

## 2010年度採択 Translational Research 振興事業報告書

### 1. 研究テーマ

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

### 2. 研究代表者名（氏名 所属 職名）：

氏名：室原 豊明

所属機関名：名古屋大学大学院医学系研究科 循環器内科学 職名：教授

### 3. 研究組織（氏名 所属 職名）：

氏名：古森 公浩

所属機関名：名古屋大学大学院医学系研究科 血管外科学 職名：教授

氏名：池田 宇一

所属機関名：信州大学大学院医学系研究科 循環器病態学 職名：教授

氏名：新谷 理

所属機関名：名古屋大学大学院医学系研究科 循環器内科学 職名：講師

氏名：伊澤 淳

所属機関名：信州大学大学院医学系研究科 循環器病態学 職名：助教

氏名：越川 めぐみ

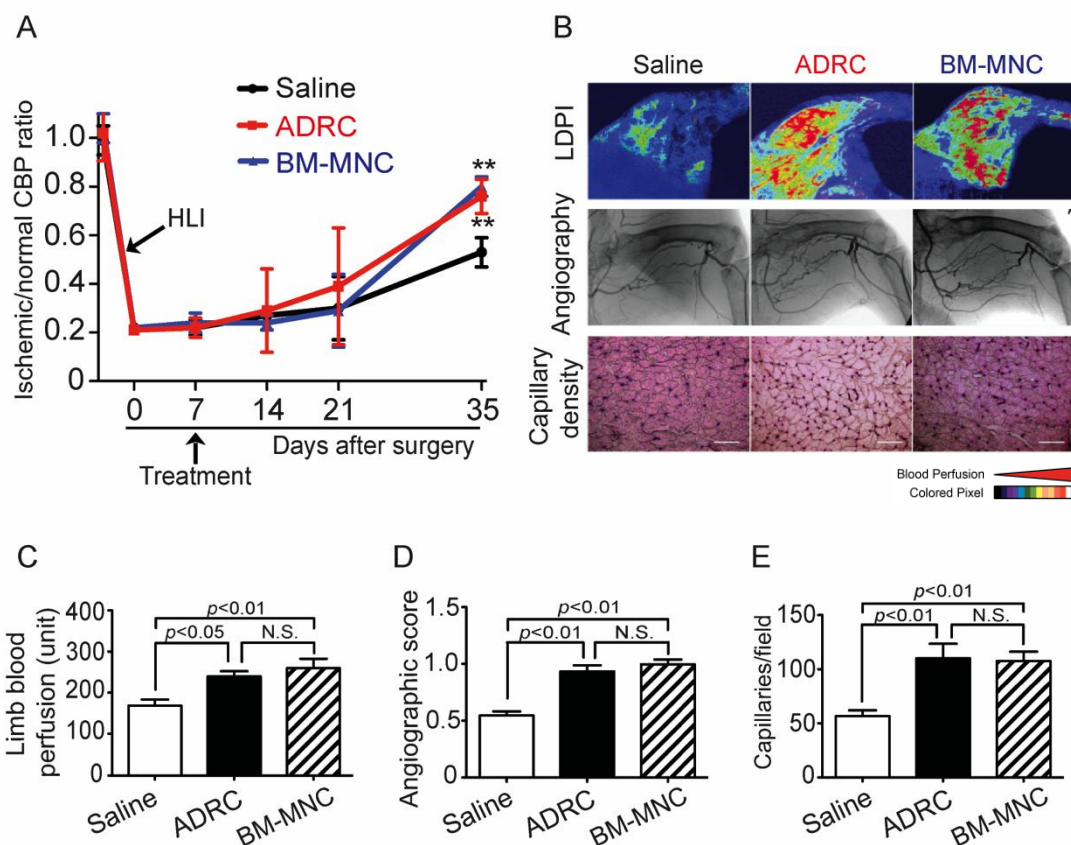
所属機関名：信州大学医学部附属病院循環器内科・輸血部兼務 職名：診療助教

### 4. 全期間の活動報告

我々が以前、臨床導入した「自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法：Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation (TACT study)」は、従来治療で救肢困難な重症虚血肢に対する新たな治療戦略として先進医療に認可されたが (Tateishi-Yuyama et al. *Lancet* 2002; 360:427-435)、糖尿病や血液維持透析など特定の動脈硬化危険因子を有する患者への治療効果が劣っていることも多施設長期予後試験から明らかになった (Matoba et al. *Am Heart J.* 2008;156: 1010-1018)。そこで、新たな体性幹・前駆細胞を用いた治療法の開発が必要と考えられた。

