

学 位 論 文 要 旨

氏名 伊藤 晴倫

題 目：マウスとイヌの脂肪由来幹細胞 (**Adipose-derived stem cells: ADSC**) の
機能的亜集団に関する基礎的研究

論文要旨：

脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived Stem/stromal Cells、以下 ADSC) は、間葉系幹細胞に属する幹細胞で、脂肪組織に存在し、脂肪細胞の前駆細胞として機能している。近年の研究において、脂肪、骨、軟骨、血管などに分化する多分化能が発見され、以来、多くの研究がなされている。しかしながら、症例間で一定の治療効果が得られないなどのばらつきや操作の煩雑さ、費用対効果等の課題などがあり、未だ保険適用を含めた臨床応用に至っていないのが現状である。

近年、ADSC が均質な細胞集団ではない可能性が示唆されており、これまでにいくつかの表面抗原マーカーによって、ADSC に含まれる複数の機能や、異なる分化能を有する亜集団が同定されてきた。しかし、過去の報告において、これらの表面抗原マーカーの機能に着目した報告は認められておらず、機能的亜集団を同定するマーカーと多分化能や分化効率の関連性に関しては不明な点が多い。

本研究では、細胞の分化や増殖、幹細胞性の維持など、細胞の機能に関与するとされる種々のマーカーを用いて、マウスとイヌの ADSC における機能的亜集団の探索を行なった。

まず、フローサイトメトリー法を用いて細胞内リン酸化タンパクの解析をマウスとイヌの ADSC に対して行なった。過去の報告で細胞の分化や幹細胞性の維持に関与していると報告されている 13 種類の細胞内リン酸化に関連するマーカーに関してフローサイトメトリー法を用いて解析を行ったところ、マウスとイヌの ADSC は β -catenin と Akt のリン酸化に類似性が認められた。対して、Stat ファミリータンパク質のリン酸化には違いが認められた。

次に、造血幹細胞やがん幹細胞を同定するマーカーとして広く用いられている ALDH 活性をマーカーに、イヌの ADSC における機能的亜集団の同定と、その脂肪と骨への分化能の差異を解析した。結果として、培養条件下でのイヌ ADSC のうちおよそ 20% が ALDH 陽性であったが、ソーティングを行った ALDH 陽性集団と陰性集団には形態や増殖率に違いは認められなかった。さらに、ALDH 陽性集団と陰性集団に対して脂肪と骨に対する分化誘導と免疫染色を行ったところ、いずれも脂肪と骨への

分化能が確認されたが、その分化効率は ALDH 陰性集団と比較して陽性集団の方がより高かった。以上のことから、イヌ ADSC には ALDH 活性の高い亜集団が存在し、これらは脂肪と骨への分化能の高い集団であった。本研究はイヌの ADSC における機能的亜集団を同定した初めての報告である。

さらに、同様の手法を用いてマウスの ADSC における機能的亜集団の同定を試みた。結果として、イヌ ADSC と同様に、ALDH 陽性集団は陰性集団と比較して脂肪と骨への分化効率の高い細胞集団であることが明らかとなった。さらに、網羅的遺伝子発現解析によって、ALDH 陰性集団と陽性集団における遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、ALDH 陰性集団と比較して陽性集団においてリボソーム生合成に参与する遺伝子セットの発現上昇が認められた。以上のことから、マウス ADSC には ALDH 活性の高い亜集団が存在し、これらは脂肪と骨への分化能の高い機能的亜集団であった。さらに、マウス ADSC における幹細胞性にはリボソームが関与している可能性が示唆された。

続いて、シスチントランスポーター (xCT) をマーカーとして、イヌ ADSC における機能的亜集団の探索を行った。xCT は CD44 と結合し、シスチンの取り込みを活性化して細胞内でのグルタチオンの産生を促進し、酸化ストレスへの抵抗性を獲得していることが明らかとなっており、これらは胃がんや大腸がんにおけるがん幹細胞のマーカーとして知られている。フローサイトメトリー法を用いて、イヌの ADSC における xCT の発現を解析したところ、CD44 陽性集団に少数の CT 陽性集団が認められた。さらに、xCT 陽性集団は幹細胞マーカー遺伝子の発現量や、脂肪分化誘導を行った時の脂肪分化マーカーの発現量が陰性集団と比較して有意に高かったが、骨分化マーカーに関しては xCT 陰性集団の方が有意に高かった。以上のことから、xCT はイヌ ADSC における機能的亜集団を同定するマーカーであることが明らかとなった。さらに、xCT は脂肪分化を促進し、骨分化を抑制するマーカーである可能性が示唆された。

