

(書式12)

氏名	いせき まさひろ 伊関 雅裕
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成27年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻
学位論文題目	Muse 細胞移植は肝線維化モデルマウスにおいて肝細胞への直接的な分化により肝機能を改善させる
論文審査委員	主査 教授 海野 倫明 教授 出澤 真理 教授 近藤 丘 教授 仁尾 正記

## 論文内容要旨

【背景】間葉系幹細胞は、生体内の骨髄・脂肪・真皮などに存在する幹細胞であり、安全性が高く既に臨床応用が展開されている。長年、間葉系幹細胞の胚葉を超えた3胚葉性細胞への分化能が注目されてきた。本学出澤研よりこの多様な分化能を説明する **Multilineage differentiating stress enduring (Muse)**細胞が発見され報告された。Muse細胞は間葉系幹細胞に含まれる3胚葉性細胞への分化を示す多能性幹細胞であり、既存の多能性幹細胞と異なり倫理的問題がなく腫瘍化しないという点で、より臨床応用に適していると考えられる。肝不全は、急性・慢性いずれにおいても致死的な病態であり、根治療法は肝移植しかなく、ドナー臓器不足・過大侵襲などの問題があり、代替療法が望まれている。Muse細胞は、細胞移植により高い再生効果を発揮する可能性があり、Muse細胞移植が肝不全への新たな治療法として有望であると考えられた。マウスを用いて作成した2つの肝障害モデルに対するヒトMuse細胞移植の効果を評価することを主目的とした。

【方法】既報の手法に従いヒト骨髄由来間葉系幹細胞からヒトMuse細胞を単離し、Muse細胞由来 cluster (M-cluster)の形成を確認した。M-clusterから増殖した細胞の3胚葉性分化、肝細胞系への分化を免疫染色で評価した。障害肝への遊走能を、遊走能試験と、マウス肝炎モデルに細胞移植し行った体内動態試験で評価した。移植実験では細胞移植による肝機能改善効果を主に血液検査・組織で比較・評価した。免疫不全マウスに対して四塩化炭素を腹腔内投与して誘導した急性肝炎モデル・肝線維化モデルの2つのモデルを使用した。

【結果】単離した Muse 細胞・non-Muse 細胞を浮遊培養したところ、Muse 細胞からのみ

(書式 1 2)

M-cluster が形成した。さらに M-cluster から増殖した細胞の 3 胚葉性分化が確認された。また肝細胞系マーカーである DLK, AFP, CK18, CK19 陽性細胞も存在し、自発分化においても一部細胞が肝細胞系へ分化することが示された。また Muse 細胞は障害肝への遊走能も高く、全身投与後 2 週の時点で障害肝に生着していることが確認された。マウス肝障害モデルに対する移植実験では急性肝炎モデルでは血液検査上、細胞移植による機能改善効果は明らかではなかった。しかし組織学的に Muse 細胞の効率的な生着・肝細胞への分化が示された。一方、肝線維化モデルにおいては肝機能改善効果・肝線維化抑制効果の機能的な改善が示された。また同様に組織学的に Muse 細胞の効率的な生着・肝細胞への分化が示された。FISH・RT-PCR から Muse 細胞の直接的な機能的肝細胞への分化が示唆された。

Muse 細胞は肝細胞系への分化能・障害肝への遊走能があり、肝線維化モデルへの細胞移植は機能的肝細胞への分化による肝機能改善効果を発揮していることが示唆された。Muse 細胞を有効利用することにより間葉系幹細胞移植が肝不全の治療法としてより有効なものとなる可能性があると考えられた。

## 審査結果の要旨

博士論文題目 Muse 細胞移植は肝線維化モデルマウスにおいて肝細胞への直接的な分化により肝機能を改善させる

所属専攻・分野名 医科学専攻・消化器外科学分野

氏名 伊関 雅裕

Multilineage differentiating stress enduring (Muse)細胞は本学出澤研より報告された間葉系幹細胞に含まれる生体内に存在する多能性幹細胞である。Muse 細胞は間葉系幹細胞に含まれる 3 胚葉性細胞への分化を示す多能性幹細胞であるだけでなく、既存の多能性幹細胞と異なり倫理的問題がなく腫瘍化しないという点で、より臨床応用に適していると考えられている。本研究では免疫不全マウスを用いて作成したマウス肝炎モデルとマウス肝線維化モデルの 2 つの肝障害モデルに対するヒト Muse 細胞移植の効果を解析し、Muse 細胞の直接的な分化による機能改善効果を明らかにした。

既報の手法でヒト骨髄由来間葉系幹細胞から単離したヒト Muse 細胞が、Muse 細胞由来 cluster (M-cluster) を形成し、M-cluster から増殖した細胞の 3 胚葉性分化を確認した。その上で Muse 細胞から自発分化した細胞の中に DLK, AFP, CK18, CK19 陽性細胞が存在し、Muse 細胞の肝細胞系への分化を *in vitro* で新たに示した。さらに Muse 細胞の障害肝への遊走能に着目した。以前から間葉系幹細胞の障害部位への遊走は報告されていたが、*in vitro* での遊走能試験と、マウス肝炎モデルに細胞移植し行った体内動態試験の結果から Muse 細胞に non-Muse 細胞に比べて有意に効率的な障害肝への遊走能があることを新たに明らかにした。

肝炎モデルでの移植実験では、血液検査上、細胞移植による肝機能改善効果は明らかではなかったものの、組織学的に Muse 細胞の効率的な生着・肝細胞への分化が示された。一方、肝線維化モデルにおいては肝機能改善効果・肝線維化抑制効果という機能的な改善が得られたことは臨床的に非常に有望な結果である。また肝炎モデルと同様に、このモデルでも Muse 細胞の効率的な生着・肝細胞への分化が示されている。さらに Muse 細胞が宿主細胞と cell fusion することなく直接的に機能的肝細胞へ分化することを FISH および RT-PCR で新たに明らかにした。

Muse 細胞は肝細胞系への分化能・障害肝への遊走能があり、肝線維化モデルへの細胞移植は機能的肝細胞への分化による肝機能改善効果を発揮していることが示唆された。Muse 細胞移植が肝不全の新たな治療法となる可能性があることを示唆しており、非常に有益な研究成果であると考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。