

# 論文の内容の要旨

論文題目 脂肪由来幹細胞の characterization と組織増大治療への応用

指導教員 光嶋 勲 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 松本大輔

## 1. はじめに

近年の再生医療の進歩は目覚しく、血管新生、心筋再生、骨再生や軟骨再生など様々な分野でまさに現実のものとなりつつある。脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stromal or stem cell、以下 ASC) は、培養せずに臨床応用が可能な程度の豊富な細胞数、簡便・非侵襲的な採取法、高い増殖能、そして脂肪・骨・軟骨・筋・心筋・神経・血管内皮など胚を越えた多岐にわたる分化能をもっているという点で骨髄に代わる新たな幹細胞源として注目を集めている。一方、脂肪組織は、移植材料（脂肪注入術）として古くから用いられ、その施術数は近年増加の一途を辿っているが、生着率の低さや石灰化など未だに解決されない問題点がある。本研究では、前半にて脂肪組織から採取できる幹細胞を含んだ細胞群の組成や特長などについて調べ、後半では、この細胞群を利用して脂肪移植の問題点の解決を試みた動物実験の結果を報告する。

## 2. 脂肪由来幹細胞の characterization

### 2.1 研究の背景と目的

脂肪組織を酵素処理して得られる細胞分画 (Stromal vascular fraction=SVF) には、胚を越えた多分化能を持つ ASC が含まれている。ASC は脂肪吸引物から細胞治療に十分な細胞数を新鮮な状態で得ることができるため既に多くの臨床研究で用いられているが、SVF の正確な組成は不明であった。

## 2.2 方法

脂肪吸引物中の脂肪層、液体層の双方を ASC の採取源として評価するとともに、各々から採取された細胞群を新鮮な状態および培養後にその特長を調べた。更に、SVF の組成を詳細に調べ、培養 ASC に発現する種々の表面抗原の中で培養 BM-MSC (骨髓由来間葉系幹細胞)には発現のない CD34 に着目しその発現の経時的变化を調べた。また、CD34 陽性 ASC と CD34 陰性 ASC を FACS にてソーティングし、増殖能、間葉系分化能、血管形成能 (Matrigel assay)、血管関連遺伝子発現 (realtime RT-PCR および FACS) の相違について検証した。

## 2.3 結果

脂肪吸引物の脂肪層および液体層には割合こそ異なるものの ASC と同等の character を持つ細胞群が含まれていた。ASC を含むヘテロな細胞集団である SVF の組成についてマルチカラーFACS を用いて調べると、ASC は脂肪組織由来細胞の 70%以上を占めていた。その他の集団としては、血管内皮細胞ないし血管内皮前駆細胞から成る集団、血管周皮細胞あるいはその前駆細胞とも考えられる集団、線維芽細胞などと考えられる集団などが見られた。培養 ASC と培養 BM-MSC の表面抗原を比較すると、培養 ASC にのみ CD34 の発現が見られた。CD34 陽性 ASC と CD34 陰性 ASC を比較すると、増殖速度は CD34 陽性 ASC が高く、脂肪・骨への分化能は CD34 陰性 ASC が高く、血管形成能には有意差が見られなかった。Real time RT-PCR を用いた血管関連遺伝子発現の比較では、VEGF、HGF といった血管新生誘導因子の分泌能においては、CD34 陽性 ASC と CD34 陰性 ASC の間で有意差が見られなかったが、Flk-1 に関しては、CD34 陽性 ASC で CD34 陰性 ASC の約 30 倍の発現が見られた。これを FACS で確認したところ、混入した血管内皮細胞以外にも CD34 陽性 ASC の一部に Flk-1 の発現があることが確認された。

