

脂肪由来幹(前駆)細胞の臨床応用

吉村浩太郎

連絡先

〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1

東京大学形成外科

吉村浩太郎

TEL:03-5800-8948

FAX:03-5800-8947

E-mail:kotaro-yoshimura@umin.ac.jp

キーワード：前駆細胞、脂肪由来幹細胞（ASC）、血管内皮細胞、間質血管細胞群（SVF）、脂肪移植

Abstract

Clinical applications of adipose stem/progenitor cells

Kotaro Yoshimura

Department of Plastic Surgery, University of Tokyo, Tokyo 113-8655

Adipose tissue gains much attention not only as autologous soft tissue filler but also as a valuable source of mesenchymal stem cells. Adipose tissue turns over very slowly and its perivascular progenitor cells (adipose stem/progenitor cells: ASCs) differentiate into adipocytes or vascular endothelial cells in the next generation. Through collagenase digestion, stromal vascular fraction containing ASCs can be obtained. ASCs play important roles in physiological turnover, hyperplasia, and atrophy of adipose tissue; as well as in incidental remodeling, such as post-injury repair. There have been many clinical trials using ASCs, such as enhancement of tissue regeneration, angiogenesis and anti-fibrosis. Careful design of microenvironment activating ASCs, cell delivery protocol to avoid unexpected behavior and induce maximal potential of ASCs, and selection of target diseases, will be critical to the success of clinical applications.

はじめに

脂肪吸引術において廃棄される皮下脂肪組織は、再生医療のツールそのものとして、また幹細胞源として近年注目されるようになった。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 (preadipocytes, adipose progenitor cells) などと呼称されていた線維芽細胞様細胞の中には、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[1]、脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ASC、ADSC などと略される) などと呼ばれている。皮下脂肪組織は 1L 以上と大量に採取することが可能であるとともに、採取細胞中の多分化能を持つ細胞の割合が高いこと、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、骨髄に代わる新たな組織幹細胞源とみなされるようになった。

I. 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、大きいものでは直径 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。脂肪細胞の寿命は数年から 10 年であることが指摘され、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[2]。脂肪細胞は脂肪組織の体積の90%以上を占めているが、細胞数で見るとごくわずかに過ぎず、血管内皮細胞や周皮細胞、脂肪間質細胞 (前駆細胞、ASC) などが数多く存在する[3-5]。これらの細胞は間質血管細胞群 (stromal vascular fraction [以下 SVF]) と呼ばれ、脂肪組織を酵素処理することにより、分離することができる(図1)。

結合組織には大きな血管やリンパ管が存在し、すべての脂肪細胞は毛細血管の密なネットワークと直接接しており、毛細血管に周皮細胞のように張り付いて存在する ASC は脂肪細胞と血管内皮細胞の双方の前駆細胞ではないかと考えられるほど、脂肪と血管は実は非常に密な関係にある。

II. 臨床応用するための細胞の準備

脂肪組織には 1g あたり 400-500 万個の細胞が存在し、そのうちおよそ 100 万個が脂肪細胞、100 万個が ASC、100 万個が内皮細胞である [5]。SVF は 1g の脂肪組織をコラーゲナーゼで酵素処理することで、有核細胞数としておよそ 30~100 万個 (うち ASC は 1~10 万個) が単離でき、その中には出血による白血球も含まれている。最近では吸引脂肪から SVF を単離するための自動化 (半自動化) 装置、手術室で使用できるマニュアル用のデバイスやクリーンベンチなどのシステムも市販されはじめている。しかし、採取法により効率が様々であるため、SVF の生細胞数を測定して確認することが必須である。

一方、まだ採取効率は低いコラーゲナーゼを使わないで SVF を採取するいくつかの方法も開発が現在進んでおり、酵素を使用しない場合は minimal-manipulation とみなされ、安全性が高くなり法的規制からはずれるため、大きな期待が寄せられている。

