

論文の内容の要旨

氏名：富塚孔明

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：脱分化脂肪細胞(DFAT)に由来するエクソソームの解析と椎間板髄核細胞に対する作用

【目的】成熟脂肪細胞を天井培養することによって得られる脱分化脂肪細胞（Dedifferentiated fat cell：DFAT）は、脂肪組織由来幹細胞（Adipose tissue-derived stem cell：ASC）に類似した多能性を示す細胞であり、再生医療の細胞源として期待できる。近年、細胞が分泌する細胞外小胞であるエクソソームが細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たすことが明らかになった。本研究ではヒト DFAT 及び ASC の培養上清からエクソソームを抽出し、エクソソームが内包する miRNA の網羅的解析を行った。さらに DFAT 及び ASC 由来エクソソームが椎間板髄核細胞(Nucleus pulposus cell: NP cell)に及ぼす作用について検討した。

【方法】同一ドナーに由来するヒト皮下脂肪組織から DFAT と ASC を調製した。それぞれ 2 日間培養後、培養上清を回収し、濃縮試薬を用いてエクソソームを分離・濃縮した。分離したエクソソームから total RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイ法を用いて網羅的な miRNA 遺伝子発現解析を行った。また DFAT 及び ASC 由来エクソソームを PKH67 で蛍光標識後、培養ウサギ NP cell へ添加し、細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡にて観察した。DFAT 及び ASC 由来エクソソームを培養 NP cell へ添加し、NP cell の細胞増殖能に及ぼす影響を経時的に評価した。さらにエクソソーム添加による NP cell の軟骨関連遺伝子の発現変化をリアルタイム RT-PCR 法にて評価した。

【結果】miRNA マイクロアレイによる網羅的解析の結果、DFAT 由来エクソソームと ASC 由来エクソソームは近似した miRNA 発現プロファイルを示した。ASC 由来エクソソーム中に検出されず、DFAT 由来エクソソーム中に検出された miRNA は 6 つ存在した。NP cell に対し作用を及ぼすことが報告されている miRNA が 7 つ検出され、この中で ASC 由来エクソソームに比べ DFAT 由来エクソソームで有意に発現が高く、NP cell に対して細胞外基質産生促進作用が報告されている miRNA として miR-93-5p が抽出された。DFAT、ASC 由来エクソソームはどちらも NP cell への取り込みが認められた。細胞増殖アッセイの結果、DFAT 由来エクソソーム群では培養液を添加したコントロール群と比較し、NP cell の増殖能が有意に増加した。リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析では、DFAT および ASC 由来のエクソソームを添加することにより NP cell における Versican、Collagen type I、Sox9 の遺伝子発現が有意に増加した。

【結論】ヒト DFAT は多種の miRNA を含有するエクソソームを分泌しており、その miRNA 発現プロファイルは ASC 由来エクソソームに近似していた。ヒト DFAT 由来エクソソームは NP cell の細胞増殖を促進し、軟骨関連遺伝子の発現を増加させることが明らかになった。DFAT 由来エクソソームは NP cell の変性を主因とする椎間板変性症に対する治療効果が期待できる。