

審査の結果の要旨

氏名 河瀬 陽子

近年、幹細胞を用いた再生医療の研究が注目を浴びている。臨床応用を考えた際に有用であると考えられている生体組織幹細胞、そのなかでも最も採取し易い部位であり、採取する際の患者へのリスクも少なく、再生医療への実現と利用価値が高いと考えられている皮膚由来多能性幹細胞に着目した。皮膚由来多能性幹細胞は他の生体組織幹細胞と同様に培養系での増殖能が低く、また長期培養にも成功していなかった。本研究はこの幹細胞の欠点でもある増殖能に焦点を当て、マウスの皮膚由来多能性幹細胞のクローナルな増殖および大量培養法の確立を試みたものであり、以下の結果が得られている。

1、生体組織幹細胞の欠点の一つとして挙げられる細胞数の問題点を克服するために皮膚の取得部位によるスフェアの形成率を検討した。その結果、これまでの報告である背腹部皮膚より耳介部皮膚において約4倍の形成率が認められ、より多くの皮膚由来幹細胞の取得が可能となったことが明らかになった。また継代培養を重ねるごとに約4-6倍のスフェアを形成する細胞が取得できることが明らかとなった。

2、皮膚由来の幹細胞（スフェア）が単一な細胞からクローナルな増殖によりスフェアを形成するか否かを検討するために、正常なマウスとGFPマウスの皮膚細胞を用いてゲル状の培地で共培養を行った。その結果、約97%は単一な細胞から増殖したスフェアが観察され、クローナルな増殖によりスフェアを形成することが明らかとなった。

3、皮膚由来の幹細胞に自己複製能があるか否かを検討した結果、我々は約1年半の長期継代（60回以上の継代）に成功した。また、スフェアを形成する細胞が未分化能を保持し、さらには多分化能を有するかを検討した。形成されたスフェアは神経の未分化な細胞のマーカーであるnestinなどを発現しており、Tomaら(*Nature Cell Biol.* 2001)と同様の未分化状態を保持していることが確認できた。さらに、分化条件下においては免疫学的手法を用い、ニューロン、グリア、平滑筋細胞、脂肪細胞にも分化するという多分化能を有することも確認できた。

4, フローサイトメトリーを用いて元々の皮膚細胞に発現している表面マーカーとスフェアに発現する表面マーカーとの差異を検討した。その結果、スフェア形成前に皮膚で発現すると知られている E-cadherin, Thy1.2, および CD34 などはスフェアにおいては発現が認められず、スフェアは元々の皮膚細胞とは異なる性質を保持していることが示唆された。

5, 皮膚由来幹細胞の大量培養法を確立するために増殖因子に着目した。スフェアを形成する過程で神経細胞や皮膚の細胞の増殖因子として知られている各種増殖因子を添加し、スフェアの形成率と増殖率（大きさ）を検討した。その結果、TGF- β_1 を添加した場合においてスフェアの形成率が約 2.6 倍も増加し、大きさも約 1.5 倍増加した。これらの結果は Toma らの報告の 4 倍の形成率であった。TGF- β_1 の添加による細胞増殖促進傾向が認められたため、内因性の TGF- β_1 の産生による影響を検討した。そこで、TGF- β_1 の作用を阻害するために抗 TGF- β_1 抗体をスフェア形成過程において培地に添加しスフェアを形成させた。しかし、スフェアの形成率と大きさには変化が認められなかった。このことより、細胞増殖には内因的な TGF- β_1 は作用していないことが示唆された。さらに、TGF- β_1 が濃度依存的にスフェアの形成率と増殖率に作用するか否かを検討するために 0.001 -10 ng/ml の濃度の TGF- β_1 をスフェアの形成過程に添加した。その結果、1.0 ng/ml で形成率および増殖率とも最も有意に増加することが明らかとなった。また、TGF- β_1 が bFGF および EGF との相乗効果によってスフェアの形成率や増殖率が促進するのか、個々の作用によって亢進するのかを確認するために、それぞれの増殖因子を単独または複数用いてスフェアを形成した。その結果、EGF, bFGF および TGF- β_1 の 3 つの相乗効果によりスフェアの形成率と増殖率が促進することが示唆された。さらに、TGF- β_1 を添加することによるスフェアの性質の変化を検討するために、フローサイトメトリーを用いて TGF- β_1 を添加して形成したスフェアと添加していないスフェアの細胞表面マーカーの発現の差異を検討した。その結果、両者の差異は認められなかった。また免疫化学染色法を用いて両者の分化能の差異をも検討した結果、TGF- β_1 を添加して形成したスフェアは添加していないスフェアと同様の分化能を示した。

6, TGF- β_1 が中枢神経系由来の幹細胞（ニューロスフェア）においてもスフェアの形成率および増殖率を促進するかを検討した結果、TGF- β_1 の添加は中枢神経系由来の幹細胞の増殖には促進作用が認められず、皮膚由来幹細胞に対してのみ促進作用があることが示唆された。また、フローサイトメトリーを用いて、

皮膚由来のスフェアと中枢神経系由来のスフェアの表面マーカーの発現の差異を検討した結果、ニューロスフェアにのみ Thy-1.2 および CD71 の発現が認められ、皮膚由来の幹細胞とは異なることが示唆された。

7, 加齢に伴うスフェア形成率および増殖率を検討するとともに各ステージにおける TGF- β_1 の作用を月齢 3, 6, 12, 18, 24 ヶ月のマウスを用いて検討した。その結果、加齢に伴いスフェアの形成率および増殖率は減少傾向を示すものの、各ステージにおいて TGF- β_1 の添加はスフェアの形成率および増殖率に対して促進傾向にあることが示唆された。

以上により、本論文は、皮膚由来幹細胞のゲル培養を確立し、単一細胞からクローナルに増殖したスフェアの形成および約 1 年半の長期培養（60 回以上の継代）に成功したことを明らかにした。また TGF- β_1 をスフェアの形成過程に添加することにより、より多くの皮膚由来幹細胞が取得できることが明らかとなった。本研究は、生体組織幹細胞の欠点である増殖能の低さを克服する一つの方法として有効であることが示唆された。さらに、より効率的に神経細胞やグリア細胞への誘導が可能となれば再生医療への応用に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。