

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591994

研究課題名（和文）皮下脂肪由来再生細胞の血管再生治療臨床応用に向けた基本的情報の検討

研究課題名（英文）Investigation of fundamental information of angiogenic therapy using adipose-derived regenerative cell.

研究代表者

山本康孝（YASUTAKA YAMAMOTO）

鳥取大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：20362882

研究成果の概要（和文）：皮下脂肪細胞はマウスモデルにおいて血管再生法の細胞として有効であることを証明した。また、老化、糖尿病の状態においては、血管再生能が低下する可能性が示唆されたが、高血圧においては明らかではなかった。今後のさらなる検討の重要な基礎的情報が得られた。

研究成果の概要（英文）：Adipose-derived regenerative cell (ADRC) have been proved effective for angiogenic therapy in mice hind-limb ischemic model. Under condition of diabetes mellitus and aging, angiogenic efficacy has been diminished, however it is not observed under hypertensive condition. Useful information was brought by our investigation for future research.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：形成外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医療、脂肪細胞、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症の末梢病変では、従来の治療法が奏功しない重症患者が下肢切断を余儀なくされている。下肢切断回避法として骨髄細胞を用いた血管再生療法が本邦で2000年より開始され、有効性・安全性が報告されているが、従来の骨髄細胞に比し、皮下脂肪細胞は容易に安全に採取でき、繰り返し採取可能なことから次世代の再生医療の有力な細胞供給源として期待される。

従来の自己骨髄細胞を用いた血管再生治療は侵襲が大きく、施行に様々な障害を伴う。皮下脂肪細胞は容易に安全に採取でき、繰り返し採取可能なことから次世代の再生医療の有力な細胞供給源として期待されるが、その有効性・細胞の性質について詳細な検討はなされていない。本研究において、培養を行わない皮下脂肪細胞由来再生細胞(ADRC)の血管新生能を従来の方法と比較し、有効性を評価すると共に、細胞の性質（表現型・因子分泌能力）を検討することにより、臨床応用におけるADRCの有効性・

2. 研究の目的

治療条件設定を確立することを目的とする。また、動物由来の ADRC のみならず、ヒト ADRC の血管再生能力・特徴も同様に評価する。

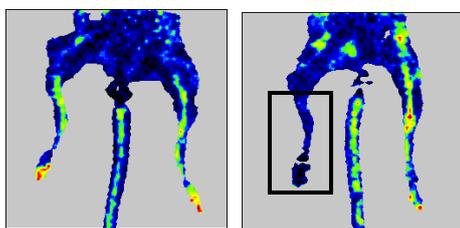
3. 研究の方法

皮下脂肪組織由来再生細胞(ADRC)の血管再生能力をマウス下肢虚血モデルにて検討する。ラット ADRC を用いて従来の細胞ソースである骨髓単核球細胞との比較を行い、治療に必要な細胞数の決定を行う。血管再生に関与すると考えられる血管増殖因子・炎症性サイトカイン・低酸素への抵抗性・血管細胞への分化能・細胞表面マーカーも評価することにより、血管再生のメカニズムを明らかにする。次に、ヒト ADRC が決定された治療必要細胞数によりマウス下肢虚血モデルの血流を改選することが可能か、またメカニズムは同様かを評価する。次に従来の骨髓細胞で知られている、冠血管危険因子保有に伴う血管再生能の低下が ADRC においても生じうるのかを高血圧・糖尿病・加齢・肥満(インスリン抵抗性)ラットモデル由来の ADRC を用いて比較検討する。

(マウス下肢虚血モデル)

全身麻酔下にマウス右下肢大腿動脈を結紮し、下肢虚血モデルを作成する(下図参照)。骨髓細胞はマウス大腿・下腿の骨髓細胞を採取し、単核球分画を比重遠心法にて分離回収する。0, 1, 2, 3, 4 週後に左右下肢のドップラー強度を測定し血流の回復を評価する。4 週間後にはマウスを sacrifice し、虚血筋肉の凍結切片を作成し、CD31 染色にて免疫組織染色を施行し、毛細血管数を評価する。

図：マウス下肢虚血モデル



非虚血

虚血下肢

(リスクファクター存在下での ADRC の有効性)

