

氏名	おかもと たけし 岡本 健
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医博第 2755 号
学位授与の日付	平成 16 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	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells (不死化ヒト間葉系幹細胞株の樹立とその分化能の多様性に関する解析)
論文調査委員	(主査) 教授 中畑龍俊 教授 開 祐司 教授 中村孝志

### 論 文 内 容 の 要 旨

骨髄間質細胞に存在するヒト間葉系幹細胞 (Human mesenchymal stem cells: 以下 hMSC) は軟骨, 骨, 脂肪, 腱など間葉系組織の種々の細胞に分化する多分化能を有し, 細胞を用いた再生医療における重要な素材として期待され様々な基礎的研究およびそれに続く臨床研究が試みられている。しかしながらその細胞数は骨髄有核細胞の0.1%以下と少なく, ex vivo において有限寿命であるため再生医療に十分な細胞数を確保することが困難であること, 特異的細胞表面マーカーが同定されていないために hMSC を骨髄細胞から単離することが困難であることなどが問題とされる。またその自己複製能や多分化能, 各系統へ分化する運命を決定する機構については未解明の部分が多い。その一つの理由として増殖能力が乏しいため, クローナルな解析が困難なことが挙げられる。そこで我々は hMSC の細胞寿命及び老化機構を解析し, 更に遺伝子導入により hMSC の不死化とクローナルな細胞株の樹立を行い, その多分化能を検討した。hMSC のテロメラーゼ活性, 継代に伴うテロメア長の変化及び細胞周期制御因子の発現の変化を調べたところ, hMSC は継代により老化に至り, その過程においてテロメア長の短縮及び p16 遺伝子の活性化が生じていることが判明した。そこで hMSC に 1) ヒトテロメラーゼ逆転写酵素サブユニット (hTERT) 及び 2) ヒトパピローマウイルス E6+E7 を, それぞれレトロウイルスベクターを用いて導入し, hMSC-hTERT 及び hMSC-hTERT-E6+E7 の遺伝子導入 hMSC を樹立した。hMSC-hTERT は細胞老化に至りテロメラーゼ活性の獲得のみでは hMSC は不死化しないことがわかった。hMSC-hTERT-E6+E7 は著明な細胞寿命の延長と安定した増殖能を示し, 継代を 50 回以上行った後も軟骨, 骨, 脂肪への多分化能を維持していた。hMSC-hTERT-E6+E7 細胞株を単一細胞由来のクローン化し, 100 クローンについて多分化能の維持につき解析を行ったところ, 骨, 軟骨, 脂肪の三方向への分化能をもつクローンから, 脂肪と骨及び骨と軟骨への二方向性を持つクローン及び脂肪, 骨, 軟骨それぞれ単方向性分化能しか有さないものまで, 計 6 種類のクローンが得られた。これらの結果より現在確立されている手法で単離される hMSC は, 増殖に関しては幹細胞としての基本的性質を欠いており, その臨床応用には特に細胞周期制御機構を解除する工夫が必要であると考えられる。また分化能が異なるクローンが得られたという事実は, hMSC が骨髄間質において未分化幹細胞から, 限定された分化方向をもついわゆる前駆細胞まで多様な段階の細胞を包括した概念である可能性が示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) は骨髄間質細胞に存在し軟骨, 骨, 脂肪など間葉系の細胞に分化する多分化能を有し, 細胞を用いた再生医療の素材として期待されるが, その自己複製能や多分化能, 各系統へ分化を制御する機構については未解明の部分が多い。本研究では hMSC の細胞寿命及び老化機構を解析し, 更に遺伝子導入により hMSC の不死化とクローナルな細胞株の樹立し, その多分化能を検討した。その結果 hMSC は継代により老化に至り, その過程でテロメア長の短縮及び p16 遺伝子の活性化が生じていた。そこで hMSC にヒトテロメラーゼ逆転写酵素サブユニット (hTERT) 及びヒトパピ

ローマウイルス E6+E7 を導入し、不死化株 hMSC-hTERT-E6+E7 を樹立した。この細胞株は著明な細胞寿命の延長と安定した増殖能を示し、かつ継代を50回以上行った後も軟骨、骨、脂肪への多分化能を維持していた。更に単一細胞由来のクローン化し多分化能を解析したところ、軟骨、骨、脂肪の三方向への多分化能をもつクローンから、脂肪と骨、骨と軟骨への二方向性を持つもの、単方向性分化能しか有さないものまで、計6種類のクローンが得られた。この結果より現行の方法により単離されたhMSCは分化能に関して多様な細胞集団であると考察された。これらの研究結果はhMSCの細胞生物学的特性の解明及び再生医療への応用に貢献するものである。

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16年3月2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。