

脂肪組織由来幹細胞と血管新生

吉村浩太郎

東京大学医学部形成外科

## I. はじめに

脂肪組織に存在する間質細胞は、従来は脂肪間質細胞 (adipose stromal cell、間質血管細胞 stromal-vascular cell と呼ばれる)、脂肪前駆細胞 (adipose progenitor cells, ときに preadipocytes) などと呼称されていた線維芽細胞様細胞 (fibroblast-like cells) の中に、脂肪細胞や血管のみならず多様な lineage への分化能を有する細胞が存在することが指摘され<sup>1</sup>、脂肪由来幹細胞とも呼ばれるようになった。皮下脂肪組織は瘦身目的の脂肪吸引術 (世界で毎年約100万件行われている) において大量に (> 1L) 採取可能である。さらに、組織から採取した細胞群中の多分化能を持つ細胞の割合が高いこと、大量培養も容易であること、骨髄由来間葉系幹細胞とほぼ同等の潜在能力を持っていること、などから、再生医療における骨髄に代わる新たな組織幹細胞源として期待されるようになった。

## II. 脂肪組織の構造およびその細胞成分

脂肪細胞は巨大な脂肪滴を含有した単核細胞で、その大きさは大きいものでは 120-140 ミクロンにも及ぶが、肥満が進行してもそれ以上は大きくならず、細胞数が増えることにより組織体積を増やすことが知られている。脂肪細胞は脂肪組織の体積の 90% 以上を占めているが細胞数で見るとわずか 20-30% に過ぎず、毛細血管を構成する血管内皮細胞や周皮細胞、脂肪間質 (前駆) 細胞 (Adipose-derived stromal/progenitor cells: 以下 ASC、この中に脂肪由来幹細胞を含んでいる) などが数多く存在する<sup>2,3</sup> (図1)。脂肪細胞以外の細胞は、脂肪組織を酵素処理することにより、間質血管細胞群 (stromal vascular fraction [以下 SVF]) として分離することができる (図2、3)。SVF 中の CD45 陽性細胞には循環血液由来の白血球のみならず、脂肪組織に局在する resident macrophage (CD14+/CD206+) やリンパ球 (CD45RO+) も一部含まれている (図4)。

すべての脂肪細胞は毛細血管と直接接して栄養を受けており<sup>3</sup>、脂肪細胞の増生には必ず毛細血管新生を伴うことが知られている (図5)。脂肪細胞の寿命については不明の点が多かったが、最近およそ数年~10年であることが指摘され<sup>4</sup>、脂肪組織がゆっくりではあるがターンオーバーしていることが明らかにされた。

## III. 脂肪組織由来間質細胞 (ASC) の特徴

1) 培養法: ASC は接着細胞であり、DMEM や DMEM/F12 などの培地で容易に培養でき、数十代の継代培養が可能である。bFGF や PDGF 添加によって細胞増殖が促進されることが知られており<sup>5</sup>、血管内皮細胞用の培地なども使用できる。

2) 表面抗原発現: ASC は新鮮な状態では CD31-/CD34+/CD45-/CD90+/CD105-/CD146-細胞であり、接着培養すると CD105 を強く発現する<sup>2</sup>。間葉系幹細胞 (MSC) や皮膚由来線維芽細胞 (DF) と形態的には酷似しているが、表面抗原発現での一番大きな違いは培養 ASC では CD34、CD105 の発現が多く見られることである<sup>2</sup>。組織染色ではヒトでもマウスでも CD31- (又は lectin-) /CD34+ 細胞としてほぼ特定が可能である。マウスでは CD24 発現細胞が脂肪細胞の前駆細胞であることが最近指摘されたが<sup>6</sup>、ヒト脂肪組織でも CD24 発現細胞は存在することが確認された。培地によってその発現も変化し、EBM (血管内皮細胞用基礎培地) では CD34 発現が強くなり、DMEM では CD34 が発現しなくなる。神経成長因子受容体で神経堤細胞マーカーとしても使われる CD271 (p75-NTR) や、骨髄 MSC や毛包幹細胞のマーカーとされる CD200 についてもヒト脂肪組織内および ASC 内に陽性細胞の存在が確認されている。

