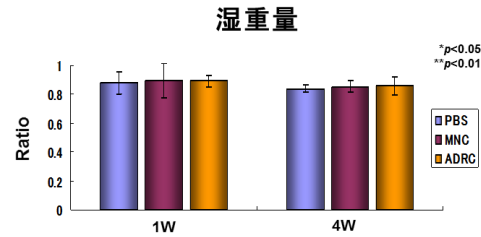
#### 4. 研究成果

##### 肉眼的評価

損傷後 4 週の肉眼的評価において、ADRC 群では PBS 群や MNC 群に比べて損傷部の陥凹が少なく、新生組織で充填されていた。

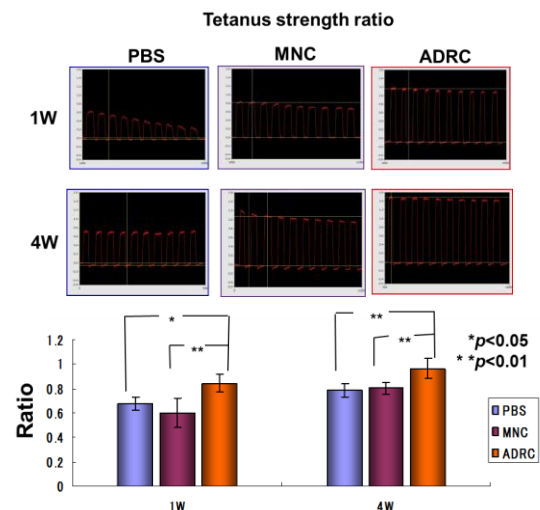
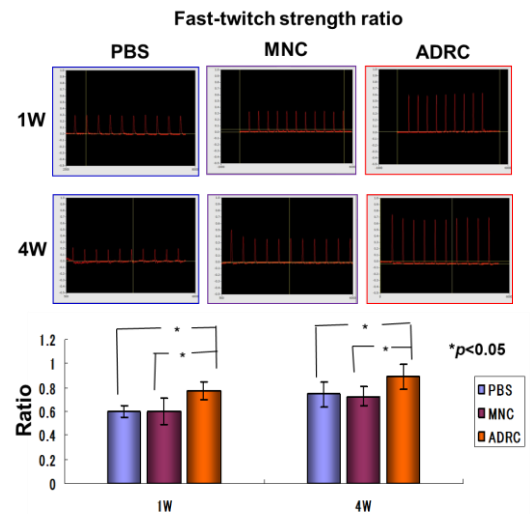


しかし、湿重量では 3 群間に有意差はなかった。



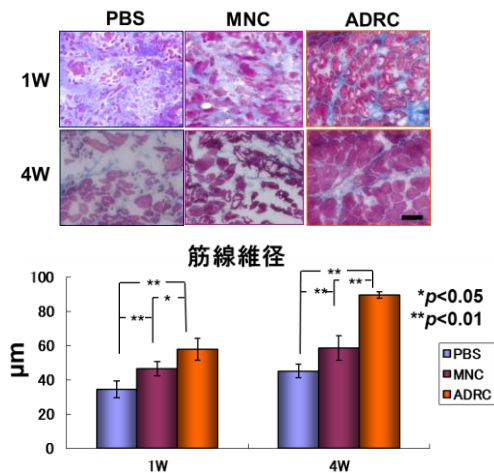
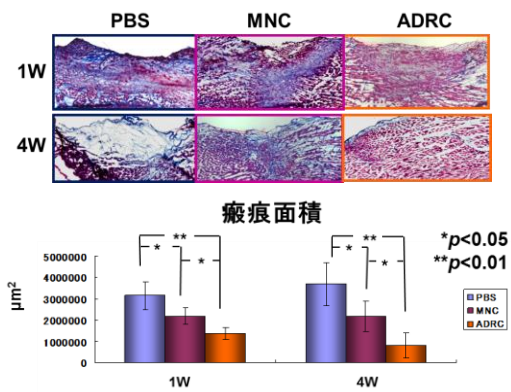
##### 力学的評価

前脛骨筋の筋収縮力の評価では、fast twitch および tetanus のいずれの電気刺激においても損傷後 1 週および 4 週において ADRC 群の筋収縮の振幅が PBS 群や MNC 群に比べて有意に大きかった。



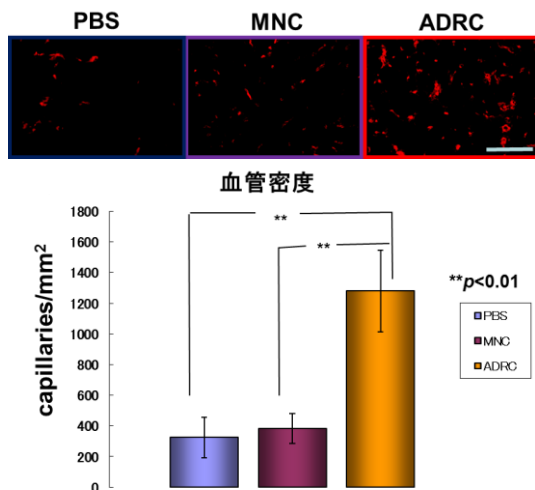
##### マッソントリクローム染色

筋損傷部組織切片のマッソントリクローム染色において、損傷部に形成された瘢痕組織の面積が、損傷後 1 週、4 週ともに ADRC 群において PBS 群や MNC 群に比べて有意に小さかった。また、損傷部における再生筋線維の径は ADRC 群において PBS 群や MNC 群に比べて有意に大きかった。