ASC は接着細胞であり、DMEM/F12 などの培地で容易に大量培養が可能である

とともに、内皮細胞や白血球などが除外され、純化される。ASC は新鮮な状態では CD31(-)CD34(+)CD45(-)CD90(+)CD105(-)CD146(-)細胞であり、培養すると CD105 を強く発現する[3]。

III. 細胞の移植方法、移植体の種類

幹細胞には一般的に免疫寛容であるという特徴があるとされるが、その投与は自家移植として行われることが多い。しかし、治療目的によって他家移植が可能であればその利用価値は飛躍的に高まる。これまでは新鮮細胞の SVF として使用する場合が多いが、培養して ASC を純化し有効細胞数まで増殖させて利用する場合もある。現在までの臨床研究では、一定の分化誘導をかけることはせずに、できるだけ未分化な状態で細胞を投与しているものが多い。SVF、ASC どちらの状態でも凍結保存が可能である。脂肪組織として凍結保存した場合は解凍時にその多くの細胞成分は死滅するが、強力な生物活性を持つその細胞外基質を無細胞真皮などのようにスキヤフォードや被覆・移植材料などとして利用できる可能性はある。

細胞を懸濁液として静注する場合はその大半の細胞は肺や肝臓に捕捉されることが知られている。皮下などに局所注入してもその大半はリンパから循環に入り、リンパ腺を含め同様に捕捉される。それを避けるためには、細胞同士を接着させて(細胞シート、細胞クラスターや球状細胞塊)、もしくは細胞を組織(真皮や脂肪など)やスキヤフォード(無細胞真皮などの天然細胞外基質、コラーゲンスポンジなどの人工細胞外基質、ポリ乳酸ビーズなどの吸収性物質など)に接着させて投与する。

IV. 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)[6]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自己 SVF 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、韓国)[7]、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 ASC 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、韓国、米国、欧州など)[8-10]、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)[11]、⑤ヒアルロン酸ベースのスキヤフォードに自己 ASC 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]、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)[13]、⑦急性心筋梗塞に対する新鮮自己 ASC の投与(オランダ)、⑧前立腺切除後の緊張性尿失禁に対する治療(日本ほか)、⑨顔面骨、顎骨の再建に、新鮮自己 SVF もしくは培養自己 ASC をチタンメッシュ、 β TCP などに播種して移植したり、皮弁と併用して充填(フィンランド)、ほかにも、肥厚性瘢痕、難治性潰瘍、肝硬変、虚血下肢、骨盤臓器脱、特発性肺線維症などへの臨床研究も報告されている。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、また細胞単独での治療ではないことが多く、補助的な利用が多いことがうかがえる。

V. ASC を利用した脂肪組織移植

脂肪注入移植法は生着や確実性に問題があるとされてきたが、侵襲や自由度など優位点も多く、近年は採取・前処理・移植法などの技術的改良により脂肪移植の有効性・安全性が高くなったため、乳房への応用も一般化してきて、施行数は増加の一途をたどっている。

移植後の脂肪組織は一時的に阻血状態に置かれ、表面の一部を除くほとんどの脂肪細胞が壊死し、次世代の脂肪細胞に置換される[14]。毛細血管を含め、脂肪組織のダイナミックなリモデリングが起こるが、その過程において ASC が増殖し再生修復過程で中心的役割を果たし[15]、移植脂肪内において次世代の脂肪細胞と ASC を提供する[16](図2, 3)。脂肪移植の材料とされる吸引脂肪組織は正常脂肪組織に比べて血管や ASC に乏しいため[5,17]、余分に採取した脂肪組織から分離した新鮮 SVF を添加することにより移植効果を改善する試み (Cell-assisted lipotransfer) が行われている[8-10](図4, 5)。豊胸術等の美容手術や乳がんや顔面変性疾患の再建をはじめ、同様の治療が耳鼻科(声帯周囲)、泌尿器科(尿道括約筋周囲)領域にも応用されている[19]。形成外科領域では多くの国で同様の臨床試行が行われているが、細かいプロトコールなどは相違点が多い。米国では FDA 承認下での臨床研究が頭蓋顔面領域で行われている。