3) 局在:CD31-/CD34+細胞の局在から、ASC は毛細血管に随伴して脂肪細胞間に存在しているとともに、大きな血管の周囲(外膜内)に局在していると考えられる(図6)。特に後者に高密度に存在している。最近、脂肪細胞の前駆細胞が毛細血管に隣接して局在することが示され<sup>7</sup>、ASC は血管周細胞として存在、機能しているとの見解も近年複数報告されている<sup>8</sup>。

#### IV. ASC の機能

ASC は生理的には脂肪組織特有の組織前駆細胞として、脂肪組織の成長、ターンオーバーや傷害に伴う組織修復を担い<sup>3</sup>、脂肪細胞に、もしくはさらに血管内皮細胞などにも分化すると考えられている<sup>9</sup>。また、脂肪組織から分泌される炎症性サイトカインやアディポカインの多く(レプチン、アディポネクチンは除く)は脂肪細胞以外の細胞から分泌されており、肥満に伴う阻血や炎症においても局在炎症細胞とともにASCも重要な役割を果たしているかもしれない。

ASCには多分化能を持つ幹細胞が含まれており<sup>1</sup>、実験的には脂肪、血管、骨、軟骨、骨格筋、心筋のほかに、神経や肝臓など胚葉を超えた多能性が示されているとともに、最近ではhemangioblastの性質を持つ細胞の存在も指摘されている。低酸素刺激によりASCからのVEGFやHGFの分泌促進<sup>10</sup>、EGFやbFGF刺激によりASCからのHGF分泌促進が見られることがわかった<sup>5</sup>。脂肪組織は皮膚や骨に比べて虚血に弱いことが知られており、脂肪細胞は短時間の虚血変化により細胞死を起こすが、ASCは虚血に強く、虚血に伴う脂肪細胞や血管内皮細胞の壊死に伴い活性化(分裂、遊走、分化)されて、脂肪組織のリモデリングにおける修復・再生作業において中心的な役割を担う<sup>3</sup>。

#### V. ASCを用いた循環器系への再生医療

血管新生や心機能改善を目的とした前臨床研究が数多く報告されている。虚血下肢にASCを局注することで血管新生が見られ<sup>11-13</sup>、ASCは血管内皮に分化できることがいくつかの研究で確認され<sup>11,12,14</sup>、さらにin vitroでもASCが内皮細胞様に分化し毛細管様のvWF陽性の細胞ネットワークを形成することが示されたが、今だにASCを血管内皮細胞に分化させる効率的な分化誘導法は確立されていない。また一方では、低酸素状態でHGF,VEGF,SDF-1などの血管新生因子を分泌することも明らかになり<sup>10,15</sup>、血管内皮細胞への分化効率が悪いことからASCの血管新生効果には血管新生因子分泌の寄与が大きいという見解もある<sup>13</sup>。血管新生因子は一般的に単独よりも複数投与により相乗効果がみられることが多いことから、蛋白ではなく細胞投与の意義もそれなりに大きいと考えられている<sup>16</sup>。ASCが分泌したSDF-1により末梢血中のEPCが誘導されることも示唆された<sup>15</sup>。さらにASCとbFGF徐放剤を併用することにより虚血下肢を改善する効果は有意に高くなり、投与したASCの大半は主に血管周囲に存在した<sup>17</sup>。このようにparacrine作用で血管新生を促し、自らは血管周細胞として局在して新生血管を安定化させる役割を果たしているのかもしれない。Sphingosylphosphorylcholineを使ってASCを血管平滑筋様細胞に分化誘導できることが知られている<sup>18</sup>。ASCの血管新生誘導を利用した創傷治癒促進効果も数多くの報告で示唆されている。

ASCは実験的に心筋細胞へ分化させることができることも報告されており<sup>19</sup>、培養細胞シート貼付移植<sup>20</sup>や心筋内注入<sup>21</sup>経冠動脈注入<sup>22</sup>で投与することにより心筋梗塞モデルにおいて心機能が改善することも示された。