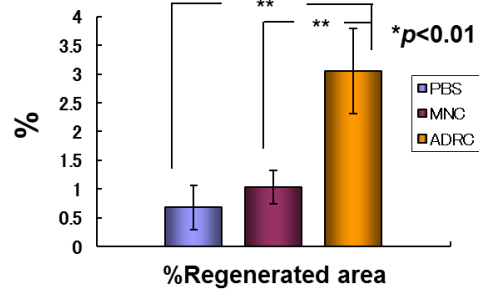
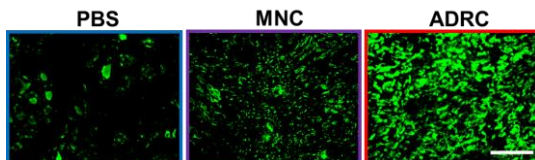
#### 血管新生

RECA-1 免疫染色による血管の評価では、ADRC 群において、PBS 群や MNC 群に比べて有意に損傷部における血管密度が高かった。



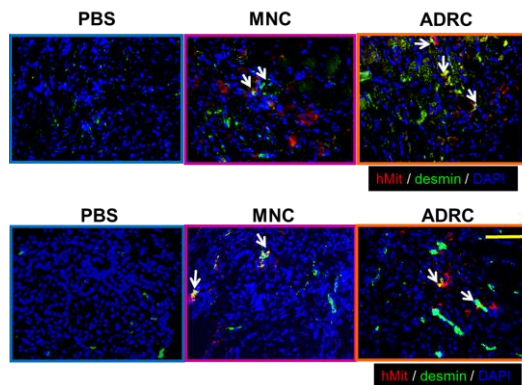
#### 筋再生

Desmin 免疫染色による再生筋の評価では、ADRC 群において、PBS 群や MNC 群に比べて有意に Desmin 陽性の面積 (割合) が大きかった。



#### 移植細胞の生着・分化

筋損傷部切片のヒト特異的ミトコンドリア抗体 (hMit) および desmin もしくは vWF を用いた二重染色において、hMit および desmin のいずれにも陽性となる細胞や hMit および vWF のいずれにも陽性となる細胞を認め、移植したヒト ADRC が損傷部に生着して、筋芽細胞や血管内皮細胞へと分化していることが示唆された。しかし、これらの細胞は再生筋の面積に比べると非常に少ない数であった。



#### 考察

ADRC 移植によって、筋損傷部における血管新生と筋再生が促進され、良好な筋修復と癒痕組織形成の縮小が認められた。移植細胞の一部は損傷部へ生着し、筋芽細胞や血管内皮細胞へと分化していることが示唆されたが、その数は非常に少なく、筋修復促進に対する主要な作用機序とは考えられないことから、移植細胞由来の液性因子によるパラクライン効果が主に筋修復促進に寄与したのではないかと推測された。

#### 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 2 件)

- ① Ryo Mori, Naosuke Kamei, Shingo Okawa, Akihiro Nakabayashi, Kazunori Yokota, Yukihiro Higashi, Mitsuo Ochi. Promotion of skeletal muscle repair in rat skeletal muscle injury model by local injection of human adipose tissue-derived regenerative cells.

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. in press, doi: 10.1002/term.1659

- ② 亀井直輔, 中佐智幸, 越智光夫. 【整形外科領域と再生医療】骨格筋・腱・靭帯再生 骨格筋損傷に対する新規治療開発. Pharma Medica. 査読無 31, 2013, 51-55 DOI 無

[学会発表] (計 6 件)

- ① 亀井直輔, 石川正和, 大川新吾, 中林昭裕, 森亮, 越智光夫. 組織幹細胞による損傷骨格筋の再生. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013/10/1~2013/10/18. 幕張メッセ (千葉市)
- ② 亀井直輔, 中林昭裕, 森亮, 越智光夫. 間葉系幹細胞による骨格筋再生. 第 34 回日本炎症・再生医学会. 2013/7/2~2013/7/3. 国立京都国際会館 (京都市)
- ③ 亀井直輔. 第 3 回武庫川女子大学健康運動科学研究所シンポジウム・再生細胞医療の現状. 2013/6/29. 武庫川女子大学日下記念マルチメディア館 (西宮市)
- ④ 亀井直輔, 石川正和, 中佐智幸, 大川新吾, 森亮, 味八木茂, 越智光夫. 骨格筋損傷に対する新たな治療開発. 第 86 回日本整形外科学会学術総会. 2013/5/23~2013/5/26. 広島グリーンアリーナ他 (広島市)
- ⑤ Ryo Mori, Naosuke Kamei, Shingo Ohkawa, Akihiro Nakabayashi, Kazunori Yokota, Yukihito Higashi, Mitsuo Ochi. Promotion of skeletal muscle repair in rat skeletal muscle injury model by local injection of human adipose tissue-derived regenerative cells. 2013 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2013/1/26 ~ 2013/1/29. Henry B. Gonzalez Convention Center (San Antonio, TX, USA)
- ⑥ 森亮, 亀井直輔, 大川新吾, 中林昭裕, 横田和典, 越智光夫. ヒト脂肪組織由来再生細胞移植を用いた骨格筋再生効果. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012/10/26~2012/10/27. 名古屋国際会議場 (名古屋市)

[図書] (計 1 件)

- ① 亀井直輔 (分担執筆). 朝倉書店. 再生医療叢書 6 骨格系 (11 骨格筋の再生). 2012. 181 ページ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横田 和典 (YOKOTA KAZUNORI)

広島大学・病院・教授

研究者番号 : 2 0 4 0 3 5 2 9

### (2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号 : 7 0 1 7 7 2 4 4

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号 : 7 0 4 4 4 6 8 5