

氏名	永田大樹
(ふりがな)	(ながた ひろき)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成28年1月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Cardiac adipose-derived stem cells exhibit high differentiation potential to cardiovascular cells in C57BL/6 mice (C57BL/6 マウスでは心臓周囲脂肪組織由来幹細胞は心血管系細胞への高い分化能を示す)
論文審査委員	(主) 教授 石坂 信和 教授 根本 慎太郎 教授 浮村 聡

学位論文内容の要旨

《研究目的》

多分化能を有する脂肪組織由来幹細胞(Adipose-derived stem cell: AdSC)の存在が2001年にヒトで初めて証明されて以来、AdSCを用いた再生医療研究が盛んに行われている。しかし、異なった種類または脂肪組織に由来するAdSCの機能や分化能の違いに関してはほとんど知られていない。そこで皮下脂肪(Subcutaneous: SC)、内臓脂肪(Visceral: VL)、心臓脂肪(Cardiac: CA)、肩甲骨下脂肪(Subscapular: SS)からAdSCを分離し、各脂肪組織の由来によるAdSCの機能や心血管系細胞への分化能の違いについて検討した。

《方法》

C57BL/6 マウスのSC、VL、CA、SSの脂肪組織から単核球細胞(Adipose-derived

mononuclear cell: AdMNC)を分離し、各群間での細胞密度を比較し、採取した細胞を1週間培養後に得られる接着性 AdSC の密度を比較した。AdSC の増殖能は BrdU 取込率により評価した。さらに内皮細胞(Endothelial cells: EC)、平滑筋細胞(Smooth muscle cells: SMC)、心筋細胞(Cardiomycyte: CM)への分化誘導培地で培養後、蛍光免疫染色により心血管系細胞への分化能を評価した。また、FACS により各 AdMNC 及び AdSC の表面抗原発現パターンを解析した。

次に、マウスに心筋梗塞モデルを作製し、術後 24 時間後に蛍光標識した 4 種類の脂肪組織由来 AdMNC 1×10^4 個を尾静脈より投与した。投与 7 日後にその細胞集積を蛍光顕微鏡で観察した。また、SC と CA 由来 AdSC 5×10^4 個を野生型及び lacZ transgenic マウスから分離培養し、心筋梗塞誘発 3 日後に尾静脈から投与した。2 週間毎に 6 週間後まで心臓超音波検査で心機能を評価、その後、BS1-lectin を全身灌流させ、蛍光免疫組織染色法により毛細血管密度の評価と Masson's Trichrome 染色による心筋梗塞領域の定量的評価を行った。さらに、 β -galactosidase (β gal, lacZ 遺伝子転写産物) と心血管系細胞マーカーに対しての蛍光二重免疫染色を行い、SC-, CA-AdSC の虚血心筋組織における心血管系細胞への分化を確認した。

《結 果》

C57BL/6 マウスでは、脂肪組織に含まれる AdMNC 及び培養接着性 AdSC の細胞密度は、いずれも CA で有意に高値であり、CA-AdSC は他の AdSC に比べ EC、CM への分化能は有意に高かった。ただし、SMC への分化に関しては、4 群間で有意な差は認めなかった。

AdMNC の表面抗原はいずれの細胞においても CD45 (汎白血球マーカー) が高い陽性率を示す一方、幹細胞マーカーの CD105、CD34、c-Kit、CD44、Sca-1 は陰性または低い陽性率であり、CA-AdMNC では CD31 の陽性率が低かった。また、AdSC ではいずれの細胞でも CD45 が陰性化し、幹細胞マーカーは CD44 と Sca-1 で陽性率が上昇し、CA-AdMNC において特に顕著であった。

虚血心筋組織に集積した AdMNC は SS-AdMNC 群で少なく、それ以外の群間に差は認めなかった。心筋梗塞モデルマウスの心機能は心臓超音波検査により評価し、CA-AdSC 投与群では SC-AdSC 投与群と比較して有意な心機能改善効果を認めた。また、心筋梗塞領域の組織形態学的評価でも CA-AdSC 投与群で梗塞領域の有意な縮小を認めた。毛細血管密度は、SC-AdSC 投与群と CA-AdSC 投与群間で有意な差を認めなかったが、CA-AdSC 投与群では β gal 陽性かつ心血管系細胞マーカーで陽性に染色される細胞を多数認め、虚血心筋組織に集積した細胞の心血管系細胞への分化頻度が SC-AdSC 群に比べ CA-AdSC 群で有意に高いと考えられた。

《 考 察 》

AdSC は虚血組織において心血管系細胞への分化能を示したが、直接的な組織再生の他に、血管新生増殖因子産生など間接的作用も考えられる。また、比較的少ない数の細胞で治療効果が得られたのは、CA-AdSC の高い虚血組織集積性と心筋組織再生への直接的・間接的な貢献によるものと考えられる。以上より、AdSC の組織起源が細胞機能を決定する重要な因子となる可能性が示唆された。

《 結 論 》

CM-AdSC は梗塞心筋組織に高率に集積し、さらに心血管系細胞への分化能が高く、組織再生に直接関与することによって心機能を改善させる効果を有することが示唆された。CM-AdSC は、重症虚血性心疾患に対する自家または他家幹細胞移植治療のための新たな細胞ソースとして期待できる。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

脂肪組織由来幹細胞(Adipose-derived stem cell: AdSC)を用いた再生医療研究が広く行われているが、異なった脂肪組織に由来する AdSC の機能や分化能の違いに関しては報告がない。本研究は、皮下脂肪、内臓脂肪、心臓脂肪、肩甲骨下脂肪から AdSC を分離し、脂肪組織由来による AdSC の機能や心血管系細胞への分化能の違いについて検討したものである。

申請者は、C57BL/6 マウスを用いて上記 4 部位それぞれ由来の AdSC についてその細胞密度、増殖能、分化能、細胞表面抗原を比較した。また 4 部位由来の AdSC を心筋梗塞モデルマウスに投与し、虚血傷害心筋組織への細胞集積を評価した。また皮下脂肪と心臓脂肪由来の AdSC を用いて心機能改善効果と形態学的な改善効果を評価した。

4 種類それぞれの脂肪組織由来の AdSC において細胞密度、増殖能、内皮細胞と心筋細胞への分化能は、心臓周囲脂肪由来 AdSC が最も高いことが確認された。また、心筋梗塞モデルマウスにおける細胞移植実験では、心臓周囲脂肪由来 AdSC は皮下脂肪由来 AdSC に比べて有意に心機能を改善し、梗塞領域を減少させた。さらに、虚血心筋組織に集積した細胞の心血管系細胞への分化頻度は、皮下脂肪由来 AdSC に比べ心臓脂肪由来 AdSC で有意に高かった。

以上の結果から、心臓周囲脂肪由来 AdSC は心血管系細胞に分化しやすく、それらが虚血傷害心筋組織に集積し、心筋組織再生に直接貢献することにより梗塞心の心機能を改善させたと考えられる。したがって、心臓周囲脂肪由来 AdSC は、虚血性心疾患に対する新たな細胞治療のソースとして利用できる可能性が示唆される。本研究成果は、循環器領域における再生医療の発展に寄与するものと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Stem Cells Translational Medicine 5(2): 141-151, 2016