VI. 今後の ASC の臨床応用の方向性

すでに臨床応用されている上記の目的以外にも、四肢や皮膚などの虚血組織の血行改善(血管新生誘導)、骨格筋再生(筋ジストロフィーなど)、瘢痕や線維化改善、放射線障害、神経再生(脊髄損傷など)、肝機能再生(肝硬変など)、ASC 細胞シートによる心機能の改善などにおいて、前臨床研究による有効性が示唆されており、将来的な臨床応用に広がる可能性がある[1]。投与方法の最適化などはまだ手探りの状態ともいえる。このように ASC は骨髄由来間葉系幹細胞とほぼ同等の臨床応用が想定されていると言える。

ASC に特定の増殖因子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。

現在までの臨床試行において細胞の悪性変化など深刻な副作用は報告されていないが、ASC を大量の細胞浮遊液の状態で作傷部位に局所投与した場合に、投与部位およびその周囲にまで線維化を生じた例が見られる。このことは ASC のような接着細胞を非生理的な状態(懸濁液など)で投与する場合に想定外の挙動(遊走、分化、リンパ行性移動)をする可能性があることを示唆している[20]。

まとめ

これまでの ASC に関する基礎および臨床研究により、ASC の潜在能力が広く認知されて来ている。脂肪吸引で切除された脂肪組織は、組織増大だけでなく組織の質

を改善し肥沃化する目的の自家移植材料として、あるいは貴重な組織幹細胞源として利用することができる。脂肪由来幹細胞は、間葉系幹細胞であるとともに、血管と極めて密接な関係を持つ細胞であることが示唆されており、広範囲に臨床応用が可能な血管前駆細胞が脂肪組織から採取できるとすれば、その医学的意義は非常に大きい。一方で、標準化が難しい臨床研究ではまだ不明の点も多く、初歩的な臨床試行から発展して、今後はさらに細胞の機能を最大限に引き出す治療戦略の最適化が期待される。

参考文献

- 1) Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, et al. Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. *Stem Cells*. 29 : 749-754, 2011.
- 2) Zuk PA, Zhu M, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295, 2002.
- 3) Spalding KL, Arner E, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453: 783-787, 2008.
- 4) 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* 208: 64-76, 2006.
- 5) Suga H, Matsumoto D, et al. Numerical measurement of viable and non-viable adipocytes and other cellular components in aspirated fat tissue. *Plast Reconstr Surg* 122: 103-114, 2008.
- 6) Eto H, Suga H, Matsumoto D, et al. Characterization of adipose tissue structure and cellular components: Differences between aspirated adipose tissue and excised adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 124: 1087-1097, 2009.
- 7) Lendeckel S, Jödicke A, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg* 32: 370-373, 2004.
- 8) García-Olmo D, García-Arranz M, et al. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 48: 1416-1423, 2005.
- 9) Yoshimura K, Sato K, et al. Cell-assisted lipotransfer (CAL) for cosmetic breast augmentation -supportive use of adipose-derived stem/stromal cells-. *Aesthetic Plast Surg*, 32: 48-55, 2008.
- 10) Yoshimura K, Sato K, et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg* 34: 1178-1185, 2008.
- 11) Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, et al. Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications, *Breast J* 16: 169-175, 2010.
- 12) Fang B, Song Y, 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* 11: 814-817, 2007.
- 13) Stillaert FB, Di Bartolo C, et al. Human clinical experience with adipose precursor cells seeded on hyaluronic acid-based spongy scaffolds. *Biomaterials* 29: 3953-3959, 2008.
- 14) Alvarez PD, García-Arranz M, Georgiev-Hristov T, et al. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax* 63: 374-376, 2008.

