

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 木下佳保里

本研究はヒト脂肪組織由来 SSEA-3 陽性細胞が、難治性皮膚潰瘍の上皮化に果たす役割を明らかにするために、ヒト脂肪組織由来幹細胞(hASCs)からの SSEA-3 陽性細胞(Muse 細胞)の分離および細胞特性の分析と、免疫不全マウスにおける糖尿病性難治性皮膚潰瘍での組織解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 培養 hASCs における SSEA-3 陽性細胞の含有率をフローサイトメトリーで解析し、1～2%の SSEA-3 陽性細胞が含まれていることを示した。
2. 磁気細胞分離装置(MACS)を用いて hASCs から SSEA-3 陽性細胞の分離濃縮を試み、SSEA-3 陽性の Muse 細胞と SSEA-3 陰性の非 Muse 細胞とに分離した。抗体反応の条件検討や分離プログラムの最適化を行ない、分離後の細胞組成をフローサイトメトリーで解析したところ、分離陽性細胞群では SSEA-3 陽性細胞を約 70%まで濃縮することが出来た。得られた分離陽性細胞群を Muse-rich 細胞群、分離陰性細胞群を Muse-poor 細胞群と称し、続く実験へ用いた。
3. MACS で分離した Muse-rich 細胞群と Muse-poor 細胞群を正常酸素濃度(6% O<sub>2</sub>)と低酸素濃度(1% O<sub>2</sub>)の 2 条件下で培養し、細胞上清に含まれる増殖因子の分泌量を ELISA 法で解析したところ、Muse-rich 群では bFGF、PDGF を含む増殖因子が Muse-poor 群よりも多く分泌され、これらは低酸素下(1% O<sub>2</sub>)でさらに分泌が亢進することが示された。
4. Muse-rich 細胞群と Muse-poor 細胞群を用いてマイクロアレイを行ったところ、Muse-rich 群では Nanog や Sox2 を含む多能性幹細胞マーカーおよび VEGF を含む血管形成に関わる遺伝子の発現上昇が示された。
5. 両細胞群の皮膚潰瘍への局所投与による創傷治癒促進効果を検証する為に、難治性皮膚潰瘍モデルとして糖尿病性免疫不全マウスの作成を試みた。免疫不全マウス(SCID マウス)にストレプトゾトシンを腹腔内投与し、投与量の最適化を行なったところ、高血糖状態が誘発された。高血糖状態が 4 週継続した個体を用いて正常 SCID マウスおよび wild-type マウスとの皮膚潰瘍の上皮化比較を行なったところ、上皮化が遅延することが示された。この糖尿病性免疫不全マウスを創傷治癒遅延モデルとして細胞投与実験に用いた。
6. 糖尿病性 SCID マウスの背部皮膚に皮膚全層欠損創を作成し、潰瘍周囲に Muse-rich 細胞群および Muse-poor 細胞群を局所投与して上皮化経過を観察したところ、Muse-poor 投与群では、細胞非投与群と比較して上皮化促進が認められ、Muse-rich 投

与群ではさらに有意な上皮化促進が示された。

7. 皮膚潰瘍の組織解析を行なったところ、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、潰瘍上皮化部位に集まっていることが示された。さらに、**PECAM-1**(血管内皮細胞マーカー)、抗ヒトゴルジ抗体(ヒト由来細胞)による免疫染色では、**merge** を認め、投与されたヒト由来細胞の一部が血管内皮細胞へ分化していることが示唆された。これらの結果から、**SSEA-3** 陽性細胞は、増殖因子の分泌を介したり、細胞の一部が傷害部位の細胞へ分化したりすることで創傷治癒に関与することが示された。

以上、本論文は **hASCs** に **SSEA-3** 陽性細胞が含まれ、**MACS** で濃縮出来ることが明らかになった。この細胞は、多能性幹細胞マーカーの遺伝子発現上昇や増殖因子の分泌増加を認め、マウス糖尿病性皮膚潰瘍への局所投与における創傷治癒促進効果を示した。本研究は難治性潰瘍における治療法および幹細胞補充療法の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。