

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名：梶山弘光

本研究はマウスの体内に存在する組織幹細胞を用いてインスリン依存性糖尿病モデルマウスに対する細胞治療に取り組んだものである。生体内には骨髄由来間葉系幹細胞、神経幹細胞、そして脂肪幹細胞（adipose tissue-derived stem cells, ASCs）などの様々な組織幹細胞が存在することが知られている。その中でも本研究では ASCs に着目した。その理由として、ASCs は、体内に豊富に存在する皮下脂肪から大量に採取できる点で細胞数の確保が容易であり、骨髄の採取に比べて細胞採取に伴う危険度も低く、*in vitro*での実験で、肝臓や筋肉など多系統の細胞への分化の可能性が示唆されており、移植後にガン化したという報告が未だない、からである。これらの利点は、もし仮に ASCs がインスリン依存性糖尿病に対する移植治療へ応用可能であることが証明されれば、早期の臨床応用を目指す上で画期的なドナー細胞となりうることを示している。しかしながら ASCs のもつ多分化能については、十分な知見は未だに得られていないのが現状である。そこで本研究では、分化誘導を行ったマウス ASCs のインスリン依存性糖尿病に対する治療効果を評価するために、同細胞をインスリン依存性糖尿病モデルマウスへ移植し、ドナー細胞としての応用可能性について検討を行った。

本研究の構成は大きく 3 つに分けられる。第一にインスリン依存性糖尿病モデルマウスの作製、第二にドナー細胞となる ASCs の分化誘導、第三に得られたドナー細胞のインスリン依存性糖尿病モデルマウスへの移植と治療効果の評価、である。

まず、インスリン依存性糖尿病モデルマウスの作製を試みた。インスリン依存性糖尿病を誘発させる薬剤として広く使用されているストレプトゾトシン（STZ）を C57BL/6J マウスに投与し、インスリン依存性糖尿病モデルマウスを作製した。STZ 投与群のマウスでは STZ 投与 5 日後に血糖値が上昇し、かつ血清インスリン濃度及び耐糖能が低下していた。また膵組織切片を免疫染色により評価したところ、STZ 投与群のマウスの膵臓ではインスリン産生細胞が特異的に破壊されていた。以上の結果より、STZ 投与群のマウスはインスリン依存性糖尿病の病態を表していたため、インスリン依存性糖尿病モデルマウスの作製に成功したと結論づけた。

次に、ドナー細胞の作製を試みた。本研究では ASCs をインスリン依存性糖尿病に対して治療効果を有するドナー細胞へと分化させるために *in vitro* で誘導を行った。その際に、特に本

研究では、従来の *in vitro* で終末分化させてから移植する手法ではなく、*in vitro* では終末分化させずに幹細胞の状態に移植する手法に着目した。その理由は、現在、1 型糖尿病に対する細胞移植医療の現場では膵幹細胞及び膵前駆細胞を移植ソースとする手法が注目されつつあるためである。そこで本研究では *in vitro* において分化誘導する際に、その方針を立てる上で着目した点は、ASCs を膵臓インスリン産生細胞への分化系譜へ方向付けすることである。*in vitro* で幹細胞を方向付けることにより、移植後に *in vivo* 環境下でインスリン産生細胞へと分化を進めやすく、かつ生体内のインスリン産生細胞と類似した機能を有した細胞へと成熟分化させることができる、と考えたからである。そこで *in vitro* での分化の方向付けを行う上で、膵臓の発生分化に関わる転写因子の中でも、中心的な働きを担う転写因子の 1 つである Pdx1 に注目し、レトロウイルスを用いて Pdx1 を ASCs へと導入することとした。レトロウイルスを使用した理由は、ASCs の分化状態の方向性を変えるためにはこの Pdx1 を大量に、かつ長期間発現させる必要があると考えたためである。こうして *in vitro* ではまだ終末分化させていない、インスリン産生細胞への分化系譜へと方向付けされたドナー細胞 (Pdx1-ASCs) を作製した。

この作製したドナー細胞を、インスリン依存性糖尿病モデルマウスに移植した。その結果、インスリン依存性糖尿病モデルマウスの飽食時血糖値が 10 週以上低下し、同時に血清インスリン濃度及び耐糖能が有意に上昇したことを示した。またドナー細胞移植群のマウスの膵組織切片を免疫染色により解析した結果、ドナー細胞が膵臓において本来インスリン産生細胞が存在していたと考えられる位置に生着しており、かつインスリンを産生していたことが明らかになった。さらにドナー細胞のガン化は認められず、安全性の高い細胞であることが示唆された。

本研究を通じて、2 つの大きな発見がなされた。1 つ目は Pdx1 の一因子のみで ASCs をインスリン産生細胞の分化系譜へと方向付けることが可能であること、2 つ目は終末分化させていないドナー細胞を移植することにより長期間病態の改善が可能であること、である。これらは本研究から得られた極めて重要な知見であり、ASCs の再生医療への応用可能性を再認識させ、かつ今後 ASCs を中心とした細胞移植研究に大きく貢献すると考えられる。

したがって、本審査委員会は博士 (学術) の学位を授与するにふさわしいものと認定する。