## 2.4 考察

脂肪吸引物から ASC を採取する際は、従来、浮遊する脂肪層のみを処理していたが、我々は、下層の廃液層からも一定量の ASC を含む細胞群を回収できることを発見した。術中の機械的な傷害あるいは術中・術後に放出される内因性の酵素により、ASC が脂肪組織から遊離したものと考えられた。脂肪組織が骨髓に代わる幹細胞採取源として注目される理由の 1 つに、低侵襲で多くの細胞数を確保することができ、細胞培養をすることなく臨床応用が可能である点が挙げられ、臨床応用を考える際に SVF の組成・性質を調べることは大きな意義がある。我々がマルチカラーFACS にて SVF を分析した結果、新鮮 ASC は CD31-CD34+CD45-CD90+CD105-CD146- といった表面抗原発現を示す集団であった。その他の集団としては、CD34+と CD34-の双方の中の、CD146+および CD146-の各々の細胞集団の存在が注目すべき点で、CD31-CD34-CD146+ 細胞が血管周皮細胞、CD31-CD34+CD146+細胞がその前駆細胞的性質を持った細胞と想定できる。培養 ASC と培養 BM-MSC の表面抗原発現の違いについては、CD34 の発現の有無がその大きな違いだが、ASC においては継続的に培養することにより CD34 の発現が低下もしくは消失してい

く。ASC は CD34 の発現を失うことにより増殖速度は低下するものの、脂肪・骨といった間葉系への分化能はむしろ高くなるといった結果を得た。造血系細胞においては、CD34 が分化の抑制の機能を持つとの報告[Fackler et al., 1995]があり、ASCにおいても CD34 が分化を抑制することで stemness を維持している可能性が示唆される。ASC の血管新生治療への応用を考えると、CD34 陰性 ASC も CD34 陽性 ASC と同程度の血管形成能や VEGF、HGF の分泌能を持つことは、長期培養後の ASC でも血管新生治療に有用な可能性を示唆する結果と考えられる。CD34 陽性 ASC と CD34 陰性 ASC の血管関連遺伝子発現の比較で、唯一大きな違いの見られた Flk-1 は、血管芽細胞など血管系の幹細胞～前駆細胞の最も初期に発現が見られることが知られ、この Flk-1 の発現が血管幹細胞的性質、すなわち血管内皮細胞と血管壁細胞の双方への分化能と相関があるのではないかといつた仮説も考えられる。細胞治療に理想的な条件を兼ね備えた ASC は今後も様々な分野で臨床応用が進むことが予想され、本研究結果が、ASC の臨床応用の一助となれば幸いである。

### 3. Cell-assisted lipotransfer (CAL): ASC の組織増大治療への応用

#### 3.1 研究の背景と目的

脂肪注入術は、生着率の低さや石灰化など未だに解決されない問題があるが、軟部組織を増大させる方法として、ほとんど傷痕を残すことなく、また異物（人工物）に伴う合併症もないという唯一の方法であり、有効性と安全性が確立されれば、美容形成および再建外科領域における軟部組織増大術の手段として第一選択となることが期待される。

#### 3.2 方法

吸引脂肪と切除脂肪を光学顕微鏡あるいは走査電顕にて比較、また、各々から採取できる ASC 数の比較を行った。次に、ASC を補助的に利用した脂肪移植（ASC を別途採取した脂肪から単離し、吸引脂肪組織を scaffold として添加、接着させて移植する方法）が、上記脂肪注入の問題点を解決する一手法となり得るのではないかと考え、cell-assisted lipotransfer (CAL) と命名し、マウスやラットを用いた動物実験にてその有効性を評価し、移植後の ASC の動態も追跡した。

#### 3.3 結果

光顕像および電顕像では、吸引脂肪は切除脂肪と同様に脂肪組織の基本的な構築は保たれているが、中等度以上の口径を持つ血管構造がほとんど見られなかった。採取 ASC 数の比較では、吸引脂肪からの採取 ASC 数は、切除脂肪からの採取 ASC 数の約 57%（平均）であった。次に、ヒト吸引脂肪組織に SVF を添加、接着させて SCID (Severe Combined Immune Deficiency) マウスに移植 (CAL) したところ、SVF を添加していない脂肪 (non-CAL) よりも 3 割程度生着率が高かった。移植脂肪の光顕像では、CAL fat の方が生着した脂肪層が厚く、毛細血管の増生が顕著であった。SVF を蛍光色素 DiI でラベルし、吸引脂肪に添加して SCID マウスに移植すると、DiI ラベルされた ASC の成熟脂肪細胞間や結合組織内の生着が観察された。免疫染色の結果では、DiI と vWF (von Willebrand