## VI. ASC の臨床応用の世界的な動向

ASC は 2002 年頃より散発的に臨床応用が試みられてきている。①骨欠損に対して骨移植を行い、同時にフィブリン糊と混合した新鮮自己 ASC を投与した例(ドイツ)<sup>23</sup> や、②クローン病に併発する直腸瘻や腸皮膚瘻などに対して外科的瘻孔閉鎖術もしくは切除術を行い、同時に周囲組織に新鮮もしくは培養自己 ASC を創傷治癒促進、再瘻孔防止を目的に投与する例(スペイン、数十例)<sup>24</sup>、③豊胸術や乳房再建、顔面脂肪萎縮症などに対して新鮮自己 SVF を接着させた吸引脂肪組織を移植して組織の増大を行う例(日本、約 400 例)<sup>25-27</sup>、④骨髄移植後の GVHD に対して培養他家 ASC を移植した例(中国、2 例)<sup>28</sup>、⑤ヒアルロン酸ベースのスキヤフォードに自己 SVF を播種、培養したコンストラクトを皮下に移植した例(ベルギー、12 例)<sup>29</sup>、⑥気管瘻に培養自己 ASC をフィブリン糊をベースに注入投与して瘻孔閉鎖を見た例(スペイン)<sup>30</sup>、⑦急性心筋梗塞に対する新鮮自己 ASC の冠動脈投与(オランダ)、⑧多発性硬化症に新鮮自己 SVF を静脈投与(米国、3 例)、などが報告されている。このように、主に自己 ASC、なかでも新鮮 SVF の状態での利用が多く、また補助的な利用が多いことから、特に安全性を重視した取り組みが多いことがうかがえる。上記以外にも、管状スキヤフォードに新鮮自己 ASC を播種して血管移植に使用する治療(米国)など、現在数多くの臨床研究が進行中である。馬の屈腱炎などの腱傷害に新鮮自己 SVF を投与する治療も行われている。

## VII. 今後の ASC の臨床応用の方向性

上記の治療目的以外にも、前臨床研究では骨格筋再生(筋ジストロフィーなど)、癒痕や線維化改善(HGF を介して)、神経再生(脊髄損傷など)、肝機能再生などにおいても有効性が示唆されており、将来的な臨床応用に発展する可能性がある。このように ASC は骨髄由来 MSC とほぼ同等の臨床応用が想定されていると言える。

ASC に bFGF、PDGF や EGF などの刺激を複合的に与えると Flk-1 を発現し、血管内皮細胞に容易に分化できるようになる。これまでは細胞を足場や組織、既存治療とある意味自然に近い状態で組み合わせる形での治療の試みが多くなされてきたが、今後は治療目的に応じて細胞に特定の刺激を加えるなど、細胞を積極的に機能させ、より有効性の高い治療を目指す方向性も想定される。また細胞や薬剤が血流によってウォッシュアウトされて効果がなくなったり遠隔部位で想定外の分化をしたりするような副作用をおこさないような工夫も求められる。

## 参考文献

- 1) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279.
- 2) Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 2006; 208: 64.
- 3) Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med* 2009; 4: 265.
- 4) Spalding KL, Arner E, Westermarck PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans.

Nature 2008; 453: 783.

5) Suga H, Eto H, Shigeura T, et al. IFATS series: FGF-2-induced HGF secretion by adipose-derived stromal cells inhibits post-injury fibrogenesis through a JNK-dependent mechanism. *Stem Cells* 2009; 27: 238.

6) Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 2008; 135: 240.

7) Tang W, Zeve D, Suh JM, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 2008; 322: 583.

8) Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, et al.: A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res* 2008; 102: 77.

9) Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109: 656.

10) Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109: 1292.

11) Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al.: Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109: 656.

12) Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004; 110: 349.

13) Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2542.

14) Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer (CAL): supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng* 2006; 12: 3375.

15) Kondo K, Shintani S, Shibata R, et al.: Implantation of Adipose-Derived Regenerative Cells Enhances Ischemia-Induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 61.

16) Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 1751.

17) Bhang SH, Cho SW, Lim JM, et al. Locally-delivered growth factor enhances the angiogenic efficacy of adipose-derived stromal cells transplanted to ischemic limbs. *Stem Cells*, in press (doi: 10.1002/stem.115)

18) Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J Cell Sci* 2006; 119: 4994.

19) Planat-Bénard V, Menard C, André M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation

from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004; 94: 223.

20) Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006; 12: 459.

21) Cai L, Johnstone BH, Cook TG, et al. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells* 2009; 27: 230.

