



Title	組織幹細胞を用いた血管内皮細胞分化機構に関する研究
Author(s)	岩倉, 智彦
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58557
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	岩倉智彦
博士の専攻分野の名称	博士(臨床薬学)
学位記番号	第 24529 号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	組織幹細胞を用いた血管内皮細胞分化機構に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 藤尾 慈 (副査) 教授 八木 清仁 教授 堤 康史 教授 橋本 均

論文内容の要旨

組織の修復・再生過程において血管系の形成は必須の過程である。心筋梗塞や脳梗塞、閉塞性動脈硬化症といった血管疾患の増加は著しく、それらの疾患に対する新たな治療法の1つとして血管再生療法が期待されている。これまで血管の起源となる細胞は、既存の血管内皮細胞と間葉系由来内皮前駆細胞が主に注目されてきた。しかし近年、多くの組織において多分化能を持つ組織幹細胞が同定され、その一部が内皮細胞に分化するという報告がなされている。再生医療の細胞ソースの1つとして、組織幹細胞はES細胞やiPS細胞とは異なり、腫瘍化の問題もなく有望視されており、実際に、心筋組織幹細胞を用いた臨床試験も既に開始されている。しかし、組織幹細胞が生体内において、どのような過程を経て内皮細胞に分化、誘導されるのかは未だ解明されておらず、その詳細な分化メカニズムを解明することは、新たな血管再生療法を開発する上においても非常に意義深いと考えられる。

Interleukin (IL)-6ファミリーサイトカインは心臓の恒常性維持に重要な役割を果たしている。Leukemia inhibitory factor (LIF)、IL-11などのIL-6ファミリーサイトカインは心筋細胞に作用し、glycoprotein (gp) 130/signal transducer and activator of transcription (STAT) シグナルを活性化することで心筋保護作用を示す。近年、心筋保護機構におけるSTAT3の重要性を裏付ける多くの報告がなされている。例を挙げれば、心筋特異的にSTAT3を欠損したマウスは心筋傷害性ストレスに対して感受性が増大し、逆に、恒常的活性化型STAT3を心筋特異的に発現させたマウスは心筋傷害性ストレスに対して抵抗性を示す。さらに、心筋細胞においてSTAT3シグナルはVEGFを誘導し、血管新生を促すことが報告されている。また近年、我々はSca-1陽性心筋組織幹細胞の内皮細胞への分化誘導をIL-6ファミリーサイトカインが惹起しうる事、またその内皮細胞分化にはIL-6ファミリーサイトカインによるSTAT3の活性化が必要である事を報告した。また、マウス心筋梗塞モデルにおいて、IL-6ファミリーサイトカインの発現が梗塞後に上昇する事、内皮細胞マーカーであるVE-cadherinを発現した心筋組織幹細胞数が心筋梗塞を起こしていないマウスと比較して増加している事を見出した。以上の結果より、梗塞心においてIL-6ファミリーサイトカイン/STAT3シグナルが活性化され、心筋組織幹細胞の内皮細胞分化が促進されている事が示唆された。しかし、心筋組織幹細胞においてIL-6ファミリーサイトカイン刺激によりSTAT3は数分で活性化されるのに対し、内皮細胞特異的遺伝子発現誘導には数日間を要しているため、STAT3の活性化が内皮細胞特異的遺伝子の発現を直接誘導している可能性は低いと考えられる。また、生体内においてIL-6ファミリーサイトカインにより分化した内皮細胞が、血管発生により毛細血管に取り込まれるなどの細胞運命は明らかとなっていない。

以上の背景より、本研究では、心筋組織幹細胞のより詳細な分化メカニズム、及び生体内における心筋組織幹細胞の細胞運命を解明することを目的とし、Sca-1陽性心筋組織幹細胞の内皮細胞分化時におけるSTAT3の標的

子の同定、及び内皮細胞分化に与える影響に関する検討、さらには心筋梗塞モデルを用いたSca-1陽性心筋組織幹細胞の生体内における細胞運命、機能に関する検討を行った。