Factor)の両方が陽性の ASC も観察され、血管内皮細胞への分化が示唆された。また、GFP (Green Fluorescent Protein) ラットの SVF を採取し、同系の SD ラットの破碎脂肪組織に添加して移植した実験でも、移植脂肪内の一部の血管に vWF と GFP の両方が陽性の所見が見られ、ASC の一部は血管内皮細胞として新生血管の構築に寄与していることが示唆された。

### 3.4 考察

吸引脂肪組織は切除脂肪組織に比べて ASC の数が少ない。組織学的評価では、吸引脂肪には中等度以上の口径の血管がほとんど見られなかった。脂肪吸引後の吸引部位には、血管や神経の穿通枝を含む蜂巣状の構造が残っていることが知られており、ここに ASC が残存していると考えられる。また、我々は前半にて、脂肪吸引物下層の液体層からも ASC が採取できることを示したが、これも吸引脂肪において ASC の数が少ない一因であろう。本研究では、吸引脂肪組織に ASC を添加し接着させて移植に用いることで脂肪移植の有効性が向上するとの結果を得た。そのメカニズムは①ASC が血管内皮細胞に分化し移植脂肪が生着する際の血管新生に寄与している、②移植後に成熟脂肪細胞間や脂肪組織間質に生着した ASC が、脂肪前駆細胞としての役割を果たし脂肪細胞の将来のターンオーバーに備える、③ASC の一部が成熟脂肪細胞へと分化し、移植脂肪の一部となる、④移植後急性期の低酸素環境下において ASC が VEGF や HGF などの血管新生誘導因子を分泌しパラクライン的に周囲宿主組織からの血管新生を促進する、といった機序が考えられる。臨床的に、吸引脂肪を用いた脂肪注入は長期的な生着率が低いことが知られているが、これは吸引脂肪組織が ASC 欠乏脂肪組織であるが故に術後の短期的な組織のターンオーバーがうまくいかず徐々に移植脂肪が萎縮していく結果なのかもしれない。この仮説は、ラットの大網 [Masuda et al., 2004]、あるいはマウスの脂肪 [Moseley et al., 2006] を用いた ASC 混合脂肪移植の報告において、3~6 ヶ月後の長期的な脂肪萎縮が抑えられているという結果からも支持される。③の機序に関しては、ASC は従来、脂肪前駆細胞として知られていた細胞であり、*in vivo* で成熟脂肪細胞に分化することは自明である。①、④に関しては、本研究以外でも文献的報告が多数見られ、CAL fat 内の著明な血管新生や生着脂肪層が厚い一因と考えられる。移植に付随する外科的な侵襲、およびその後の低酸素環境と炎症反応を伴う創傷治癒過程などによって、ASC の脂肪細胞や血管内皮細胞、壁細胞といった方向への分化が惹起されていることも推定される。CAL における ASC の真の役割については今後も検討を要する問題であるが、吸引脂肪に ASC を添加して移植すると、そのまま移植するよりも生着率が高いという事実は、従来の脂肪移植において生着率が低い一因を示している可能性が考えられ、この解決法として CAL という手法が提唱され得る。脂肪注入術は、傷痕を残さず、異物による合併症も起こさず、形態改善の自由度も高い。その有効性・安全性さえ確立されれば軟部組織増大の理想的な手段となり得る手術法であり、本研究をはじめ多くの基礎研究の結果から現実のものとなることが期待される。

#### 4. おわりに

本研究は、黎明期にある再生医療研究における臨床応用を意識して行ったものである。幅広い分野で臨床応用にむけたトランスレーショナルリサーチが進んでいるが、その中で臨床応用する際に大きな壁となっているのが安全性の問題である。細胞培養、遺伝子導入、形質転換を誘導する薬剤、他家移植、などの未知の危険性と再生医療の有効性を天秤にかけたときに、臨床応用は代替治療法がなく重症度の高い疾患を対象にした分野に限定される。本研究では安全性重視の観点から、自己新鮮細胞を *minimal manipulation* で補助的に用いる治療モデルを検証した。まずは安全性を第一に考えた方法で切り拓かれ、その中で得られた新たな知見を下に、細胞培養、遺伝子導入などを組み合わせた方法が、より高い有効性を目指して臨床応用されていくものと思われる。近い将来、現時点では満足のいく治療法の確立していない様々な分野において、再生医療研究の中から新しい医療技術が開拓されていくことが期待される。