ラットにおいて、高血圧・肥満・老化・糖尿病(耐糖能障害)モデルを作成し、それぞれ ADRC の回収数・性質・血管新生能を評価する。

高血圧モデル：アンギオテンシン II を浸

透圧ミニポンプ (Alzet 社) を用いて 4~8 週間持続投与するモデル、一酸化窒素阻害薬 (L-NAME) を飲水に溶解し持続投与するモデル、の 2 種類の高血圧モデルを作成する。

肥満モデル：高脂肪食負荷にて肥満を誘導する。このモデルにおいてはインスリン抵抗性が生じ、脂肪細胞に炎症細胞の浸潤が多く見られることが知られている。

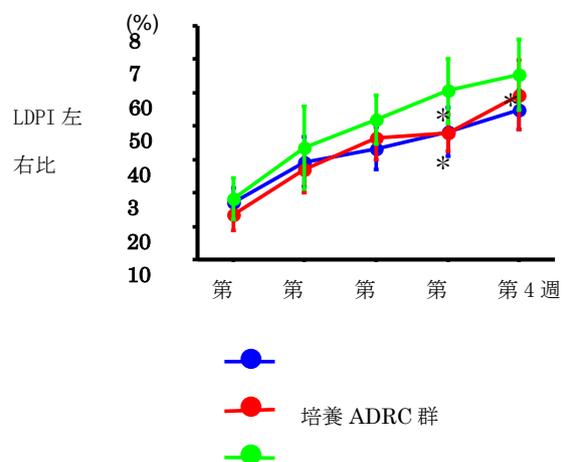
老化モデル：通常飼育にて、12~18 ヶ月齢まで加齢させる。(飼育は平成 22 年度から開始)

糖尿病モデル：ストレプトゾトシン投与による糖尿病モデルを作成。耐糖能異常が生じてから 4~8 週間維持する。

上記の各モデルにおいて、体重・血圧・皮下脂肪の重量・得られる ADRC 数を評価する。平成 22 年度の血管再生能の検討と同様の項目(血管増殖因子・炎症性サイトカイン・細胞表面マーカー解析)を評価する。また、ADRC をヌードマウス下肢虚血モデルに移植することにより ADRC の有効性も確認する。

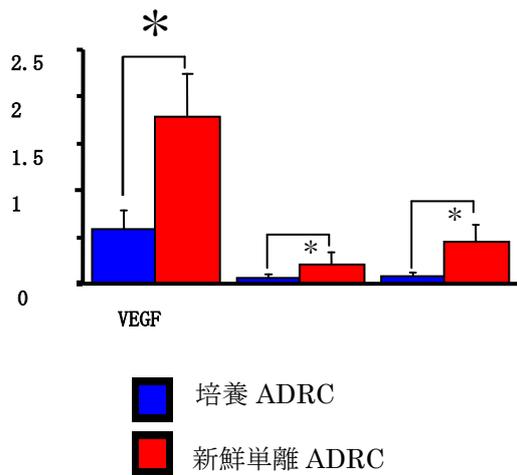
4. 研究成果

骨髓単核球細胞と ADRC は同等の血管新生能を有し、freshly isolated-ADRC と cultured ADRC では前者のほうが有効性が高かった。

