

論文の内容の要旨

論文題目： 幹細胞移植治療に向けた階層的研究所
に対する細胞工学的アプローチ

氏名： 湯川 博

【概要】

再生医療として注目される幹細胞移植治療は大きく分けて、幹細胞の創出、培養・分化、そして移植の3つのステップから構成される。この治療法を確立するためには、各ステップに対して細胞工学、生体材料工学に基づいた様々な要素技術の確立が不可欠であり、且つそれらの技術を階層的に導入することが有効であると考えられる。

本論文では急性肝不全に対する幹細胞移植治療に求められる工学的な要素技術の構築を目指すべく、「幹細胞保存・創出研究」、「細胞修飾研究」、「イメージング研究」、及び「細胞送達研究」について取り組み、その成果について第I～V編の編成で纏めたものである。

【各論】

第I編：序論

第I編は序論であり、第1章として、まずは研究の背景となる再生医療、幹細胞、及びそれらの研究動向について概説した。そして、本論文の主題となる急性肝不全に対する幹細胞移植治療に向けた細胞工学的研究の意義と目的を述べ、治療を目的とした医学博士論文との違いを明確に示した。

第II編：幹細胞保存・創出研究

第II編は幹細胞保存・創出研究として、第2章では、脂肪組織由来幹細胞(ASCs)を長期保存するための凍結保存液について検討した。これまでの凍結保存液は感染症の原因となる血清が含有されているものが多く、臨床での使用が困難であった。そこで我々は、肝細胞や膵島細胞の保存に使用され、細胞膜保護効果が報告されているセリシンに注目した。セリシンを

培養液に添加して凍結保存を試みたところ、血清を添加しなくても、解凍後の生存率が同程度に維持されることが分かり、また幹細胞の多分化能(骨分化能)も保持されていることを確認した。すなわち、本章ではセリシンが血清の代替品と成り得ることを明らかにする事が出来た。

第3章では、肝細胞への高い分化効率が期待される新しい幹細胞の創出について検討した。ASCsの肝細胞への分化は既に確認されているものの、継代を重ねることによって分化効率が低減する問題がある。我々は肝臓と同じ内胚様系に属し、膵島移植で使用される膵島を抽出する際に廃棄される non-islet-cells に注目し、その中から幹組織由来幹細胞(Pancreatic Stem Cells : PSCs)を抽出した。この細胞は150回以上の継代が可能であり、細胞老化も見られず、未分化状態でマウスに移植しても腫瘍形成を認めなかった。また肝細胞への分化を確認し、継代による分化効率の低減も認めなかった。すなわち、本章では急性肝不全に対する幹細胞移植治療における新しい幹細胞源として期待されるPSCsの樹立に成功した。

第Ⅲ編：細胞修飾研究

第Ⅲ編は細胞修飾研究として、第4章では、幹細胞に安全にかつ効率的に遺伝子を導入できる方法について検討した。これまでの遺伝子導入方法は臨床応用を想定すると、細胞を調整する過程が多く、非効率であった。我々は他のウイルスベクターと比較して高い安全性を示し、既に日本でも臨床応用されているセンダイウイルスベクターを用いて、幹細胞が浮遊している状態における遺伝子導入方法の有用性について確認した。幹細胞を浮遊状態にして感染させることにより、これまでの接着状態での感染方法と比較して、移植前の細胞調整作業が短縮されることに加え、効率的に遺伝子が導入されることも分かった。すなわち、本章では新しい細胞修飾手法として浮遊状態における遺伝子導入方法が有用であることを明らかにする事が出来た。

