

主論文の要旨

**Isolation and characterisation of peripheral blood-derived  
feline mesenchymal stem cells**

〔 ネコ末梢血由来間葉系幹細胞の樹立 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態外科学講座 心臓外科学分野

(指導：碓氷 章彦 教授)

佐藤 恵一

## 【緒言】

間葉系幹細胞（MSC）は、高い自己複製能や分化能、液性因子分泌能を持つ体性幹細胞の一つである。現在までに多くの基礎および臨床研究がなされ、心筋梗塞、移植片対宿主病、創傷、潰瘍性大腸炎など多岐にわたる疾患でその細胞療法の治療効果が確認されており、再生医療や免疫療法における MSC の役割は非常に大きなものとなっている。

MSC は International Society for Cellular Therapy により、プラスチックに接着性を示す紡錘形細胞で、特定の細胞表面マーカーを有し、骨・軟骨・脂肪細胞への分化能を有するものと定義されている。現在までに骨髄、脂肪、胎児性組織など様々な組織から MSC は分離されている。しかし骨髄や脂肪組織採取には侵襲を伴い、胎児性組織の場合は任意のタイミングで採取できないといった問題が存在する。末梢血は最も低侵襲に細胞を採取できるソースの一つと考えられ、近年 MSC 細胞源の選択肢として注目されている。

MSC は様々な動物種で研究され、その知見がヒト MSC の研究にフィードバックされ再生医療発展の基盤となっている。ネコは愛玩動物として人間社会に深く関わるだけでなく、神経疾患や心筋疾患などの様々な疾患モデルとなり、さらには生理学や細胞移植など幅広い分野で用いられ、実験動物としての役割も大きい。またネコの自然発症の疾患はヒトと類似する部分が多いため、新規薬剤や治療法発見の可能性を秘めている。一方でネコの幹細胞の研究報告は乏しく、骨髄や脂肪、臍帯血由来の MSC の報告が少数存在するのみで不明な点が多い。末梢血からの MSC 分離はヒト、マウス、イヌ、ウマなどで報告されているがネコでの報告は存在しない。本研究ではネコ末梢血からの MSC 分離を目指し、その細胞の性質を検証した。

## 【方法と結果】

成体ネコから頸静脈より血液を採取し、比重遠心法にて単核球を分離後に等分割し、それらを MSC の標準的な培養培地に様々なサプリメントを添加したもので培養しその影響を確認した。培養条件は加湿空気に 5%CO<sub>2</sub> を添加し、37°C とした。また 3 日目に PBS で洗浄を行い、以後 3 から 4 日毎に培地を交換した。最も一般的なサプリメントであるウシ胎児血清（FBS）を添加した培地では、経時的に単核球が減少していき 21 日目にはほとんどの細胞が消失した。単核球分離時に採取しておいたネコの自己血漿（AP）を添加した培地では、経時的に細胞が大型化し 21 日目には多数の多核巨細胞が認められた。FBS にネコの骨髄 MSC 培養馴化培地（Conditioned Medium）やネコの顆粒球単球コロニー刺激因子を添加した培地では単核球の増殖効果は認められず、紡錘形細胞は得られなかった。一方で、FBS と AP の両方を添加した培地において、7 日目に紡錘形細胞の出現が認められ（Fig.1A）、それらは増数し 21 日目にはコロニーを形成し（Fig.1B）、各細胞の形態は線維芽細胞様であった（Fig.1C）。

そこで多頭数の猫から FBS と AP の両方を添加した培地で先の実験と同様の細胞が得られるか培養を行った。また継代の可否と増殖能を確認し、培養を継代限界まで継

続した。22頭の猫から15頭(68%)で紡錘形細胞のコロニーが分離可能であった。分離できた細胞は各個体で同様で、既報にあるネコの骨髄や脂肪由来MSCと類似した形態を示していた。ほとんど全ての分離できた細胞が第5から6継代まで安定して増殖したが、その一方でほとんど全ての細胞が第7から9継代で増殖を停止した。増殖能に年齢や性別、ネコの品種に関連は認められなかった。

次いで得られた紡錘形細胞の表面マーカーをフローサイトメトリーと免疫蛍光染色で確認した。それぞれの実験には増殖した紡錘形細胞群の第2継代の細胞を用いた。紡錘形細胞はフローサイトメトリーにてCD44及びCD90が強陽性でMHC class II及びCD4が陰性もしくは非常に弱い陽性であることが確認された(Fig.2A・B)。また免疫蛍光染色においてもCD44とCD90が細胞表面で強く発現しているのが観察された(Fig.3 A・B)。

さらに得られた細胞が多分化能を有するかの確認実験を行った。増殖した第3から4継代の紡錘形細胞を用いて脂肪、骨、軟骨細胞への分化を試みた。既報にあるネコ骨髄・脂肪由来MSCをそれぞれの細胞への分化に成功したものを分化誘導培地として用いた。結果、3週間で骨細胞(Fig.4A)と脂肪細胞(Fig.4B)への分化を、2週間で軟骨細胞(Fig.5)への分化を確認した。

#### 【考察】

本研究では、ネコの末梢血からMSCを分離し培養することに成功した。つまり本研究で得られた細胞は紡錘形の形態を示し高い自己複製能を有し、特徴的な表面マーカーを発現し、脂肪・骨・軟骨細胞へと多分化能を有していたことから、ネコの末梢血由来MSCと同定した。

今回の研究においてネコ末梢血由来MSCの分離には一般的な基本培地にFBSとAP両方を添加することが必要になることが示唆された。本方法は、一般的なサプリメントであるFBSや、単核球分離の際に分離され本来は廃棄されるAPを用いたもので、特別な準備や材料が必要にならない点が有用と考えられる。特に今回APの添加が分離に繋がったことの考察とし、追加実験において継代後はAPの添加なく培養できたことや、MSCは末梢血に動員されることによってプラスチック接着能を失う可能性があるという既報を考慮すると、培地におけるFBSとAPの適切なバランスとAP由来のネコ固有の物質が接着能を改善させた可能性が考えられた。

既報ではヒトやラットの末梢血由来MSCの分離にはG-CSFの動員が必要であったとされている一方でウサギやヒツジ、ウマは骨髄と変わらない一般的な分離培養方法で末梢血由来MSCの分離に成功している。ネコにおいては培地にAPの添加が必要であり、これらのことからMSCの体内動態や分離方法には動物種差が存在する可能性が示唆された。

本研究において、増殖能や分化能、細胞表面マーカーにおいて個体差が認められた。つまりネコ末梢血由来MSCは分離できるものの、個体差を含め末梢血中に動員された細胞そのものの状態の差が存在し、性質が不均質である可能性があり、このことは

これら細胞利用の不利な点になると考えられる。しかしながら今後各種動物においてより効率的な分離・培養方法が確立され、その性質や機能が確認できれば末梢血由来 MSC は理想的な細胞源になる可能性を持つ。さらに分離・培養に有効な物質、MSC の体内動態、分離しやすい個体やその状態が把握されることによって様々な再生医療の研究発展に繋がり、末梢血由来 MSC の持つ価値は大きいと考えられる。

#### **【結語】**

本研究によって健康なネコ個体から末梢血由来 MSC を分離・培養する方法を確立した。その低侵襲な MSC の採取法は実験動物分野や医療・獣医療分野における有用性が期待される。