22) Valina C, Pinkernell K, Song YH, et al. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007; 28: 2667.

23) Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg* 2004; 32: 370.

24) García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, et al. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1416.

25) Yoshimura K, Sato K, Aoi N, et al. Cell-assisted lipotransfer (CAL) for cosmetic breast augmentation -supportive use of adipose-derived stem/stromal cells-. *Aesthetic Plast Surg* 2008; 32: 48.

26) Yoshimura K, Sato K, Aoi N, et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg* 2008; 34: 1178.

27) Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, et al. Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications, *Breast J*, in press.

28) Fang B, Song Y, Lin Q, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graft-vs.-host disease in two children. *Pediatr Transplant* 2007; 11: 814.

29) Stillaert FB, Di Bartolo C, Hunt JA, et al. Human clinical experience with adipose precursor cells seeded on hyaluronic acid-based spongy scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29: 3953.

30) Alvarez PD, García-Arranz M, Georgiev-Hristov T, et al. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax* 2008; 63: 374.

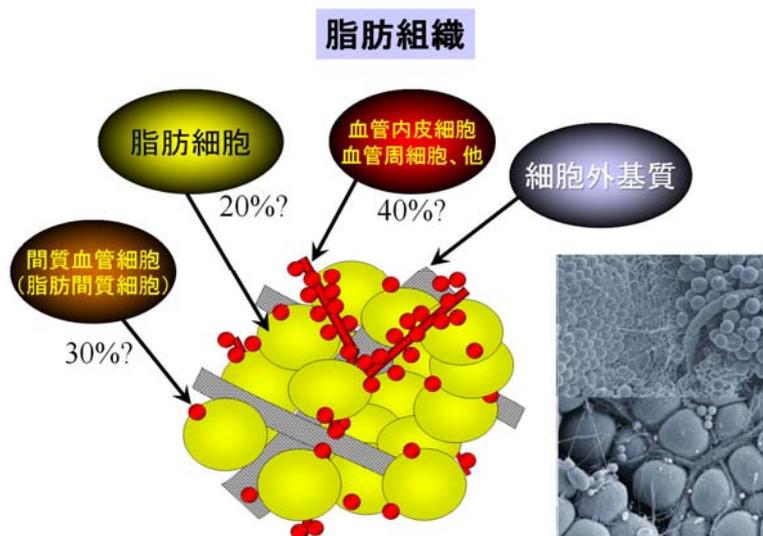


図1. ヒト正常脂肪組織の構造

ヒト脂肪組織の模式図。脂肪細胞は体積の90%以上を占めるが細胞数では20-30%程度で、血管内皮細胞の数が非常に多い。脂肪細胞は単核細胞であるがヒトでは直径130ミクロンを超えることもある。血管の周囲や脂肪細胞間に脂肪間質細胞(ASC)が存在している。左下は走査電顕標本の弱拡大と強拡大像。

