

氏名	TRAN CAM TU		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第	7921	号
学位授与年月	平成	28年	8月 31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Analysis of the mechanism of functional endothelial progenitor cells in vivo (生体内における有用性血管内皮前駆細胞の機能解析)		
主査	筑波大学教授	博士 (獣医学)	杉山 文博
副査	筑波大学准教授	博士 (薬学)	鈴木 裕之
副査	筑波大学助教	博士 (医学)	濱田 理人
副査	筑波大学助教	博士 (医学)	瀬川 誠司

論文の内容の要旨

TRAN CAM TU 氏の博士学位論文は、有用性血管内皮前駆細胞及びマイクロ小胞の虚血皮膚片マウスモデルにおける創傷治癒機能を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

(目的) 成体幹細胞は新規の治療ツールとして注目されてきている。アルデヒド脱水酸酵素活性の低い血管内皮前駆細胞 (Alde-Low EPC) は虚血組織の治療に有効であるが、虚血皮膚片マウスモデルにおいて Alde-High EPC は創傷治癒能力がない。しかしながら、Alde-Low EPC が創傷治癒に対してどのように治癒効果があるのか十分には理解されていない。さらに幹細胞由来のマイクロ小胞 (MV) は標的細胞に機能的な mRNA、miRNA、タンパクを運び、細胞間コミュニケーションにおける重要な役割を演じていることが知られている。従って、細胞外小胞は遺伝情報伝達物質であり、治療的潜在性が注目されている。本研究において著者は Alde-Low EPC とその MV がどのように虚血組織を治癒し得るか、そしてその治癒機構にどのような分子が関わっているのか、更に Alde-Low EPC 由来の MV で形質転換させた Alde-High EPC 及び脂肪組織由来間葉系幹細胞 (AT-MS C) の治癒効果改善について検討した。

(対象と方法) EPC 及び AT-MS C 細胞は細胞培養と FACS により調整された。MV は超遠心法により分離した。mRNA や miRNA 発現解析は RT-PCR、タンパクレベルの評価は Western Blotting、タンパク・DNA 相互作用の検出はクロマチン免疫沈降 (CHIP) で行われた。EPC の HIF-1 α 、HIF-2 α 、CXCR4、

VEGF のノックダウンは shRNA によって行われた。 *In vitro* 及び *In vivo* でのマイグレーションアッセイは標的細胞の移動能力と虚血組織回復の評価ため行われた。データは標準偏差で表記され、統計学的な解析はスチューデントの *t* 検定もしくは一元配置分散分析で実施された。

(結果) HIF-1 α 及び HIF-2 α の発現レベルは Alde-High EPC より Alde-Low EPC のほうが有意に高いことが観察された。興味深いことに Alde-Low EPC 由来の MV で形質転換した Alde-High EPC は虚血皮膚片への治癒能力を改善し、SDF-1 の受容体である CXCR4 発現を有意に増加させた。Alde-Low EPC において CXCR4 発現は HIF-2 α shRNA によって抑制されたが、HIF-1 α shRNA では抑制されなかった。CHIP 解析は HIF-2 α が CXCR4 遺伝子のプロモーター領域に結合することを示した。Alde-Low EPC における CXCR4 shRNA 処置は虚血組織への移動能力を完全に消失させた。CXCR4 過剰発現 Alde-High EPC は虚血皮膚片治癒を有意に改善させたが、部分的な効果であった。加えて、Alde-Low EPC 由来の MV は AT-MSC の虚血組織への帰巢能力を改善させ、創傷治癒効果をもたらした。事実、MV 形質転換 AT-MSC は CXCR4 の発現上昇が明確に見られた。さらに MV 形質転換 AT-MSC は静脈注射後創傷部位に移動することが分かった。結果、AT-MSC 注射後 CD45⁺ 炎症細胞が首尾よく創傷部位にリクルートされることが示された。

(考察) 本研究は HIF-1 α 及び HIF-2 α が虚血の回復に重要な役割を有し、EPC における HIF-2 α が虚血組織治癒の過程において特に重要なであることを示した。また虚血組織が Alde-Low EPC 由来 MV による形質転換 Alde-High EPC の移植により回復したことより、Alde-Low EPC 由来 MV の治療ツールとしての有用性が示された。一方、経静脈的な創傷治癒効果がない AT-MSC は Alde-Low EPC 由来 MV での形質転換により創傷部位へ移動が可能となり、CXCR4 発現上昇も示したことより、CXCR4 高発現 AT-MSC は SDF1 発現が亢進する創傷部位に移動し治癒に貢献するものと考えられた。本研究において著者は虚血組織修復過程における Alde-Low EPC の CXCR4 の役割について検討し、HIF-2 α で制御されている CXCR4/ SDF1 軸が EPC の虚血組織への移動において重要な役割を演じていること、更に Alde-Low EPC 由来 MV は障害部位への帰巢能力や効果的創傷治癒能力を有する特性を得るための有用なソースであることを明らかとした。

審査の結果の要旨

(批評) 本研究は有用性血管内皮前駆細胞及びそのマイクロ小胞のマウス虚血皮膚片モデルにおける創傷治癒機能を検討したものである。著者は Alde-Low EPC の効果的な創傷治癒効果の機構として CXCR4 の発現が重要であること、また Alde-Low EPC 由来マイクロ小胞は虚血組織に対し創傷治癒効果がない Alde-High EPC や AT-MSC を経静脈的細胞治療に有用な細胞へと形質転換させる能力を持つことを明らかとした。実験結果は明瞭で論文論旨もしっかりしており論理的である。

平成 28 年 7 月 4 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。