

京都大学	博士 (医学)	氏名	張 璽
論文題目	Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. (マウス ES 細胞から移植可能、機能的な衛星様細胞の生成)		
(論文内容の要旨) 背景 ; Duchenne 型筋ジストロフィが代表されるように、これまで進行性筋疾患に対する治療法が数多く研究されて来られたが、未だ有効な根治法の確立へは至っていない。近年新たな治療法として、幹細胞移植治療が期待されており、その中でも骨格筋幹細胞(衛星細胞)を用いた移植治療への期待が高い。衛星細胞移植が有効な治療法として確立されるためには、移植ソースとなる衛星細胞の安定した供給が不可欠であり(充分量かつ純化された衛星細胞の提供)、その供給源として ES 細胞が注目されている。 ES 細胞は全能性細胞であり、骨格筋組織(衛星細胞)への特異的かつ効率的な分化方法が確立されれば、 in vitro において大量に衛星細胞を増幅することが可能となり、 Duchenne 型筋ジストロフィを含めた進行性筋弛緩に対する根治法確立への大きな前進となる。 目的 ; mES 細胞より移植可能な衛星細胞様細胞(satellite-like cells)の分化及び純化方法の確立 結果 ; 古典的な Hanging drop embryo body forming method に plating well の Matrigel coating 、さらに induction medium に horse serum を加えることにより、 mES 細胞から効率的に移植可能な衛星細胞様細胞を生成させることに成功した。新たに骨格筋幹細胞特異的抗体として開発された SM/C2.6 抗体そして FACS vantage の手法を用いることにより、これら mES 由来衛星様細胞の純化にも成功した。純化された mES 由来衛星細胞様細胞は in vitro において高い骨格筋分化能が確認された。さらにこれら mES 由来衛星細胞様細胞を Duchenne model mouse である mdx mouse に移植することにより、 in vivo においても正常骨格筋組織 (Dystrophin 陽性) への高い分化能・生着率が認められた。 Self renewal 能力は幹細胞の特色である、 mES 由来筋組織が生着した recipient mouse に secondary damage を行うことにより(re-damage model)、これら mES 由来衛星細胞様細胞が正常幹細胞同様、高い self renewal 能力を保有していることが確認された。臨床応用を最終目標としているうえ、 teratoma 形成リスクを十分な評価することはこれら mES 由来細胞にとって必要不可欠である。その評価方法として 6 ヶ月の long term 移植を行ったところ、これら mES 由来筋組織の持続的な生着が確認でき、さらに teratoma の生成は認められなかった。これら mES 由来衛星細胞様細胞をより詳細に characterization そして純化する目的で serial transplantation を行った。その結果 serial transplantation を行うことにより移植効率を著しく(primary transplantation の 140 倍)高めることができた。以上の実験結果より、 mES から効率的に移植可能な衛星細胞様細胞を分化する方法を確立したと考える。これら mES 由来衛星細胞様細胞は in vitro と in vivo において高い骨格筋への分化能を示し、 self renewal 能力を保持しており、さらに teratoma を形成することなく 24 週に及ぶ長期生着も可能であった。これら mES 由来衛星細胞様細胞は serial transplantation 可能であり、 serial transplantation を行うことによってこれら細胞をより純化することができた。			

(論文審査の結果の要旨)

進行性筋疾患の根治法として、衛星細胞を用いた移植治療が注目されている。この治療法の確立には移植ソースとなる衛星細胞の安定した供給が必要である。申請者は衛星細胞の供給源としてES細胞に注目し、今回マウスES細胞から初めて移植可能な、機能的衛星様細胞(**satellite-like cell**)の効率的生成方法を確立した。

マウスES細胞よりハンギングドロップ法で作成した**embryoid bodies (EBs)**を、マトリゲル付着プレート上で、5%の馬血清を含む**DMEM**ベース培養液を用いて培養した。その結果、衛星細胞マーカーである**Pax7**を発現する細胞の出現を確認した。**SM/C-2.6**抗体を用いて、これら**Pax7**陽性細胞を回収した。回収した細胞は**in vitro**で骨格筋への高い分化能力を有した。さらに、**in vivo**においても、骨格筋への分化能とともに、24週に及ぶ長期生着を確認した。その生着率については、従来のマウスES細胞を用いた報告例と比較して30-50倍高い値を示した。一部の生着細胞は**Pax7**を発現したまま基底膜下に存在し、衛星細胞の解剖学定義を満たすものであった。更にこれら細胞が骨格筋の再生に貢献すると同時に、高い自己複製能力を持つことも確認した。上記の結果から、これらマウスES由来細胞が内在性の衛星細胞と同様に**Pax7**を発現しているのみならず、機能的にも内在性の衛星細胞に近い能力を持っているものと考えられる。

以上の研究はマウスES細胞から移植可能な機能的衛星様細胞を効率的に分化する方法を確立した初めての報告という点で大きな意味を持つ。これを基礎にヒトES細胞、ヒトiPS細胞を用いた研究への展開が期待できる。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 21年 6月 23日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降