- 15) Eto H, Kato H, Suga H, et al. The fate of adipocytes after non-vascularized fat grafting: Evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plast Reconstr Surg*, in press.
- 16) Suga H, Eto H, 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* 27: 238-249, 2009.
- 17) Yoshimura K, Eto H, Kato H, et al. Stem cell manipulation for soft tissue repair/reconstruction. *Reg Med* 6(6 Suppl.): 33–41, 2011.
- 18) Matsumoto D, Sato K, et al. Cell-assisted lipotransfer (CAL): supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng* 12: 3375-3382, 2006.
- 19) Yamamoto T, Gotoh M, Hattori R, et al. Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of stress urinary incontinence in patients undergoing radical prostatectomy: report of two initial cases. *Int J Urol* 17: 75-82, 2010.
- 20) Yoshimura K, Aoi N, Suga H, et al. Ectopic fibrogenesis induced by transplantation of adipose-derived progenitor cell suspension immediately after lipoinjection. *Transplantation* 85: 1868-1869, 2008.

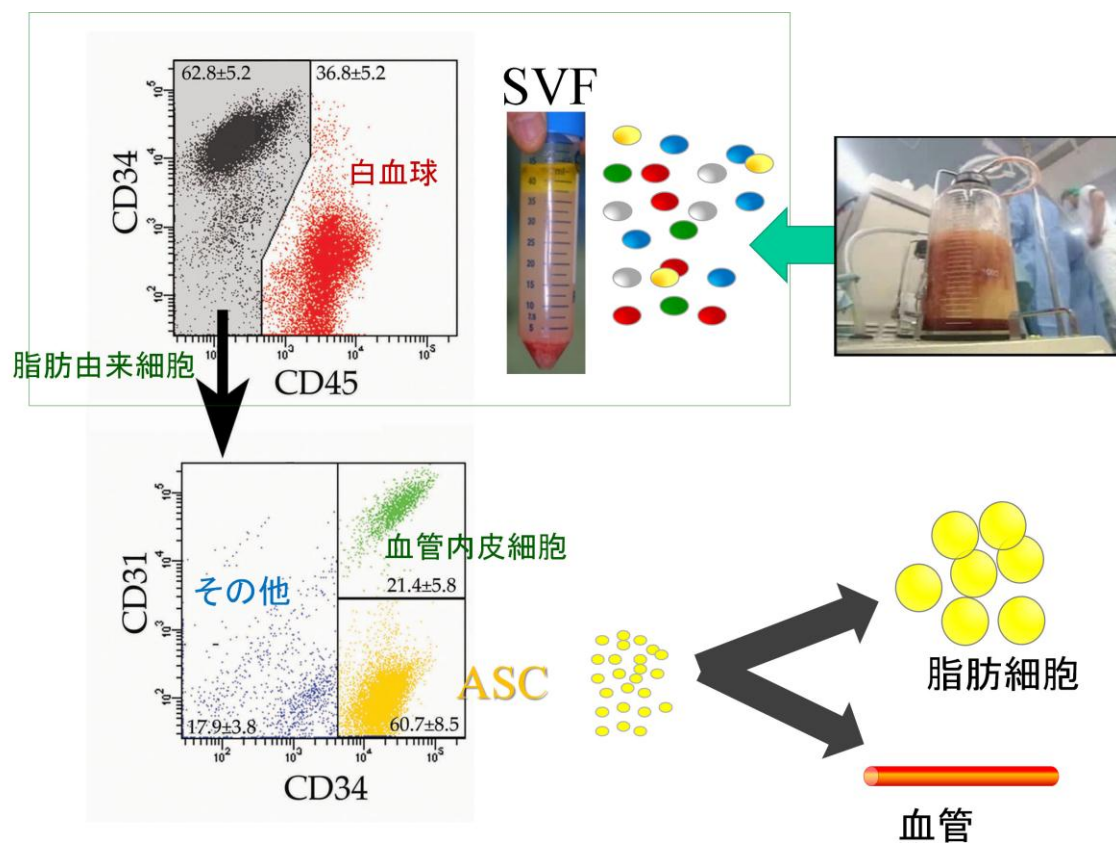


図1. 脂肪吸引組織由来細胞群 (SVF) のマルチカラーフローサイトメトリー解析

吸引脂肪から酵素処理を経て採取される 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+) の大半は CD34+ であり、CD34+ 細胞は ASC (CD31-) と血管内皮細胞 (CD31+) 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。