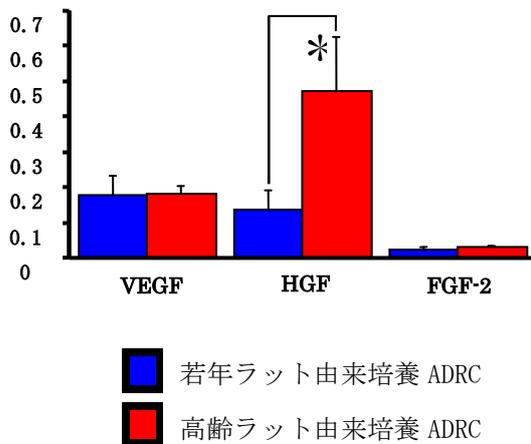


血管再生のメカニズムは従来と同様にサイトカイン分泌であり、特に VEGF が多く分泌されていた。HGF と FGF-2 も同様に有意差を認めた。

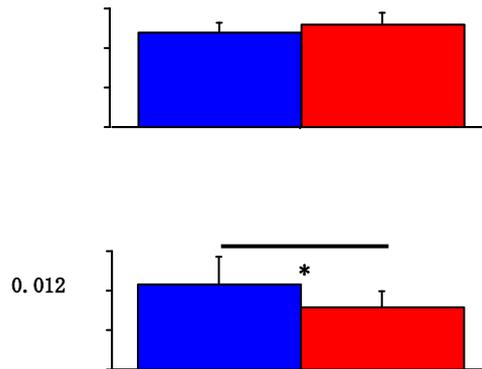
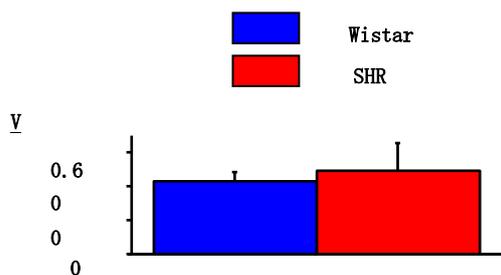
老化においては、血管再生能が低下する可能性が示唆されたが、HGF ではむしろ増加傾向を示した。高血圧においては明らかではなかった。



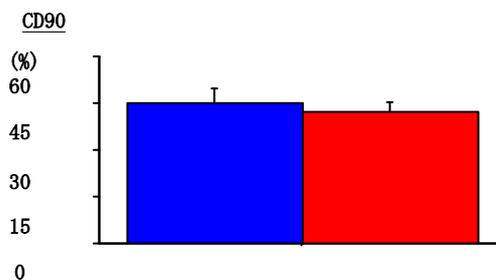
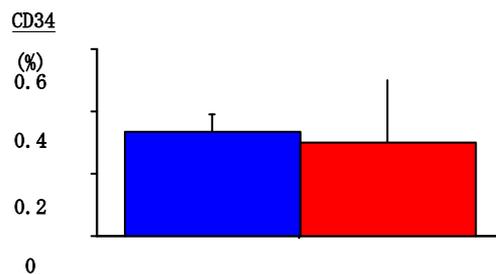
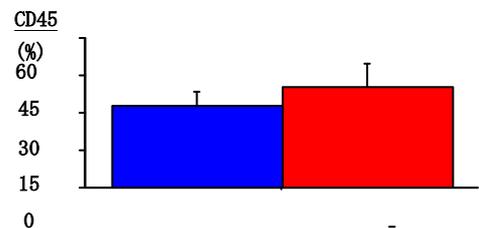
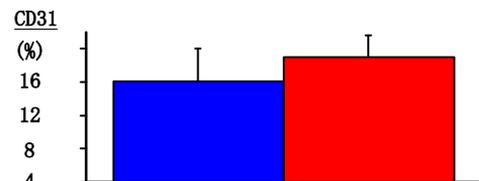
若年ラット由来及び高齢ラット由来培養 ADRC について比較したところ、VEGF と FGF-2 については有意な差は見られなかった。また HGF については若年ラット由来培養 ADRC に比べ高齢ラット由来培養 ADRC で有意な発現が認められた。(共に n=3、* < 0.01)



高血圧による影響を評価するために、Wistar Rat と SHR の ADRC を比較したが、増殖因子の産生には有意差が見られなかった。



高血圧による影響を評価するために、Wistar Rat と SHR の ADRC を細胞のプロフィールを比較したが有意差が見られなかった。



肥満モデル、糖尿病モデルは作成を試みたが、皮下脂肪の採取ならびに分離が極めて困難（細胞が採取できない、脂肪の線維化が強く細胞分離が困難）であり、細胞の検討は不可能であった。高血圧モデルは血圧維持期間が長期で困難であり、自然発症 SHR ラットでの検討とした。

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 1 件）

Harada Y, Yamamoto Y, Tsujimoto S, Matsugami H, Yoshida A, Hisatome I. Transplantation of freshly isolated adipose tissue-derived regenerative cells enhances angiogenesis in a murine model of hind limb ischemia. 査読あり、Biomed Res. 2013;34:23-29.

〔学会発表〕（計 1 件）

山本康孝, 新鮮単離状態の脂肪組織由来再生細胞移植による血行改善効果の検討, 第 12 回日本再生医療学会, 2013 年 3 月 23 日, パシフィコ横浜（神奈川）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本康孝 (YASUTAKA YAMAMOTO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：20362882

(2) 研究分担者

久留一郎 (HISATOME ICHIRO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60211504

(3) 連携研究者

()

研究者番号：