2000年頃より、Zuk, Hedrick らによって、皮下脂肪組織中には、骨髄と同様に間葉系幹細胞が含まれていることが明らかにされて来た。我々はこれまでに、マウス片側下肢虚血モデルを用い、皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞 (Adipose derived regenerative cells: ADRCs) を移植すると、虚血部に血管新生を誘導出来ることを示して来た。その機序としては、移植細胞や刺激を受けた虚血骨格筋細胞より血管新生誘導因子である VEGF や SDF-1 が放出され、虚血骨格筋での血管新生を増強するが明らかになった (Kondo et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:61-66)。ADRCs は 2001年 Zuk, Hedrick らにより報告された多分化能を有する未分化細胞群であり、脂肪組織からの抽出も容易である。

本血管新生療法のさらなる前臨床試験として、ウサギ片側下肢虚血モデルでの治療有効性および安全性の検証を行った。下肢虚血作成 1 週間後に、動物を無作為に 3 群に分け、それぞれ生理食塩水、ADRCs、骨髄単核球細胞 (BM-MNCs) を虚血骨格筋内に移植した。細胞は全て自己組織由来細胞を使用し、細胞数は  $1 \times 10^7$  個とした。機能的および構造的血管新生増強効果は、虚血/正常下腿血圧比、レーザドプラによる皮下血流測定、血管造影検査によるアンジオグラフィックスコア、組織免疫染色による毛細血管密度測定で評価した。ADRCs 移植による治療効果は、BM-MNCs 移植群と同等でかつ、対照群 (生理食塩水) と比較して有意に増強していた。なお、観察期間中、細胞移植に伴う手技的合併症や、血管腫など新規新生物の発生など関連有害事象は認められなかった