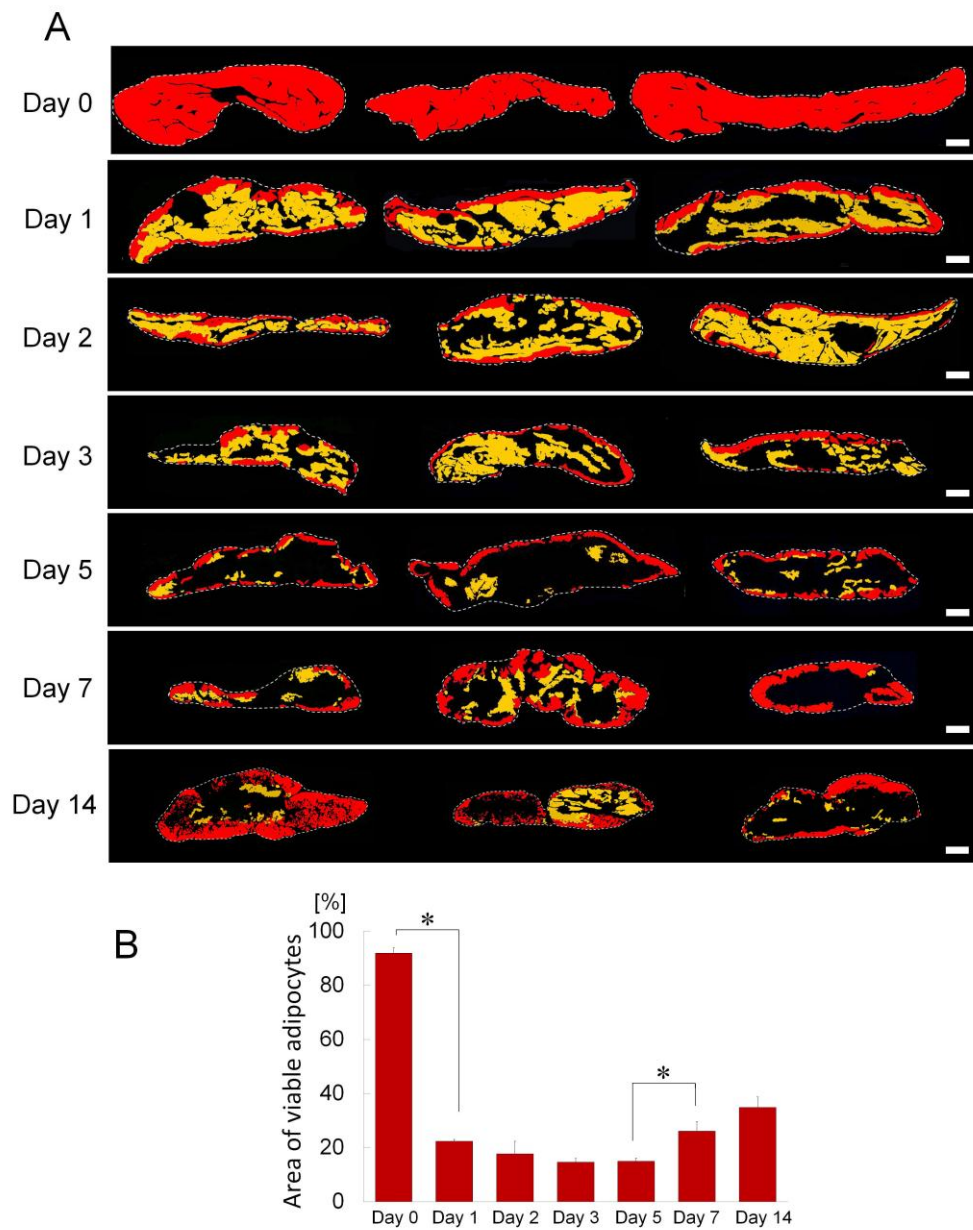


図2. 脂

肪移植後の脂肪細胞の変化(文献14より転載)

