

審査の結果の要旨

氏名 饗場 恵美子

本研究は、著者の所属する研究室で扱われているヒト脂肪由来幹細胞の安全な臨床応用への実現を目指し、自家由来の創部滲出液を同細胞の培養に利用する有用性につき検討を試みたものであり、この件を含め下記の結果を得ている。

1. はじめに、現在実際に臨床応用されているヒト多血小板血漿由来血清をはじめとする各種ヒト血清を生化学的に分析した。多血小板血漿由来血清は、全血由来血清に劣らないほど高濃度の血小板由来細胞増殖因子を含んでいたが、少血小板血漿由来血清にはそれが少なく、その有用性に限界があることが示された。

2. 細胞培養液に各種ヒト血清を添加し、実際に増殖率を検討したところ、ヒト線維芽細胞では多血小板血漿由来血清はウシ胎児血清に劣らない増殖効果を見せた。しかし、ヒト脂肪由来幹細胞や、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞では、ウシ胎児血清による培養結果に大きく及ばなかった。多血小板血漿由来血清の有用性は、血小板由来の増殖因子の作用によるものが多く、細胞によっては、その有効性が発揮されない場合があることがわかり、多血小板血漿由来血清の有用性に限界があることが示された。

3. 次に、各種ヒト血清に含まれない増殖因子の採取源として創部滲出液に着目し、これを生化学的に分析した結果、創部滲出液は主に間質液により占められた液体であり、そこに血漿が混入し、経過とともに徐々にその割合が減少していくということが示唆された。創傷治癒の早期における滲出液は、b-FGF、PDGF-BB、EGF、TGF- β 1 を高濃度に含んでおり、KGF、IL-6、MMP-8 の濃度は術後 2-3 日で最高値となり、VEGF、HGF、IL-8、MMP-1 の濃度は、術後 0-6 日にかけて徐々に増加することが示された。

4. 実際に創部滲出液を細胞培養液に添加し、ヒト脂肪由来幹細胞の培養を行ったところ、単独の添加でも増殖率は有意に増加したが、5%のウシ胎児血清を添加した上でさらに 5%量の創部滲出液を添加すると、5%ウシ胎児血清単独の添加に比べ 5.3 倍、10%ウシ胎児血清単独の添加に比べ 2.6 倍という高い増殖率を示した。創部滲出液は、多血小板血漿由来血清に含まれない b-FGF や HGF といった重要な様々な増殖因子を含むことがわかり、ヒト脂肪由来幹細胞の培養液に添加することにより増殖率は有意に増加することが示された。

5. ヒト脂肪由来幹細胞以外の細胞についても、培養における創部滲出液の有用性を評価したところ、滲出液の添加により、ヒト軟骨細胞の細胞増殖率も著明に改善した。ヒト線維芽細胞の増殖も良好であったが、ヒト脂肪由来幹細胞やヒト軟骨細胞ほどの増殖効果は得られなかった。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の培養では、創部滲出液を添加する有用性を認めることはできなかった。創部滲出液の添加により、様々な細胞の増殖に改善が見られ、創部滲出液が再生医療において、動物由来成分の代替添加物として有用である可能性が示唆された。

6. また、創部滲出液に含まれるその他のサイトカインを網羅的に解析するためサイトカインアレイを行ったところ、NT-3, 4 や GDNF といった神経系の増殖因子や、CXC ケモカインである ENA-78, NAP2, GRO、CC ケモカインである MCP-1, MIP-3 α 、アディポカインである Leptin、骨吸収代謝に関わる Osteoprotegrin などが検出された。今まで創部滲出液に含まれているという報告のない、様々なサイトカインの存在が明らかになり、滲出液の利用方法にさらなる展望が期待できるのではないかと考えられた。

以上、本論文は安全な臨床応用への道が試行錯誤されている再生医療において、自家の細胞増殖因子の採取源として創部滲出液に着目したはじめての論文といえる。今後、幅広い応用も可能と考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。