

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：富田 真央

専攻分野：心臓血管外科学

指導教授：縄田 寛

主論文の題目：

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた血管の再生

共著者：

小島 宏司、駒ヶ嶺 正英、縄田 寛

緒言

幹細胞を利用した再生医療の研究が進む中、胚性幹細胞（embryonic stem cell:ES 細胞）は倫理的問題、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell:iPS 細胞）はコストや発がん性の課題から臨床への応用が未だ厳しいのが現状である。一方、間葉系幹細胞

（mesenchymal stem cell: MSC）は中胚葉由来の自己複製・分化能を有している多能性幹細胞であり、倫理的な問題点や発がん性などのリスクを回避しやすく、組織修復を促進する成長因子を分泌するため有用性の高い幹細胞と考えられている。特に脂肪組織由来間葉系幹細胞（adipose-derived mesenchymal stem cells: AD-MSCs）は採取が容易であり、再生医療で広く活用されるようになってきた。血管の再生分野では、足場（scaffold）を用いて血管組織を構築する技術が進展しているが、小口径血管の再生や臨床応用には課題が多い。本研究では、AD-MSCs を用いた抗血栓性のある小口径再生血管の作製が可能であるのかを検討した。

方法・対象

この研究では、70～76歳の被験者4名から採取した脂肪組織を用い、AD-MSCsを分離・培養し、管腔構造を有する血管の再生が可能かを検討した。培養したAD-MSCsを用いて、セルブロックを作製し、幹細胞マーカーであるCD90、CD105、CD14、CD34、CD45、CD79 α の免疫染色を行った。骨、脂肪、軟骨への分化誘導実験を行い、ARS染色、Oil Red O染色、Alcian Blue染色によって分化誘導できるかを確認した。また、AD-MSCsをポリグリコール酸シート (Polyglycolic acid: PGAシート) に播種して細胞シートを作製し、血管誘導因子 (TGF- β 1, VEGF) を含む培地で培養した後、ヌードマウスの皮下に埋植した。埋植後に組織を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびエラスチカ・ワンギーソン (EVG) 染色を行った。また、血管内皮細胞マーカーとしてCD31による免疫染色を行った。

なお本研究で使用した脂肪組織は聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認を受け、心臓血管外科領域の治療目的で手術を行った際に余剰となった組織からのヒト細胞の安定培養法の確立と実験的応用に基づいて採取している (承認 5629 号)。比較に用いた血管は、術中に使用する内胸動脈をトリミングする際に余剰となったものを使用した。また、実験プロトコルは、聖マリアンナ医科大学動物実験委員会の承認を受けている (承認 2312001 号)。

結果

酵素処理にて単離したAD-MSCsは、全例で線維芽細胞様の紡錘形を示した細胞がコロニーを形成することを確認した。セルブロックによる幹細胞マーカーの評価では、CD90・CD105が陽性、CD14・CD34・CD45・CD79 α が陰性であることを確認した。多分化能の検討では、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導が確認された。さらに、AD-MSCsをPGAシートに播種し、血管誘導因子 (TGF- β 1, VEGF) を含む培地で培養した後、ヌードマウスの背部皮下に埋植・摘出した組織は肉眼的に管状をした血管に類似しており、弾力性に富んでいた。HE染色では、組織内に毛細血管と思われる管腔構造を認め、管腔内には血球成分が存在することが確認された。EVG染色では黒褐色を呈する弾性線維と赤色に染まる膠原線維を認めた。CD31免疫染色では管腔構造内側に血管内皮細胞の誘導が確認された。

考察

本研究では、AD-MSCsを利用して、組織工学的手法を用いた血管の再

生が可能であるのかを検討した。間葉系幹細胞（MSC）は、骨、軟骨、脂肪などの中胚葉系細胞への分化能だけでなく、免疫調節機能やサイトカイン分泌能力を持つため、近年再生医療で注目されている。しかし、骨髓由来 MSC の採取は技術面・倫理面での制約が大きいことが知られている。一方、脂肪組織は容易に採取可能で、多くの MSC が含まれており、臨床応用に適した細胞源と考えられる。

本研究で使用した AD-MSCs は国際細胞治療学会（ISCT）の基準をほぼ満たし、骨、脂肪、軟骨への多分化能も確認された。PGA シートという生体適合性の良い足場に AD-MSCs を播種し、成長因子を含む誘導培地で培養することで、血管に類似した管腔構造を持つ組織が形成された。組織学的評価では、血管内皮細胞マーカーである CD31 陽性や、弾性線維を示す EVG 染色陽性が確認され、再生血管作製への第一歩が示された。ただし、細胞密度や誘導培地の最適条件を再検討する必要性や、三層構造を有する血管壁の作製は今後の課題となった。また、新たな課題としては、AD-MSCs を凍結保存する技術の開発や、外膜、中膜、内膜を誘導する培地の設計が挙げられる。これらが進展すれば、PGA シートに AD-MSCs を層状に配置し、血栓形成を抑えた小口径の再生血管を作製できる可能性が高まる。また、「in situ Tissue Engineering」の概念に基づき、体内での自然な血管形成を促進する技術も期待される。

結論

ヒト脂肪組織より性別や年齢に関係なく、安定して間葉系幹細胞を単離・培養できた。脂肪由来間葉系幹細胞を PGA シートに撒き、組織工学的手法を用いて作製した管腔構造組織は、一部血管様の構造を呈した。将来、脂肪組織から採取した間葉系幹細胞を用いて小口径の再生血管を作製し、臨床応用できる可能性が示唆された。