(A)動物モデルで 150mg の脂肪小片を移植して、生存脂肪細胞のみをペリリピン染色で描出し、カウントした。赤い領域は生存脂肪細胞(ペリリピン強陽性)、黄色は死に始めた脂肪細胞(ペリリピン弱陽性)、黒は死亡脂肪細胞(ペリリピン陰性)である。移植翌日にはすでに多くの脂肪細胞が死にはじめている。(B)5日目以降はむしろ生存脂肪細胞が増えてくるため、脂肪細胞の再生が始まっていることがわかる。

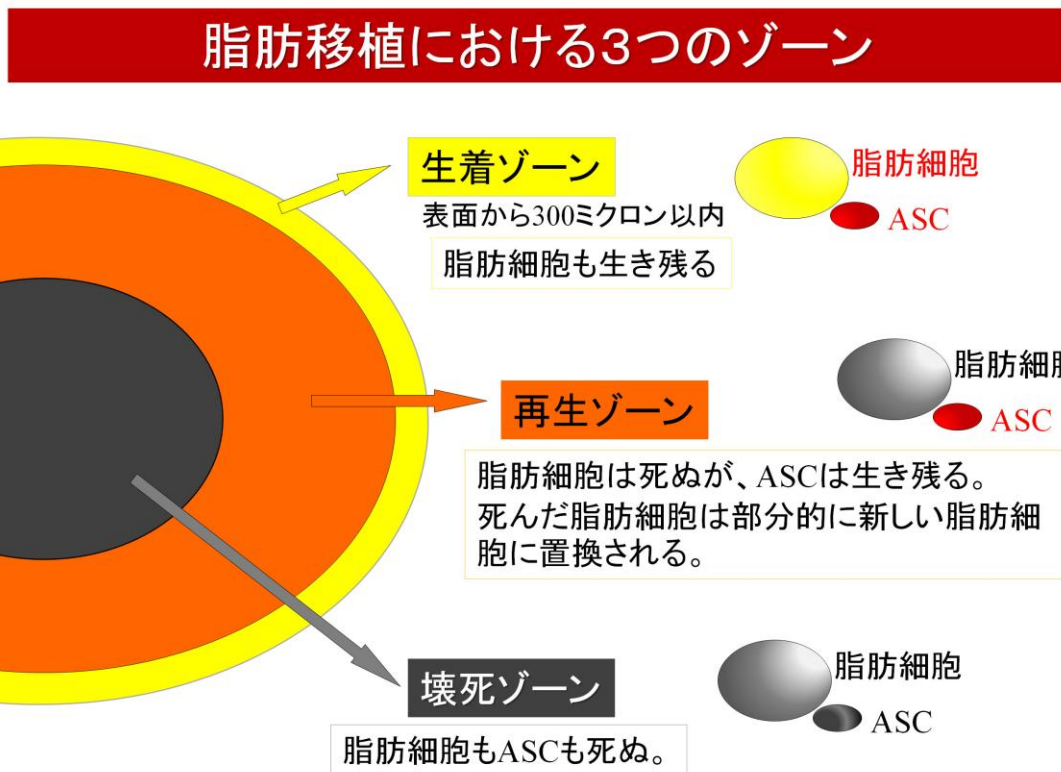


図3. 移植脂肪組織における3つの領域の模式図(文献14より転載、改変)

