

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト脂肪組織由来 SSEA-3 陽性細胞を用いた皮膚潰瘍治療に関する研究

氏名 木下佳保里

<背景・目的>

骨髄や皮膚由来の間葉系幹細胞に多分化能を示す細胞が含まれていることが過去の報告より示唆されていたが、特異的な細胞マーカーが同定されなかったことや数が非常に少ないことから、その多能性細胞の再現には至らなかった。2010年に、自己複製能(self-renew)と、単一細胞からの内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉系への分化能を持つヒト細胞が報告され、Muse 細胞(multi-lineage differentiating stress enduring cells)と名付けられ、多能性幹細胞マーカーの SSEA-3 が陽性である特徴とされた。Muse 細胞は、増殖能が高くないものの、テラトーマ形成を認めないことから、腫瘍性増殖の可能性が低いと考えられ、安全性が高く、かつ、非 Muse の間葉系幹細胞よりも高い効果を持つ細胞治療の手段の可能性がある。さらに Muse 細胞は全身投与後に、傷害部位へ遊走し、組織特異的な細胞へ分化することが、肝臓、皮膚、骨格筋での動物実験として報告されているが、局所投与における効果はまだ知られていない。

そこで本研究では、ヒト脂肪組織由来幹細胞から SSEA-3 陽性(Muse 細胞)の分離を試み、細胞の特性を分析した。次いで、Muse 細胞の難治性皮膚潰瘍への治療効果を明らかにすべく、糖尿病免疫不全マウスの皮膚潰瘍に細胞の局所投与を行ない、有用性を検証した。

<方法>

非肥満患者から採取した脂肪組織を用いてヒト脂肪組織由来幹細胞(hASCs)を分離培養した。培養 hASCs から磁気細胞分離装置(MACS)を用いて、SSEA-3 陽性の Muse 細胞と SSEA-3 陰性の非 Muse 細胞とに分離した。得られた細胞集団の組成をフローサイトメトリーで確認し、MACS での分離方法を最適化した。分離陽性細胞群を Muse-rich 群、陰性細胞群を Muse-poor 群として、両群の遺伝子発現の相違をマイクロアレイで解析するとともに、細胞増殖因子の分泌を ELISA で比較した。次いで、両群を糖尿病免疫不全マウスの皮膚潰瘍に局所投与して上皮化促進効果を観察した。

糖尿病免疫不全マウスは、免疫不全 SCID マウスにストレプトゾトシン(STZ)を腹腔内投与し、高血糖状態を誘発させた。高血糖状態が 4 週継続した個体を皮膚潰瘍上皮化モデルに用いた。SCID マウスへの STZ 投与量についても最適化を行なった。皮膚潰瘍上皮化モ

デルはマウス背部皮膚に2カ所の直径6mm大の皮膚全層欠損創を作成し、拘縮予防にシリコンリングを逢着した。細胞投与は潰瘍周囲に4カ所の局所注射をした。創部の乾燥予防に創傷被覆材を用いた。創治癒の評価は、day0、3、7、10、14の上皮化経過を写真撮影し、写真データから上皮化の割合を画像ソフトで解析し評価を行なった。Day14で組織を採取し、投与したヒト由来細胞の追跡を免疫組織学的に行なった。

<結果>

フローサイトメトリー解析の結果、培養 hASCs は1~2%の SSEA-3 陽性細胞を含んでいた。MACS 分離方法の最適化を行なった結果、Muse-rich 群では SSEA-3 陽性細胞を約 70% まで濃縮できた。

Muse-rich 群と Muse-poor 群をマイクロアレイ解析した所、Muse-rich 群では Nanog や Sox2 を含む多能性幹細胞マーカーおよび血管形成に関わる遺伝子の発現上昇が認められた。ELISA による増殖因子の比較では、bFGF、PDGF などの増殖因子が Muse-rich 群で多く分泌され、これらは低酸素濃度下(1% O₂)でさらに分泌が亢進した。

動物実験では、マウスの背部に直径6mmの皮膚全層欠損創を作成し、上皮化を比較した。正常 SCID マウスは、wild-type マウスと比較して皮膚潰瘍の上皮化遅延を認め、糖尿病性 SCID マウスは正常 SCID マウスと比較し、さらなる上皮化遅延が見られ、創傷治癒遅延モデルとして細胞投与群の実験に用いた。糖尿病性 SCID マウスの皮膚全層欠損層の創縁に Muse-rich 細胞群もしくは Muse-poor 細胞群を局所注射し、上皮化経過を比較した。Muse-poor 投与群では、非投与群よりも創治癒促進が見られ、Muse-rich 投与群ではさらに有意な上皮化促進が認められた。組織学的には、投与したヒト由来細胞がマウス再生皮膚内に認められ、一部は血管内皮細胞へ分化していることが示唆された。ヒト由来細胞は Muse-rich 細胞投与群において、Muse-poor 細胞投与群と比較し有意に多く認められた。また、上皮化後の表皮の厚さも Muse-rich 細胞投与群の方が有意に厚かった。