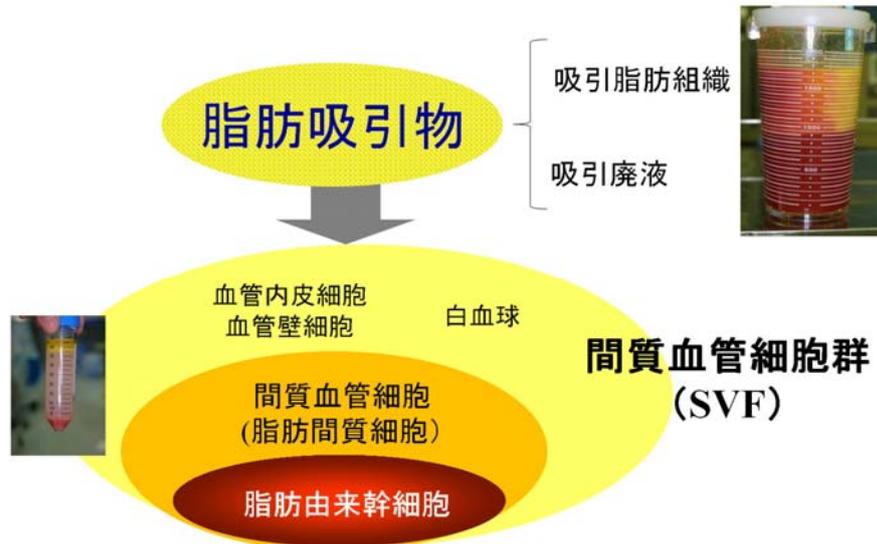


図2. 吸引脂肪組織から採取される細胞群

脂肪組織をコラゲナーゼ処理することにより回収される細胞群を間質血管細胞群(SVF)と呼ぶ。SVFは不均一な細胞群で、血球や脂肪細胞以外の脂肪組織由来細胞群が含まれている。生理的には脂肪組織の前駆細胞として機能する脂肪間質細胞(ASC)の中には、多分化能を持つ細胞(脂肪由来幹細胞)が含まれている。

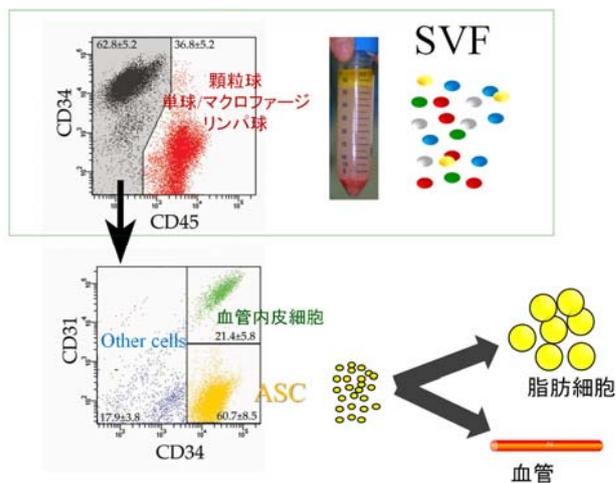


図3. 脂肪吸引組織由来細胞群(SVF)のマルチカラーフローサイトメトリー解析①

吸引脂肪から採取される SVF は、脂肪由来細胞(CD45-)と末梢血由来細胞(CD45+)から成る。血液由来細胞の割合は術中の出血量に左右される。CD31、CD34、CD45 の発現により、SVF を4種類に分類できる。脂肪組織由来細胞(CD45陰性)の大半はCD34陽性であり、CD34陽性細胞はASC(CD31陰性)と血管内皮細胞(CD31陽性)に分けることができる。脂肪組織由来細胞のうち、成熟脂肪細胞は処理過程で破壊もしくは廃棄されるため、SVFには含まれない。

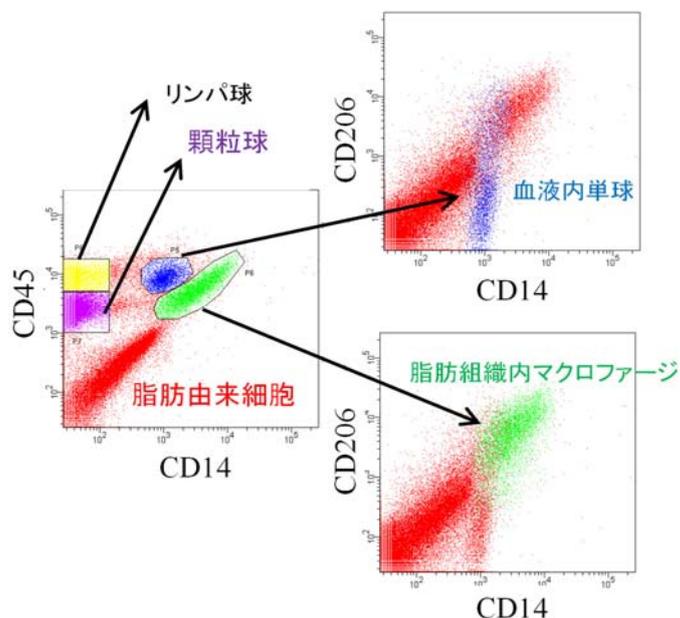


図4. 脂肪吸引組織由来細胞群(SVF)のマルチカラーフローサイトメトリー解析②

SVF中のCD45陽性細胞は主に脂肪組織内の血管内に存在する残存血液に由来する。しかし、一部には脂肪組織内に局在しているマクロファージとリンパ球を含んでいる。SVF中のマクロファージ(CD14+)の中には、CD206陽性のレジデントマクロファージが含まれていることがわかる。

