

## 審査の結果の要旨

氏名 松本 大輔

本研究は、骨髄に代わる幹細胞採取源として脂肪吸引物の有用性について検証し、脂肪移植の問題点解決に向けて、脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell=ASC) を応用した脂肪移植の動物実験を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 従来廃棄されてきた脂肪吸引物の脂肪層からのみならず、その下層にある廃液層からも同様の細胞群が採取可能であることを発見し、これらが、増殖能、分化能 (脂肪・骨・軟骨)、表面抗原発現プロファイルなどの点で、ASC としての特徴を持つ、脂肪層由来の細胞群と同様の細胞を含む集団であることを確認した。
2. 脂肪吸引物から酵素処理によって採取した Stromal vascular fraction(=SVF)は、ASC を含むヘテロな細胞群であるが、この SVF を採取直後に FACS を用いてその組成を検証した。main population である ASC は CD31-CD34+CD45-CD90+CD105-CD146- の集団で、脂肪由来細胞の 70%以上を占めており、その他の集団としては、血管内皮細胞ないし血管内皮前駆細胞から成る集団、血管周皮細胞あるいはその前駆細胞とも考えられる集団、線維芽細胞などを含むことが示された。
3. 培養 ASC と培養 BM-MSC (骨髄由来間葉系幹細胞) の表面抗原プロファイルを比較し、ASC でのみ発現の見られた CD34 に着目、その発現の意義について検証した。FACS にて CD34 陽性 ASC と CD34 陰性 ASC をソーティングして各々を比較すると、増殖速度は CD34 陽性 ASC が高く、脂肪・骨への分化能は CD34 陰性 ASC が高く、マトリゲル上での血管ネットワーク形成能には差が見られなかった。Real time RT-PCR を用いた血管関連遺伝子発現の比較では、VEGF、HGF といった血管新生誘導因子の分泌能においては、CD34 陽性 ASC と CD34 陰性 ASC の間で有意差が見られなかったが、Flk-1 に関しては、CD34 陽性 ASC で CD34 陰性 ASC の約 30 倍の発現が見られた。これを FACS で確認したところ、混入した血管内皮細胞以外にも CD34 陽性 ASC の一部に Flk-1 の発現があることが確認された。
4. 吸引脂肪と切除脂肪を光学顕微鏡あるいは走査電顕にて比較したところ、吸引脂肪は切除脂肪と同様に脂肪組織の基本的な構築は保たれているが、中等度以上の口径を持つ血管構造がほとんど見られなかった。また、各々から採取できる ASC 数の比較では、吸引脂肪からの採取 ASC 数は、切除脂肪からの採取 ASC 数の約 57% (平均) であり、吸引脂肪は ASC を半数近く失っていることが示された。
5. ヒト吸引脂肪組織に SVF を添加、接着させて SCID (Severe Combined Immune Deficiency)マウスに移殖したところ、SVF を添加していない脂肪よりも 3 割程度生着

率が高いことが示された。SVF を蛍光色素 DiI でラベルし、吸引脂肪に添加して SCID マウスに移殖すると、DiI ラベルされた ASC の成熟脂肪細胞間や結合組織内での生着が観察された。免疫染色の結果では、DiI と vWF (von Willebrand Factor) の両方が陽性の ASC も一部観察され、血管内皮細胞への分化が示された。また、GFP (Green Fluorescent Protein) ラットの SVF を採取し、同系の SD ラットの破碎脂肪組織に添加して移殖した実験でも、移殖脂肪内の一部の血管に vWF と GFP の両方が陽性の所見が見られ、ASC の一部は血管内皮細胞として新生血管の構築に寄与していることが示された。

以上、本論文は、脂肪吸引物より得られる SVF 中にある幹細胞様の分画の表面マーカー及び分化能を詳細に検討してその性質を明らかにするとともに、脂肪注入術に SVF を添加して用いることで、動物実験での有効性を示した。本研究は、これまで未知に等しかった SVF の組成を明らかにしたことで、幹細胞採取源として脂肪吸引物を用いる際に重要な貢献をなすと考えられ、また脂肪移殖に応用できる可能性も大変興味深い結果であり、学位の授与に値するものと考えられる。