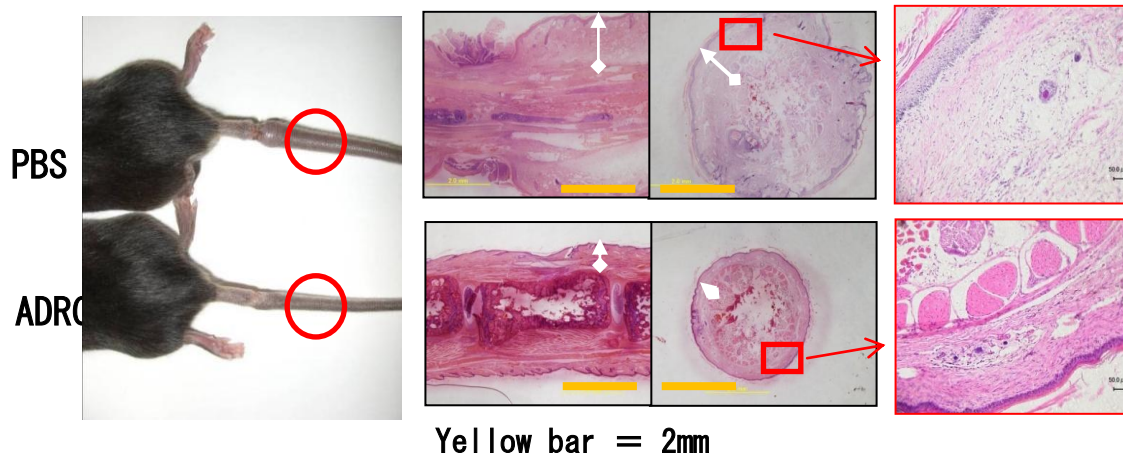


### ヒト皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法

上記基礎研究結果に加え、我々が既に行った大動物（ブタ）下肢虚血モデルでの臨床プロトコル（セルーション遠心分離器®で単離した ADRCs の自家移植）による安全性試験が評価され、2012年8月24日には、厚生労働大臣から「ヒト皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞（adipose-derived regeneration cells: ADRCs）を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法」の臨床研究も実施承認された。研究協力施設である信州大学医学部附属病院と共に、従来治療に抵抗性を示す Fontaine 分類 III-IV の末梢性虚血性疾患で日常生活が著しく障害され、将来、肢切断が余儀なくされる患者を対象に本血管新生の臨床導入を行う。

### 皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植によるリンパ浮腫軽減効果

悪性疾患やその治療（リンパ節廓清術、放射線療法）後に出現する2次性リンパ浮腫は、機能障害や容姿の点から QOL を損ねるのみでなく、感染症の合併を引き起こす確立した治療法がない難治性疾患である。ADRCs は多分化能を有する未分化細胞であり、様々なサイトカインを放出する。我々は、リンパ管新生増強因子である VEGF-C も ADRCs から放出されておりことを確認した。マウス尾部リンパ浮腫モデルへ ADRCs を移植すると、対照群と比して、明らかに細胞移植部位末梢側の毛細リンパ管数の増加が見られ、リンパ浮腫が軽減することを見出した。



ADRCs 移植によるリンパ管新生は、血管新生同様、移植細胞自身のリンパ管内皮細胞への分化ではなく、移植細胞から放出された VEGF-C による近傍の成熟リンパ管内皮細胞の発芽的増殖および EPCs 同様、骨髄からリンパ浮腫組織へのリンパ管内皮前駆細胞の動員によるリンパ管新生によるものであった。また、リンパ浮腫組織への炎症細胞浸潤の抑制に局所に動員されるマクロファージの極性 (M1 /M2) が重要であり、ADRCs はこの極性をコントロールしている可能性が示唆された。これらの知見は炎症性疾患、組織修復、再生医療に対する細胞移植療法の新たな治療標的となりうると考えられる (Shimizu et al. *J Am Heart Assoc.* 2012; 1: e-000877)。

#### 皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植は骨髄単核球細胞移植と同様に虚血組織における血管新生増強効果を有するか？

ADRCs 移植による血管新生増強の機序としては、ADRCs の血管内皮細胞への直接的な分化ではなく、移植細胞より放出される VEGF、SDF-1 $\alpha$  といったサイトカインによる血管内皮細胞の発芽的増殖や、骨髄から末梢循環への血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells: EPCs) 動員の増強が関与していることが明らかとなったが、ADRCs を移植したウサギ虚血骨格筋において、炎症細胞浸潤が抑制されていることを見出した。近年、マクロファージの活性型に、炎症を惹起する古典的活性型 (M1) と組織修復や血管新生や腫瘍増殖や免疫抑制機能を持つ選択的活性型 (M2) があることが報告されており、我々は ADRCs より分泌された PGE2 (prostaglandin E2) が虚血骨格筋へ浸潤したマクロファージの M2 型へ極性変化させることにより、抗炎症性サイトカイン IL-10 (interleukin-10) の放出が増強し、組織障害が軽減していることを確認した (Hao et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014; 307: H869-879)。

#### 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について

最終研究年度の 2013 年度に、2 例の重症下肢虚血患者へ本血管新生療法を行った。

症例 1 : 64 歳女性、強皮症 (Fontaine 分類 IV) 2013.9.13 施行

症例 2 : 65 歳女性、慢性閉塞性動脈硬化症 + 強皮症 (Fontaine 分類 IV) 2013.11.13 施行

いずれの症例も安静時疼痛を伴う難治性潰瘍を有していたが、細胞移植後より疼痛軽減および潰瘍サイズの縮小を認めた。



細胞移植前



細胞移植 1 ヶ月後



細胞移植 6 ヶ月後