<考察と結論>

本研究では、ヒト脂肪組織から Muse 細胞を分離濃縮した。分離には多能性幹細胞マーカー SSEA-3 を用いた。過去の報告でもヒト脂肪組織からの Muse 細胞分離は行なわれ、得られた細胞は SSEA-3 陽性かつ間葉系幹細胞マーカーの CD105 が陽性であり、単一細胞からの三胚葉系細胞への分化が確認されている。これらの報告では分離法に FACS やストレス負荷を用いていたが、本研究では MACS を用いた方法での濃縮に成功した。MACS での Muse 細胞分離は 100%の純度を得ることは出来ないが、簡便に大量の細胞を処理する点で実用的な方法であると考えられる。また、細胞の供給源として脂肪組織（脂肪組織由来幹細胞）を用いる点においても、骨髄由来間葉系幹細胞や真皮由来線維芽細胞を用いるよりも、骨髄穿刺や皮膚採取の必要がないことから低侵襲であり、量の面においても脂肪組織

は皮下に豊富に存在し、多量に採取できる為、優れていると考えられた。

MACS 分離によって得られた脂肪組織由来 Muse-rich 細胞群は、Muse-poor 細胞群 (hASCs とほぼ同等の細胞集団と考えられる。) と比較し、ELISA による検討で bFGF、PDGF、TGF- β 、TNF- α を含む増殖因子の分泌の増加を認めた。これらの増殖因子は、創傷治癒過程に必要であり、Muse-rich 細胞群が、これら増殖因子分泌を介して創傷治癒促進に寄与していることが示唆された。また、低酸素下(1% O₂)において増殖因子の分泌亢進を認めたことは、幹細胞がストレス条件下で更なる機能を発揮するという既知の事実に一致すると考えられた。マイクロアレイ解析では、Muse-rich 群において、NANOG や Sox2 を含む多能性幹細胞マーカーの発現上昇が認められ、多分化能が示唆された。また、EGF や PDGF が高発現し、血管形成に関わる因子の上昇も認められ、ELISA の結果や後述するマウス皮膚組織学的所見と矛盾しないものであった。

マウス皮膚潰瘍モデルを用いた創傷治癒促進効果の検討では、免疫不全 SCID マウスに STZ を投与して高血糖状態を誘発させ、糖尿病性免疫不全マウスの作成に成功した。得られたマウスは、正常 SCID マウスと比較して上皮化遅延を認め、創傷治癒遅延モデルとして妥当であると考えられた。難治性潰瘍は、虚血や慢性炎症状態であり、幹細胞の枯渇が想定され、Muse 細胞の治療対象として有用であると考えられる。この難治性モデルに、Muse-rich 細胞群と Muse-poor 細胞群の局所投与を行なった所、Muse-poor 投与群でも創傷治癒促進効果を示したが、Muse-rich 投与群ではさらに高い効果を示した。このことは、SSEA-3 陽性の hASCs 由来 Muse 細胞は、創傷治癒効果が高く選ばれた hASCs であることが期待される。組織学的には、両群において投与したヒト由来細胞が上皮化した真皮内に認められ、Muse-rich 投与群では、一部で血管内皮細胞として認められるものもあった。Muse 細胞の創傷治癒促進効果はさらなる解明の余地があるが、増殖因子分泌を促したり、投与された細胞自身が傷害組織の細胞へ分化したりすることで効果を発揮すると示唆された。

今回の研究を通じて、hASCs にも SSEA-3 陽性の多能性幹細胞が 1~2% 存在し、難治性潰瘍における創傷治癒促進効果を有することが明らかになった。この細胞は過去の報告における Muse 細胞と考えられ、増殖能は高くないものの、他の多能性幹細胞に比べて腫瘍性増殖をしない性質は臨床的にも有用であると考えられた。本研究において脂肪組織由来幹細胞から MACS で SSEA-3 陽性細胞を濃縮できることが初めて明らかにされ、皮膚潰瘍への局所投与においても創傷治癒促進効果を発揮することが分かった。本研究をさらに進めることで、安全かつ実用的な創傷治癒治療の開発および、慢性炎症や放射線傷害などの幹細胞枯渇性疾患に対する幹細胞補充療法の開発に資すると考えられた。