

京都大学	博士 (医学)	氏 名	栗 屋 智 就
論文題目	Selective Development of Myogenic Mesenchymal Cells from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells (ヒト ES および iPS 細胞からの筋原性間葉系細胞の選択的分化誘導)		
(論文内容の要旨)			
ヒト胚性幹 (E S) 細胞および誘導多能性幹 (i P S) 細胞は、その無限の増殖能と分化万能性という大きな特徴から、様々な疾患における病態解析・治療法開発への応用が期待されている。従来、筋ジストロフィー等の遺伝性筋疾患において、疾患研究のための骨格筋検体を十分量得ることは困難であったが、i P S 細胞を用いることで患者由来の骨格筋を実験的に再現することが可能になり、細胞レベルでの病態解析や治療法開発のための強力な実験材料となると考えられている。そのためには未分化細胞からの有効な骨格筋分化誘導法を確立することが不可欠であるが、現在までにヒト E S 細胞や i P S 細胞から実用的な骨格筋分化誘導法を示した確たる報告はない。また、骨格筋は筋傷害に対する再生能を有しており、生体由来の様々な筋原性細胞の存在が示されている。それらの細胞を用いた骨格筋再生研究が以前より試みられているが、生体から分離されたいずれの細胞集団も、生体外での増殖能や生体内での骨格筋再生能の限界により実用化には至っていない。ヒト E S 細胞や i P S 細胞から大量の骨格筋幹細胞が作成出来れば、骨格筋疾患の細胞移植療法に大きな展望が得られる。本研究では、ヒト E S 細胞および i P S 細胞の i n v i t r o での骨格筋分化誘導と分化過程で得られた細胞集団の i n v i v o での骨格筋再生能を検証した。 未分化ヒト E S 細胞および i P S 細胞を胚様体と呼ばれる細胞塊として浮遊培養した後、特定条件下で付着培養すると、7 週から 16 週程度で成熟骨格筋マーカーであるミオシン重鎖 I I 型を発現する。この条件下では神経系列細胞や心筋系列細胞などの高率な混入がみられるが、胚様体を解離し、特定条件下で再培養を行うことで、間葉系細胞が選択的に誘導可能であった。骨格筋細胞は沿軸中胚葉から間葉系細胞を経由して発生する経路が想定されているが、本研究で誘導された細胞集団は、間葉系幹細胞マーカーである C D 7 3、C D 1 0 5、C D 1 6 6、および C D 2 9 を一様に発現していることに加え、骨格筋前駆細胞マーカーのひとつである C D 5 6 を強発現しており、最終的に i n v i t r o で骨格筋ミオシンとジストロフィンを発現する多核成熟筋管へと分化した。さらにこれらの筋原性間葉系細胞は免疫不全マウスの傷害筋内に移植すると、観察期間 6 ヶ月にわたって安定して生着し、マウス骨格筋線維にヒト蛋白を発現した。移植された細胞の一部は骨格筋内の幹細胞分画とされる筋衛星細胞と同様、P A X 7 を発現し基底膜直下に存在した。二次的筋傷害に引き続いてヒト由来細胞が増加したことから、これらの細胞は単に生体内に生着するのみならず、骨格筋幹細胞分画に寄与し、筋傷害に際して再増殖し持続的な筋修復を行いうることが示された。 本法は他の分化誘導系にみられるようなセルソーティングなどの煩雑な操作や遺伝子導入といった特殊な手法を用いておらず、比較的簡便に大量の細胞が得られる点でより実用的である。また、E S 細胞および i P S 細胞由来の骨格			

筋幹／前駆細胞の生体内での骨格筋再生能はいままで十分に検証されて来なかったが、本研究において誘導された筋原性間葉系細胞は、筋衛星細胞分画への生着能と、長期にわたる骨格筋再生能を有しておりより有用であると考えられた。 以上の知見は、骨格筋疾患における E S 細胞および i P S 細胞の有用性を示し、病態解析・治療法開発、再生医療の両面において、今後のヒト E S 細胞および i P S 細胞の応用の可能性をより広げるものである。 (論文審査の結果の要旨) 本研究は、今まで不十分であったヒト ES 細胞および iPS 細胞を用いた骨格筋分化誘導法の開発と骨格筋再生能について検討したものである。胚様体形成法による骨格筋分化誘導は神経系列細胞や心筋系列細胞の混入が高率であるが、本研究における培養方法により、骨格筋分化能を有する間葉系細胞が比較的均一に誘導され、最終的に in vitro で骨格筋細胞へと分化することが示されている。本研究ではセルソーティングや遺伝子導入といった操作を行うことなく、比較的簡便な手法で目的の細胞が得られる点で以前の報告と比して独自性がある。また再生医療の観点からは、本研究で誘導した細胞が、単に実験的に筋傷害を与えた免疫不全マウスに生着するのみならず、骨格筋幹細胞と考えられている PAX7 陽性の筋衛星細胞分画にも生着し、長期の筋再生や二次傷害に対する筋再生能を持つことが示唆されており、ヒト ES 細胞および iPS 細胞から骨格筋幹細胞の性質を持った移植可能な細胞群が得られることを証明している。 以上の研究は、ヒト骨格筋疾患における in vitro での病態解析・治療法開発、in vivo での再生医療開発の両面においてヒト ES 細胞および iPS 細胞の有用性を示し、今後の研究に寄与するところが大きい。 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 25 年 11 月 1 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
--