第5章では、幹細胞に安全にかつ効率的に機能物質を導入する手法として、膜透過性ペプチド(Cell Penetrating Peptide : CPP)に注目した。CPPはウイルスがその表面に持ち、細胞に侵入するための鍵の役目を果たすペプチドである。細胞内に直接機能物質を導入する手法としては、マイクロポレーション法、カチオン性脂質、そして高分子ナノキャリアなど多くの方法が挙げられるが、安全性、汎用性、そしてコストなどに問題がある。本論文では、CPPの一種であるオクタアルギニンペプチド(R8)によって、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells : iPS細胞)に対して、テキサスレッド、ローダミンのような機能物質を導入することが可能であることを始めて確認し、加えて、CPPにより機能物質を導入されたiPS細胞が毒性を示さず、未分化能も維持していることを確認した。すなわち、本章ではCPPが幹細胞に対する細胞修飾に有用であることを明らかにする事が出来た。

第Ⅳ編：イメージング研究

第Ⅳ編はイメージング研究として、蛍光物質や磁性粒子により幹細胞を標識する手法、及び移植後の幹細胞イメージング手法について検討した。これまでの幹細胞移植では移植後の

幹細胞の体内挙動や集積臓器に関する情報が不十分であり、臨床におけるインフォームドコンセントの観点からも、これらを解決できる技術開発が強く望まれている。第 6 章では、蛍光材料として高い量子収率、鮮明な色輝度を示し、かつ光退色耐性に優れている量子ドット (Quantum Dots : QDs) に注目し、ASCs に対する標識手法を検討した。QDs 単独では ASCs の標識は困難であった。第 5 章で紹介したカチオン性脂質を用いると、QDs が ASCs 内に導入され標識できることを確認したが、比較的低濃度で毒性が認められた。しかし、第 5 章で示した CPP を用いることで、毒性の発現が抑制され、短時間で効率的に標識できることを確認した。また移植後の蛍光 *in vivo* イメージングが可能であることを確認した。すなわち、本章では CPP である R8 による QDs を用いた新しい幹細胞の標識技術の構築に成功し、これを用いた蛍光 *in vivo* イメージング手法の有用性についても明らかにする事が出来た。

第 7 章では、磁性ナノ粒子に注目し、効率的な ASCs の標識に加え、移植後の深部の *in vivo* イメージングについて検討した。市販されている肝臓の造影剤であるリゾビスト®を製造販売している名糖産業(株)と共同で、第 3 級アミンを末端に有するデキストランを酸化鉄に被覆させることで、表面がプラス電荷に帯電した新規磁性ナノ粒子(TMADM)の開発に成功した。TMADM を用いる事で前処理を施すことなく、効率的に ASCs を標識できることを確認した。また、深部の磁性 *in vivo* イメージングが可能であることを確認した。すなわち、本章では幹細胞を安全にまた効率的に標識できる新規磁性ナノ粒子(TMADM)の開発に成功し、これを用いた磁性 *in vivo* イメージング手法の有用性についても明らかにする事が出来た。

第V編：細胞送達研究

第V編は、第8章に細胞送達研究として、Heparin が急性肝不全マウスに対し、尾静脈から移植した ASCs の肝臓への集積に有用であるかについて検討した。第5章及び第6章で紹介した CPP を用いた蛍光 *in vivo* イメージング手法を用いて、ヘパリンの同時投与が、ASCs の肺への集積を約 90% から約 70% に緩和し、肝臓への集積を約 10% から約 30% に向上することに貢献することを確認した。また、今回用いた蛍光 *in vivo* イメージング手法が、開腹することなく ASCs の臓器集積をモニターできる優れた方法であることを確認した。すなわち、第8章では、第5、6章で構築した手法を用いることで、ヘパリンが ASCs の肝臓集積に有用であること、また今回構築した手法が開腹することなく幹細胞の臓器集積をモニターできる優れた手法であることを明らかにする事が出来た。

第VI編：総括

第VI編は、第9章に本論文の総括と、今後の展望を述べた。すなわち、本論文において、幹細胞の保存・創出、細胞修飾研究、イメージング、及び臓器への細胞送達など、幹細胞移植治療の基盤となる様々な細胞工学的手法を確立し、その有用性を示すことができた。本論文の成果が細胞工学及び幹細胞移植治療の発展に大きく貢献することを期待する。