生後10-12週齢の雄性C57Bl/6マウスの心臓より、MACS法を用いてSca-1陽性心筋組織幹細胞を単離した。まず、心筋組織幹細胞においてPim-1がIL-6ファミリーサイトカイン/STAT3シグナルの標的分子であることをDNAアレイ法、およびRT-PCR法を用いて見出した。さらに、IL-6ファミリーサイトカイン/STAT3シグナルによる心筋組織幹細胞の内皮細胞分化にPim-1が必要であることを示した。また、生体内における心筋組織幹細胞の細胞運命を明らかとするため、マウス心筋梗塞モデルを作製し、心筋組織幹細胞を移植することにより、梗塞心における心筋組織幹細胞の内皮細胞分化に関する検討を行った。なお、移植した心筋組織幹細胞の運命を究明するため、核移行シグナルが付加されたβ-galactosidase発現アデノウイルスベクターを用いて細胞をラベルした。移植14日後に心臓を回収し、移植細胞の内皮細胞分化を免疫組織染色法により検討したところ、移植したSca-1陽性心筋組織幹細胞がCD31陽性、またはVE-cadherin陽性内皮細胞に分化し、毛細血管に組み込まれたと思われる像が観察された。さらに、梗塞心における心筋組織幹細胞の内皮細胞への分化は、STAT3シグナルに制御されており、またPim-1シグナルの抑制により内皮細胞分化効率が低下することを明らかにした。最後に、梗塞心における心筋組織幹細胞の機能とPim-1シグナルの関与に関する検討を行った。具体的には、心エコー法により心機能を、抗CD31抗体を用いた免疫組織染色法により血管密度を検討した。その結果、Pim-1シグナルを抑制したSca-1陽性心筋組織幹細胞を梗塞心に移植すると心機能改善効果が低下し、さらに毛細血管密度改善効果も減少することが明らかとなった。

以上、Sca-1陽性心筋組織幹細胞は、心筋組織修復・再生過程において、IL-6ファミリーサイトカイン/STAT3/Pim-1シグナルにより内皮細胞に分化し、既存の血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞と並び、血管再生の細胞源として機能する可能性が示唆された。これまでの成体における血管発生 (vasculogenesis) は血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) のhomingによるものであると考えられてきた。つまり、成体における血管発生は、様々なサイトカインやホルモンにより骨髄から動員されたEPCが、損傷部位へhomingすることによって起こるものであると考えられてきた。本研究結果より我々は、組織幹細胞による、homing過程を経ない血管発生、“*in situ*-vasculogenesis”という新たな血管形成メカニズムを提唱したい。

現在、動脈硬化症に対する様々な血管新生療法が行われている。その1つとして、VEGF 遺伝子を用いた既存の血管内皮細胞を主な標的とした血管新生療法があり、また、自己血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell) を虚血部位に移植するという血管再生療法の臨床試験も既に開始された。しかし、これらの治療法においては細胞機能が低下している患者においては治療効果が低いなどの問題点があり、新たな治療法の開発が渴望されている。よって今後、本研究で得られた知見が、IL-6ファミリーサイトカインシグナルと組織幹細胞の内皮細胞への分化に焦点を当てた、血管疾患に対する新規治療法の確立に繋がることを期待する。

論文審査の結果の要旨

本論文は、IL-6ファミリーサイトカインが心筋組織幹細胞を内皮細胞へと分化誘導する分子メカニズムを詳細に検討したものである。培養心筋組織幹細胞において、Pim-1/Pim-3がIL-6ファミリーサイトカイン/STAT3シグナルの標的分子であること、さらに、IL-6ファミリーサイトカイン/STAT3シグナルによる心筋組織幹細胞の内皮細胞分化にはPim-1/Pim-3が必須であることを示した。また、このシグナル系は、生体内においても、心筋組織幹細胞から内皮細胞への分化において重要であることを、細胞移植実験により明らかにした。

本研究の結果は、組織幹細胞の内皮細胞への分化誘導を機序とした、心血管疾患に対する新規治療法の確立に繋がる重要な知見と評価できる。従来、血管形成は、①既存の血管内皮細胞の増殖・遊走によるangiogenesis、②血液中に存在する骨髄由来細胞のhoming・分化によるvasculogenesis、が重要な二つのメカニズムと考えられてきた。本研究成果は、新たな概念として、組織幹細胞が、組織修復・再生過程において、homingを経ない血管発生(*in situ*-vasculogenesis)を介して血管形成に寄与する可能性を提唱するものである。

以上から、本論文の内容は博士の学位を授与するに相応しいと考える。