

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390190

研究課題名(和文)高齢者難治性疾患に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の確立

研究課題名(英文)Development of cell-based therapy using dedifferentiated fat cells for treatment of intractable diseases 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞(DFAT)を高齢者に好発する種々の疾患モデル動物に移植し、その治療効果と安全性を検証した。ウサギおよびブタ下肢虚血モデルに自家DFATを移植したところ、虚血部位の有意な血流改善と血管密度の増加が認められた。ウサギ骨欠損モデルや卵巣摘出による骨粗鬆症モデルにおいて、自家DFAT移植は高い骨再生効果を示した。これらの動物実験においてDFAT移植による腫瘍形成や異常分化の所見は認められなかった。DFAT細胞治療は、高齢者難治性疾患に対する有効で安全な治療法となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the therapeutic effect and safety of dedifferentiated fat (DFAT) cell transplantation in animal models of diseases, mainly occur in elderly people. Autologous implantation of DFAT cells significantly improved blood flow and vascular density in a rabbit and a porcine model of hind limb ischemia. Autologous DFAT cell transplantation also contributed to bone regeneration in a rabbit bone defect model and an ovariectomy-induced osteoporosis model. Tumor formation or abnormal cell differentiation was not observed in any animal that received DFAT cell transplantation. These results suggest that DFAT cell transplantation is a safe and useful strategy for treatment of intractable diseases in elderly patients.

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

1. 研究開始当初の背景

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。我々の研究グループでは皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養し、脱分化させることにより、高い増殖能と間葉系幹細胞 (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) を調製する方法を確立した。現在までに、計 35 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、DFAT を調製し、その特性解析を行ってきた。その結果、(1)約 1g の皮下脂肪組織から全例において DFAT が調製できること、(2)調製した細胞は、異種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)採取した患者の年齢に関係なく高い分化度を示す骨、軟骨を誘導できることなどを明らかにしている (Matsumoto T, Kano K et al. J Cell Physiol, 2007)。現在、再生医療用細胞ソースとして主流となっている骨髄 MSC や脂肪組織由来幹細胞 (ASC) は、(1)高齢者など採取不能な症例が存在する。(2)雑多な細胞集団を付着培養するため、異種細胞の混入が避けられない。(3)微量な細胞分画を増幅させるため、ある程度の組織採取量が必要となる。といった問題がある。これに対して DFAT は、ドナー年齢に関係なく、高純度な細胞を少量の皮下脂肪組織から大量調製できることから、MSC や ASC と比べても、細胞治療用細胞ソースとして優れていると考えられる。特に高齢者や全身状態不良の患者など、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

本研究では、これまで DFAT 細胞治療の臨床応用に向けて蓄積してきた基礎研究成果をさらに発展させ、ウサギやブタなどの動物疾患モデルを用いた DFAT 細胞治療の前臨床試験を行い、その効果と安全性を検証する。そして難治性下肢虚血や骨粗鬆症に伴う難治性骨折などを対象疾患とした DFAT 移植の臨床応用を目指す。またこれらの疾患以外にも、椎間板変性症、腹圧性尿失禁などの高齢者に好発する難治性疾患に対して、DFAT を用いた細胞治療が有効か明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ウサギ下肢虚血モデルに対する治療効果の検討

日本白色家兎の大腿動脈を結紮・切除し、下肢虚血モデルを作成した。1週間後に同一個体の皮下脂肪組織から調製した DFAT (1×10^6) を虚血部位に筋注した (DFAT 群、 $n=7$)。そして生理食塩水 (Control 群、 $n=8$)、末梢血単核球 (PBMC 群、 $n=6$)、線維芽細胞 (Fibroblast 群、 $n=7$) を筋注した群と血流改善の程度をド

ップラー血流計にて経時的に比較検討した。また虚血筋組織の血管密度を免疫組織学的に定量し、群間比較を行った。さらに肉眼的、組織学的に移植細胞による腫瘍形成や異常分化などの有害事象の有無を検討した。

(2)ウサギ骨欠損モデルに対する治療効果の検討

日本白色家兎の脛骨に、 $1 \times 1 \text{cm}$ の骨欠損を作成した。そして事前に調製した自家 DFAT・人工骨基質 (β TCP・コラーゲンスポンジ) 複合体を欠損部に移植した。対側の頸骨にも同様の欠損を作成し、人工骨基質のみを移植した。1ヶ月後、2ヶ月後に、安楽死させ、脛骨を摘出し、三点曲げ試験による骨強度の測定、マイクロ CT による骨構造解析、骨密度の定量、組織学的検討を行い DFAT 移植の効果を検証した。さらに組織学的に移植細胞による腫瘍形成などの異常所見がないか検討した。

