

氏名	しお た みつ たか 塩 田 光 隆
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3117 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties (筋及び神経系の特性を有する骨髄由来間質系前駆細胞の分離と性状解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 戸 口 田 淳 也      教 授 山 中 伸 弥      教 授 中 辻 憲 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell or MSC) は脂肪・骨・軟骨という古典的な3つの間葉系細胞への分化能を備えているが、それ以外にも神経・心筋・肝臓等に分化しうる事が近年数多く報告されている。この為ヒト MSC は既に骨形成不全・心筋梗塞等の複数の疾患において臨床応用され始めている。しかし MSC の生体内での局在や動向等も完全には解明されておらず、臨床応用は慎重にすべきとの意見も多い。MSC の性状・機能の詳細な解析のためマウス MSC の利用が挙げられるが、ヒトと比べマウス MSC の採取は一般的に困難である。

骨髄以外の様々な組織でも組織特異的幹細胞が同定され、各組織以外の細胞にも分化しうる可塑性が証明されている。それら組織特異的幹細胞採取において細胞塊 (sphere) 形成が利用されていることが多く、今回 sphere 形成を利用し多分化能を有するマウス骨髄間質由来細胞群の採取を試みた。

まずマウス骨髄有核細胞から血液分化抗原陽性細胞を除去し、それらを接着性の高い培養ディッシュにて培養した。24時間後に浮遊血球細胞を除去し、細胞密度を低く保ちながら継代し接着培養を続けた。培養開始から3か月以降に出現する小型の円形或は楕円形細胞を非接着条件下にて1週間培養したところ、対称性に徐々に増大する sphere が形成された。次に sphere を採取しピペットで単一細胞に分離した後、再び接着培養して細胞数を増やし以下の検討を行った。まず FACS にて表面マーカーを解析したところ Sca-1・CD13・CD44・CD105 陽性で CD45 陰性であり、MSC と類似していた。その sphere は RT-PCR にて nestin・PPAR $\gamma$ ・osf2・SOX9・myoD が陽性であった。免疫染色では sphere を構成する殆どの細胞が nestin 陽性で、細胞毎により様々な程度に染まっていた。次に in vitro で各分化条件下におくと、sphere 由来の細胞は脂肪・骨・軟骨以外に神経・骨格筋・心筋細胞の特徴を持つ細胞に変化した。最後に sphere 由来の細胞に eGFP を導入した後、心筋梗塞モデルマウスの心筋内に注入した。1ヵ月後の組織学的検討では一部心筋細胞に変化し、宿主心筋の血管増生は有意に増加していた。心臓カテーテル検査では心機能の有意な改善を認めていた。

以上の結果からマウス骨髄の sphere 由来の細胞には、脂肪・骨・軟骨に分化しうる古典的な MSC よりも多分化能を持つ細胞群が含まれている事が証明された。この培養システムはヒト MSC の臨床応用を念頭に置いた基礎検討を行う上で、優れたモデルの1つになりうると考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者はヒト間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell or MSC) の臨床応用を念頭においた基礎検討を動物実験で行うため、マウス骨髄から細胞塊 (sphere) 形成能を利用した新たな採取方法を見出し、脂肪・骨・軟骨へ分化する古典的 MSC の範疇を越えた多能性 (multipotent) 細胞群を採取した。

マウス骨髄有核細胞から血液分化抗原陽性細胞を除去し、接着性の高いディッシュに接着培養した。24時間後に浮遊血球細胞を除去し、細胞密度を低く保ちながら継代した。3ヶ月以降に出現する小型細胞を非接着条件下にて培養すると、対称

性に増大する sphere が形成された。この sphere 由来の細胞は in vitro で脂肪・骨・軟骨のみならず神経・骨格筋・心筋細胞の特徴を持つ細胞に変化した。sphere 由来細胞を急性心筋梗塞モデルマウスの心筋内に注入すると 1 ヶ月後に一部が心筋細胞に変化し、宿主心筋の血管増生は優位に増加し、心機能の有意な改善も認めた。Sphere を構成する細胞は nestin 陽性で、様々な分化能を持つ前駆細胞の集団と考えられた。

以上の研究は、神経・骨格筋・心筋への特性を持つ骨髄間質前駆細胞の採取を、マウスから新たな方法で可能とした点で大きな意味を持つ。従来の MSC と比較した基礎検討により、骨髄間質多能性細胞群の分化能保持の解明に貢献し、将来的にはヒトでの安全な臨床応用に寄与するところが多い。

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19年2月26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。