

氏 名	やましろひろやす 山 城 大 泰
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2652 号
学位授与の日付	平成 15 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Efficient Proliferation and Adipose Differentiation of Human Adipose Tissue-derived Vascular-stromal Cells Transfected with Basic Fibroblast Growth Factor Gene (ヒト脂肪組織由来stroma細胞は塩基性線維芽細胞増殖因子を遺伝子導入することで効果的に増殖し分化する)

論文調査委員 (主 査) 教 授 今 村 正 之 教 授 中 尾 一 和 教 授 田 中 紘 一

論 文 内 容 の 要 旨

【背景・目的】脂肪組織の再生は乳腺、外傷、頭頸部領域で高い需要がある。組織再生の細胞源としてES細胞や骨髄由来細胞の利用が試みられているが、倫理的障害や回収率の低さが問題となっている。脂肪組織由来 stromal cell は脂肪前駆細胞を含み、条件によって脂肪細胞へ分化することが知られている。我々は、採取が容易な自己の脂肪組織由来 stromal cell に再生に必要な特性を付与し細胞源として使用すれば、より有効な脂肪組織再生が可能になると考え本研究を行った。

【方法】術前に承諾を得て乳癌手術標本から採取したヒト成熟脂肪組織から stromal cell を分離し、アデノウイルスベクターを用いて stromal cell の増殖因子の一つである塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を遺伝子導入し、増殖や分化に与える影響について検討した。

【結果】実験に先立って recombinant bFGF (r-bFGF) を添加すると stromal cell は濃度依存症に増殖するが、10ng/ml 以下の濃度では増殖効果がなく、100ng/ml 以上では効果がプラトーになることを確認した。また、アデノウイルスベクターを用いて LacZ 遺伝子を導入した stromal cell を β -Gal 染色し遺伝子導入効率を検討すると、重複感染度 (MOI) が10のとき96.8%の細胞に遺伝子が導入されていたので、以下の実験は MOI 10 で行った。コントロール群としてアデノウイルスベクターを用いて LacZ 遺伝子を導入した群と、遺伝子導入操作を行わない無処置群を置いた。

bFGF を遺伝子導入した stromal cell を抗 bFGF 抗体で免疫組織染色すると、遺伝子導入24時間後には核に、72時間後には細胞質外にも染色が認められ、bFGF 蛋白の発現が確認できた。

ELISA 法を用いて培養上清中の bFGF 濃度を測定すると、コントロール群では測定感度 (10ng/ml) 以下であったが、bFGF 遺伝子導入群では遺伝子導入後14日まで bFGF 蛋白の量は漸増していたが、r-bFGF が stromal cell の増殖を刺激する濃度には及ばなかった。

bFGF 遺伝子導入による stromal cell の増殖効果について MTT assay で検討すると、コントロール群に比べて遺伝子導入後7, 14日で細胞数が有意に増加しており、r-bFGF を100ng/ml の濃度で培地に添加した場合に匹敵した。また、bFGF 遺伝子導入後7日後の BrdU labeling index はbFGF 遺伝子導入群で78.5%と、r-bFGF を100ng/ml の濃度で培地に添加した場合の70.3%、LacZ 遺伝子導入の9.4%および無処置の5.0%に比べ有意に高値であった。

bFGF 遺伝子導入が増殖を刺激する機構について検討するため bFGF の中和抗体を用いて増殖阻止実験を行うと、bFGF 遺伝子導入群の増殖は中和抗体の添加によりコントロール群のレベルまで抑制された。r-bFGF を添加した群の増殖が同様に抑制されることから、bFGF 遺伝子導入により発現した bFGF 蛋白は一旦細胞外に出てから細胞表面の受容体を介して増殖を刺激しているものと推測された。

bFGF 遺伝子導入後の stromal cell 分化能を検討するため、遺伝子導入3日後にinsulin, dexamethazone等を添加した脂肪への分化条件に培地を変更し、脂肪滴を持つ脂肪細胞へ分化した stromal cell の面積を NIH image を用いて計測すると

bFGF 遺伝子導入群でコントロール群に比べ有意に増加しており、r-bFGF で増殖を刺激した後に分化条件下で培養した場合と同等であった。

【結論】 bFGF の遺伝子導入により発現した bFGF 蛋白は一旦細胞外に出てから増殖を刺激するが、培養上清中に放出される量はきわめて少ない。また bFGF の遺伝子導入を行っても成熟脂肪細胞への分化能は維持していた。従って bFGF を遺伝子導入した stromal cell は生体に移植した場合、他の増殖刺激なしで増殖するが周囲組織への影響は少ないと予想され、脂肪組織再生の細胞源として利用可能と思われる。

論文審査の結果の要旨

申請者は自己の脂肪組織から得られる脂肪前駆細胞を用いて効率よく脂肪組織の再生を図るために、その増殖因子である basic fibroblast growth factor (bFGF) の遺伝子を脂肪前駆細胞に導入して、その増殖と成熟脂肪細胞への分化程度を観察し、脂肪組織再生の脂肪源としての可能性を検討した。

申請者が術前に患者の承諾を得て乳癌手術標本から採取したヒト成熟脂肪組織から脂肪前駆細胞を含む stromal cell を分離し、adenovirus vector を用いて bFGF の遺伝子を導入し、増殖や分化に与える影響について検討したところ、bFGF 遺伝子導入した stromal cell の増殖が認められ、その程度は recombinant bFGF (r-bFGF) で誘導される増殖程度に匹敵した。培養上清中に放出される bFGF の量は同程度に増殖を誘導する r-bFGF に比べてきわめて少ないが、bFGF に対する中和抗体によりいずれの増殖も完全に抑制されることから、細胞外に放出された bFGF が増殖を誘導していることが示された。また、bFGF 遺伝子導入された stromal cell は分化条件下では成熟脂肪細胞に分化することから分化能は維持されていることも示された。

本研究は、bFGF 遺伝子を導入した脂肪組織由来 stromal cell が脂肪への分化能を維持しながら増殖することを明らかにしており、この細胞が効率の良い脂肪組織再生の細胞源として利用できることを示唆している。

以上の研究は bFGF による脂肪前駆細胞の増殖および分化の機序の解明に貢献し脂肪組織再生に寄与するところが多い。したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年7月31日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。