(3)ウサギ骨粗鬆症モデルに対する治療効果の検討

雌性日本白色家兎 ($n=20$) の両側卵巣を摘出し、骨粗鬆症を誘導した。5ヶ月以後に二重エネルギー X 線吸収法により両側大腿骨の骨密度を測定し、骨密度低下を確認した。この骨粗鬆症モデルウサギの片側大腿骨に事前に皮下脂肪組織から調製した自家 DFAT を骨髄内投与した (DFAT 肢)。対側大腿骨には生理食塩水を投与した (Control 肢)。1ヶ月後に二重エネルギー X 線吸収法により両側大腿骨の骨密度を測定した。さらに両側大腿骨を摘出し、マイクロ CT による骨構造解析や骨密度測定を行い DFAT の移植効果を評価した。

(4)ブタ下肢虚血モデルに対する治療効果の検討

ブタ両下肢大腿動脈を 5 cm にわたり結紮切除し、下肢虚血モデルを作成した ($n=11$)。片側の虚血筋組織に同一個体の皮下脂肪組織から調製した DFAT (1×10^7) を移植した (DFAT 肢)。経時的に経皮酸素分圧を測定し、血流改善の程度を対側 Control 肢と比較検討した。また移植 4 週間後に、虚血筋組織の組織切片を作成し、血管密度を免疫組織学的に定量評価した。

(5)椎間板髄核細胞に対する効果

日本白色家兎の脊椎椎間板より採取培養した髄核細胞とウサギ DFAT とをトランスウェルを介した共培養を行った。培養 2、4、7 日目に髄核細胞および DFAT を回収し、細胞数を計測し、増殖能を評価した。また培養 10 日目の各細胞の RNA を抽出し、髄核細胞マーカー (aggrecan, versican, collagen type I, collagen type II など) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて比較検討した。

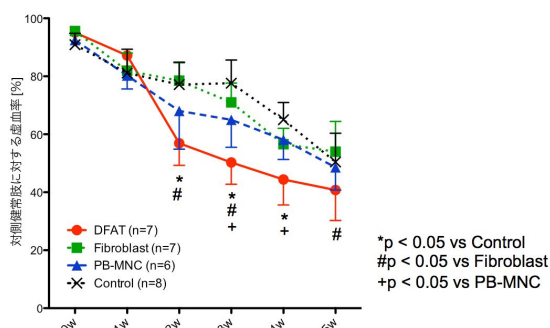
(6)ラット腹圧性尿失禁モデルに対する治療効果

ラットに膹拡張術と両側卵巣摘出を行い、持続的腹圧性尿失禁モデルを作成した。このモデルの尿道周囲の結合組織に DFAT (1×10^6) (DFAT 群, $n=7$)、または線維芽細胞 (1×10^6) (Control 群, $n=7$) を移植し、その治療効果を比較検討した。腹圧性尿失禁の治療効果は、leak point pressure (LPP) の測定および尿道括約筋の菲薄化の程度を免疫組織学的に定量評価した。

研究成果

(1) ウサギ下肢虚血モデルに対する治療効果の検討

ウサギ下肢虚血モデルを作成し、1週間後に自家DFAT (DFAT群)、末梢血単核球 (PB-MNC群)、線維芽細胞 (Fibroblast群)、または生理食塩水 (Control群) を虚血部位に筋注し、血流改善の程度を比較検討した。その結果、DFAT群はControl群と比較して移植後1-3週目において有意な血流増加を認めた (図1)。DFAT群はFibroblast群やPB-MNC群と比較しても、有意な血流増加を認めた。またDFAT移植部位における細胞の腫瘍性増殖や、異所性骨分化などの有害作用は全く認められなかった。以上の結果より、虚血部位へのDFAT移植は高い血流改善効果を示し、移植安全性も高いことが明



らかになった。

図1 .DFAT移植による血流改善効果

(2) ウサギ骨欠損モデルに対する治療効果の検討

ウサギ両側脛骨欠損を作成後、片側欠損部に自家DFAT・人工骨基質複合体 (DFAT 肢)、対側欠損部に人工骨基質のみ (Control 肢) を移植した。移植4週間後にDFAT移植の骨再生効果を検討した。その結果、Control肢に比べDFAT肢では、有意に単位骨量 (BV/TV)、骨梁数 (Tb, N) の増加と骨梁間隔 (Tb, Sp) の減少が認められた。また3点曲げ試験では、Control肢に比べDFAT肢では、最大点荷重 (N)、仕事量 (N・mm) の有意な増加が認められた。DFAT移植部位に腫瘍形成などの異常所見は認めなかった。以上の結果より、自家DFAT移植による高い骨再生能と移植安全性が確認できた。