以上、本研究では細胞へのストレスに対する防御機構に参与するマーカーに着目して ADSC の機能的亜集団の同定を行い、ALDH と xCT という、細胞内ストレスに対する抵抗性に参与するマーカーを用いて機能的亜集団の同定を行うことができた。いずれのマーカーにおいても癌幹細胞や造血幹細胞を同定するマーカーとして知られており、ADSC においても類似する機能を有すると考えられる。また、xCT に対する特異的阻害薬であるスルファサラジンなどの癌幹細胞をターゲットとした薬は、ADSC の疾患特異的な分化誘導を行うことができる可能性があり、今後の ADSC を用いた幹細胞治療の新たな手法を確立するかもしれない。本研究で明らかとなった ADSC の機能的亜集団に関する研究は、小動物臨床における難治性疾患に対して有用である可能性が高く、今後の臨床応用に向けた基礎的研究を行っていく必要があると考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	伊藤 晴倫
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 田浦 保穂
	副 査：山口大学 教授 中市 統三
	副 査：山口大学 教授 谷 健二
	副 査：山口大学 准教授 板本 和仁
	副 査：鳥取大学 准教授 柄 武志
題 目	マウスとイヌの脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cells:ADSC)の機能的亜集団に関する基礎的研究
審査結果の要旨： 脂肪由来幹細胞 (ADSC) は、間葉系幹細胞に属する幹細胞で、脂肪組織に存在し、脂肪細胞の前駆細胞として機能している。近年の研究において、脂肪、骨、軟骨、血管などに分化する多分化能が発見されたが、症例間でのバラツキや操作の煩雑さ等の課題などがあり臨床応用に至っていない。近年、ADSC が均質な細胞集団ではない可能性が示唆され、表面抗原マーカーによる ADSC の複数機能や、異なる分化能を有する亜集団が同定されてきた。しかし、表面抗原マーカーの機能に関する過去の報告は認められず、機能的亜集団を同定するマーカーと多分化能や分化効率の関連性に関しては不明な点が多い。本研究では、細胞の分化や増殖、幹細胞性の維持など、細胞へのストレスに対する防御機構に関与するとされる種々のマーカーを用いて、マウスとイヌの ADSC における機能的亜集団の探索を行った。 第 1 章では、フローサイトメトリー法を用いて細胞内リン酸化タンパクの解析をマウスとイヌの ADSC に対して行った。過去の報告で細胞分化や幹細胞性維持機構に関与しているとされている 13 種類の細胞内リン酸化に関連するマーカーについてフローサイトメトリー法を用いて解析した。その結果、マウスとイヌの ADSC は β -catenin と Akt (protein kinase B) のリン酸化には類似性があり、シグナル伝達兼転写活性化因子(Stat)ファミリータンパク質のリン酸化には相違を認めたことから、脂肪、骨、軟骨分化能を有するが、未分化な状態では ADSC の幹細胞性維持機構は 2 者間で異なると推察している。 第 2 章では、造血幹細胞やがん幹細胞を同定するアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 活性をマーカーに、イヌの ADSC における機能的亜集団の同定と、その脂肪と骨への分化能の差異を解析した。その結果、イヌ ADSC の約 20% が ALDH 陽性であり ALDH 陽性集団と陰性集団の形態や増殖率に差はなく、脂肪と骨への分化能も確認された。その分化効率は前者がより高かったことか	

ら、イヌ ADSC には脂肪と骨への分化能の高い機能的亜集団が存在することを初めて確認した。

第 3 章では、第 2 章の手法を用いてマウスの ADSC における機能的亜集団の同定を試みた。その結果、イヌ ADSC と同様、ALDH 陽性集団は陰性集団よりも脂肪と骨への分化効率の高い細胞集団であること、ALDH 陽性集団の網羅的遺伝子発現の方が陰性集団よりもリボソーム生成に関与する遺伝子セット発現が上昇したこと、マウス ADSC も ALDH 活性が高く脂肪と骨への分化能の高い機能的亜集団であることが確認され、マウス ADSC における幹細胞性にはリボソームの関与が示唆された。

第 4 章では、シスチントランスポーター (xCT) をマーカーとして、イヌ ADSC における機能的亜集団の探索を行った。xCT はがん幹細胞マーカー CD44 と結合し、シスチンの取り込みを活性化して細胞内でのグルタチオンの産生を促進し、酸化ストレスへの抵抗性を獲得していることが明らかとなっており、これらは胃がんや大腸がんにおけるがん幹細胞のマーカーとして知られている。フローサイトメトリー法を用いて、イヌの ADSC における xCT の発現を解析した結果、CD44 陽性集団に少数の xCT 陽性集団が存在すること、xCT 陽性集団は脂肪分化マーカーの発現量が陰性集団よりも有意に高値であること、xCT 陰性集団の方は骨分化マーカー発現量が有意に高値であること、xCT はイヌ ADSC における機能的亜集団を同定するマーカーであることが確認され、xCT は脂肪分化を促進し、骨分化を抑制するマーカーであることも示唆された。

本論文は、細胞内ストレス抵抗性に関与するマーカーの 1 つである ALDH と xCT を用いてイヌの ADSC における機能的亜集団を同定した世界初の研究である。これらはがん幹細胞や造血幹細胞の同定マーカーでもあり、がん幹細胞をターゲットとした薬 (xCT に対する特異的阻害薬であるスルファサラジンなど) を用いた ADSC の疾患特異的な分化誘導の可能性もあり、今後の動物の難治性疾患における ADSC を用いた治療の臨床応用に向けた基礎的研究としても高く評価される。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位を授与するにふさわしいと判断された。