最外層は 300 ミクロン以内の厚さで、脂肪細胞が周囲からの拡散によって栄養され生存する領域で、中層(1 ミリ程度)は脂肪細胞は死ぬが ASC は生存できるため活性化されて再生しようとするため部分的に再生される領域である。最内層は長期にわたり拡散が効かないため ASC も死滅し壊死する領域である。すなわち、組織が大きいと壊死する領域が増える。

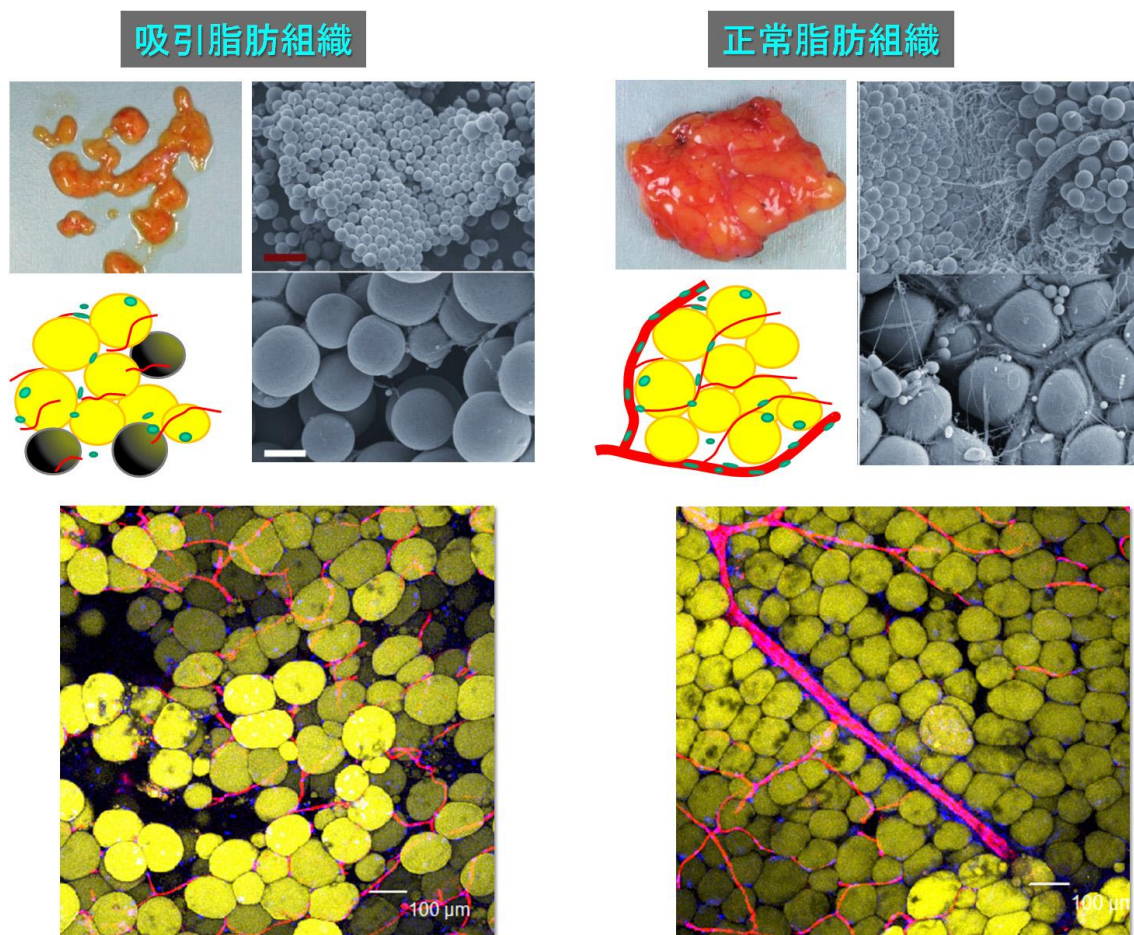


図4. 吸引脂肪組織と切除(正常)脂肪組織の形態学的比較(文献5、16より転載、改変)