(3) ウサギ骨粗鬆症モデルに対する治療効果の検討

ウサギに両側卵巣摘出による閉経性骨粗鬆症を誘導後、片側大腿骨にDFATを骨髄内投与し

1ヶ月後に骨密度などに対する影響を評価した。その結果、DFAT移植肢は対側Control肢に比べ、海面骨密度の有意な増加が認められた。移植したDFATの一部は骨内に生着し、骨芽細胞マーカーであるオステオカルシンを発現していた。以上の結果より、骨粗鬆症モデル動物に対するDFAT骨髄内投与は、骨再生に寄与し、骨密度改善効果があることが明らかになった。

(4) ブタ下肢虚血モデルに対する治療効果の検討

ブタ下肢虚血モデルに対し、片側虚血筋組織に自家DFATを移植し (DFAT肢)、対側のControl肢と血流改善効果を比較した。その結果、Control肢に比べDFAT肢では、移植1週、2週目の経皮酸素分圧が有意に高値を示した。血管造影検査では、DFAT肢で側副血行路がより発達している所見が認められた。組織学的検討では、DFAT肢ではControl肢に比べ平滑筋細胞を伴う血管数が有意に増加していた。また肉眼的、組織学的検討において自家DFAT移植における腫瘍形成、異常分化などの有害事象は認められなかった。以上の結果より、ブタ下肢虚血に対する自家DFAT移植は、有効で安全に実施できることが確認できた。

(5) 椎間板髄核細胞に対する効果

ウサギ椎間板より単離培養した髄核細胞とウサギDFATとの共培養を行い、髄核細胞の増殖能やそれぞれの細胞の形質変化を評価した。その結果、DFATと共培養した髄核細胞は、共培養しない髄核細胞に比べ、増殖活性が有意に高くなることが明らかになった。遺伝子発現解析では、髄核細胞と共培養したDFATは、共培養しないDFATに比べ、各種髄核細胞マーカー遺伝子 (aggrecan, versican, collagen type I, collagen type II) の発現が有意に増加していた。上記結果より、髄核細胞とDFATの共培養により、髄核細胞の細胞増殖能が高まり、一方、DFATは髄核様細胞への分化指向性が高まることが明らかとなった。

(6) 腹圧性尿失禁に対する効果:

ラット持続的腹圧性尿失禁モデルの尿道周囲の結合組織にDFAT (DFAT群)、または線維芽細胞 (Control群) を移植し、その治療効果を比較検討した。その結果、DFAT群では、Control群に比べ、移植6週間後のLeak point pressureが有意に増加し、組織学的にも尿道平滑筋や尿道横紋筋の菲薄化が有意に抑制された。以上の結果より尿道括約筋障害に伴う腹圧性尿失禁に対するDFAT移植の有効性が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

Kono S, Kano K, Matsumoto T et al. Phenotypic and functional properties of feline

dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells. The Veterinary Journal 査読有 89:88-96, 2014

DOI 10.1016/j.tvjl.2013.10.033

Kikuta S, Tanaka N, Kano K, Matsumoto T et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. Tissue Engineering Part A 査読有 19:1792-1802, 2013

DOI: 10.1089/ten.TEA.2012.0380

Obinata D, Kano K, Matsumoto T, et al. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model. International Journal of Urology 査読有 18:827-834, 2011

DOI: 10.1111/j.1442-2042.2011.02865.x

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

野呂 知加子 (NORO Chikako)
日本大学・生産工学部・教授
研究者番号：80311356

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

〔学会発表〕(計72件)

松本太郎：脱分化脂肪細胞を用いた神経再生の可能性 第62回東日本整形災害外科学会 2013年9月20日 軽井沢

松本太郎：幹細胞に関する最近の知見と新しい再生医療用細胞ソースの開発 第35回日本呼吸器内視鏡学会学術集会 2012年5月31日 東京

松本太郎、上野高浩：骨欠損および骨粗鬆症モデルウサギに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)自家移植の骨形成効果 第54回日本老年医学会学術集会・総会 2012年6月30日 東京

松本太郎：脱分化脂肪細胞(DFAT)の特性と再生医療への応用 第268回日本形成外科学会東京地方会 2011年12月3日 東京

〔図書〕(計4件)

松本太郎、風間智彦：技術情報協会 再生医療における臨床研究と製品開発 2013年 181-187

松本太郎：医歯薬出版株式会社 医学のあゆみ (脂肪由来幹細胞の臨床応用への展開) 2012年 326-331

松本太郎：レスピレーションリサーチフアンデーション 呼吸(脱分化脂肪細胞を細胞源とする再生医療)2011年 6

〔その他〕

ホームページ等

www.med.nihon-u.ac.jp/department/saisei/index.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