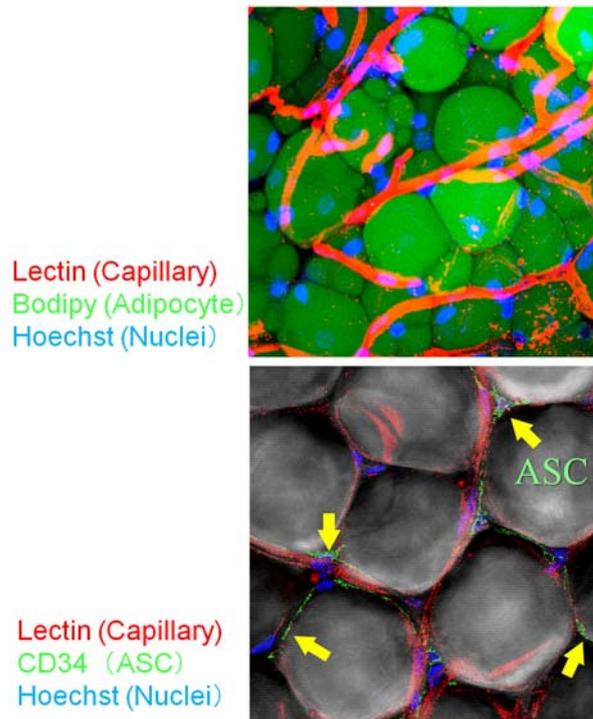


図5. ヒト脂肪組織の Whole mount 染色像

(上) Bodipy (脂肪細胞：緑色)、lectin (血管：赤色) およびヘキスト (核：青色) にて染色。ヒト脂肪組織には脂肪細胞以外の細胞も数多く存在している。脂肪細胞の間に毛細血管が走行しており、毛細血管はすべての脂肪細胞に接触している。

(下) CD34 (脂肪間質細胞[ASC]：緑色)、lectin (血管：赤色) およびヘキスト (核：青色) にて染色。脂肪細胞間、毛細血管の周囲に脂肪間質細胞 (黄矢印) と思われる細胞が存在する。

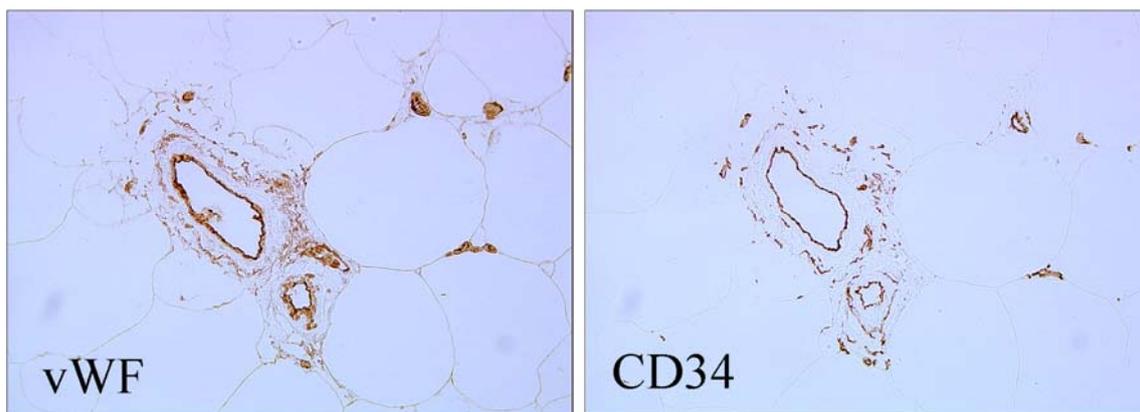


図6. 脂肪組織内における脂肪間質細胞(ASC)の局在

正常脂肪組織の von Willbrand factor (左)、CD34(右)免疫染色像。血管内皮細胞(CD34 陽性 vWF 陽性細胞)は血管の最内層と脂肪内の毛細血管に見られる。一方、ASC (CD34陽性vWF 陰性細胞)は血管平滑筋の直外側に多数認められ、さらに脂肪細胞間にも散在する。