上段は、マクロ写真、模式図、および走査電顕標本の弱拡大と強拡大。基本構造はどちらもほぼ同様であるが、吸引脂肪には大血管が非常に少ない。吸引脂肪の場合は、細いカニューレにより大血管や神経を傷つけないように採取されていることによると思われる。

下段は、Whole-mount 染色組織の共焦点顕微鏡像。脂肪細胞は黄色に、核は青色に、血管は赤色に描出されている。吸引脂肪組織は、脂肪細胞、毛細血管ともに傷害により一部破壊、断裂している。

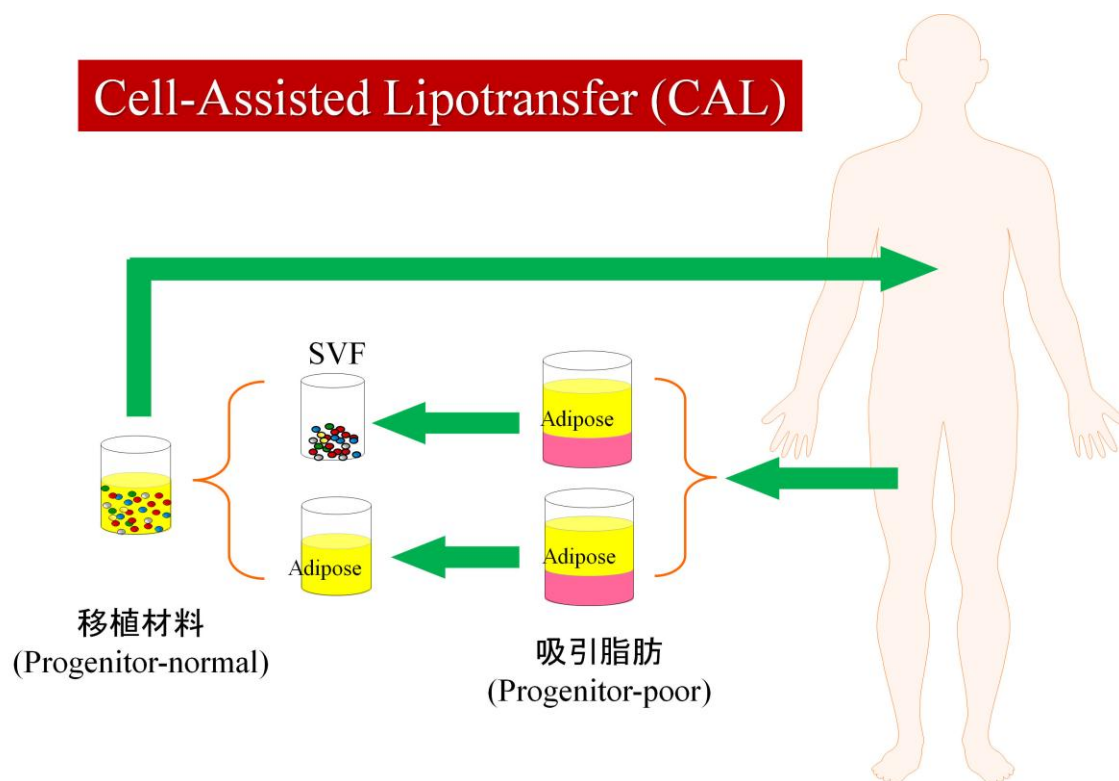


図5. Cell-assisted lipotransfer (CAL 法)の基本概念

吸引脂肪組織は切除脂肪組織に比し、含まれている前駆細胞(ASC)の数が少ない。前駆細胞が相対的に欠乏している吸引脂肪組織を scaffold とみなして前駆細胞を加えて接着させることにより、前駆細胞が正常程度に存在する脂肪組織として移植材料とする。実際には前駆細胞を含んだ間質血管細胞群(SVF)を加えている。確実に付着させて、細胞の挙動を制御することが重要である。