

Title	骨髄細胞を用いた遺伝性筋疾患治療の基礎的研究
Author(s)	深田, 宗一郎
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44139
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	深田 宗一 朗
博士の専攻分野の名称	博士 (薬学)
学位記番号	第 17775 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	骨髄細胞を用いた遺伝性筋疾患治療の基礎的研究
論文審査委員	(主査) 教授 山元 弘 (副査) 教授 八木 清仁 教授 真弓 忠範 教授 岡部 勝

論文内容の要旨

幹細胞とは、自己複製能と分化能を併せ持った細胞であり、種々の組織に存在することが知られている。血液、皮膚、腸上皮、精子などの細胞はいったん分化・成熟すると、それぞれ定まった寿命をもって死滅する。これを補給するために幹細胞は存在し、分化・成熟することにより成体の **homeostasis** を維持している。

ごく最近まで組織特異的に存在する幹細胞は、自ら存在している組織の **homeostasis** を維持する能力、言い換えると組織特異的娘細胞を作り出す限られた能力しか持たないと考えられていた。しかし近年の様々な報告により、成体内の組織特異的幹細胞には可塑性あることがわかってきた。また骨髄においては極めて全能性に近い多能性幹細胞が存在することが明らかにされてきている。この多能性幹細胞と組織特異的幹細胞の相互関係についてはまだ明らかにされていないが、再生医療の面から非常に注目を集めている分野である。この分野では ES 細胞も脚光を浴びているが、倫理的な面や自己の細胞を利用できる点などを考慮すると成体多能性幹細胞は利点が多い。

そこで私は成体骨髄に存在する多能性幹細胞、特に骨髄中の筋前駆細胞に注目し、未だ治療法の確立していない遺伝性筋疾患を改善・治療する事を目的に研究を始めた。まず、「骨髄細胞が筋肉細胞に分化する」というこれまでの報告の再現を試みた。

まず、GFP-Tg マウスの骨髄細胞を用いることにより **donor** と **recipient** を判別できる移植の実験系を確立した。移植の実験系として **busulfan** を用いた新生仔移植と **radiation** による移植の二種類試みた。その結果両方の実験系で GFP 陽性、つまり骨髄由来の筋繊維が確認できた。しかし GFP 陽性の筋繊維数は少なく遺伝性筋疾患治療が期待できるとは考えられなかった。

そこで私は移植効率改善を目的に以下の 4 つの **strategy** をたてた。

1. 筋肉に分化する細胞の濃縮を目的とした抗体の作成
2. 筋前駆細胞の **source** が骨髄以外どここの組織にみつかるか?
3. 骨髄筋前駆細胞と筋組織特異的幹細胞—**satellite cells**—の関係
4. 筋組織での筋再生の細胞性、分子性メカニズムの解析

である。1、2は筋前駆細胞の数的・質的問題をクリアするために、3、4は骨髄由来筋前駆細胞が生理的に働く意味合いを理解することにより、効率を上昇させるためにおこなった。

1の検討の結果、筋組織に存在する幹細胞 **satellite cell** に対する新規モノクローナル抗体を樹立でき、この抗体は

筋組織からこの幹細胞を分離できることが確認できた。satellite cell の多くに関しては解明されていない。細胞表面抗原もその一つである。今回樹立できたモノクローナル抗体はそういった面でも非常に興味深い。また、この抗体を使うことにより naive な satellite cell を集めることが可能になった。このことは謎の多かった satellite cell を一気に解明できる可能性を秘めている。遺伝性筋疾患治療の場合この satellite cell の機能が不完全もしくは枯渇するために病状が進行すると考えられている。そういった面からも今回 satellite cell に対する新規モノクローナル抗体は樹立できたことは非常に意義があり興味深い。

2つ目の検討の結果では骨髄以外に胎児肝臓や胎児血液にも筋前駆細胞が存在することが分かった。さらに、骨髄中よりも胎児肝臓の方が筋前駆細胞の頻度はかなり高いことも分かった。この結果は造血幹細胞と多能性幹細胞の関係を考える上でも興味深くまた、実験的に多能性幹細胞を採取するには胎児肝臓が一番いい実験材料であることを示唆している。また、胎児血液に筋前駆細胞が存在するという結果は臨床的には臍帯血も遺伝性筋疾患治療に可能であることを示すものである。

3つ目の検討の結果骨髄中の筋前駆細胞は satellite cell に分化することが示唆された。satellite cell の起源は今のところ分かっていない。2つ目、3つ目の結果は satellite cell の起源を提案するとともに、骨髄中の筋前駆細胞と satellite cell の関係を示した初めての結果となった。

4つ目の検討の結果、筋再生過程においてマクロファージの浸潤が必須であることがわかった。筋再生過程にマクロファージが必須であることは言われていたが、その決定的な証拠は存在していない。今回私は Macrophage Colony stimulatory factor receptor (M-CSFR) に対するモノクローナル抗体を使用することにより、筋再生過程におけるマクロファージの機能を抑制することができた。つまり、他の細胞には影響を与えず、マクロファージのみを抑制した結果でも筋再生は異常を起こすことを示した。

4つの strategy をたて、研究を行った結果、全ての実験で新しく、興味深い結果を得ることができたが、遺伝性筋疾患治療を考えた場合いますぐ臨床応用出来るものではなかった。しかし、今回私が行った研究により新しい考え方、現象を定義できた。将来的に遺伝性筋疾患治療を行う場合まだ解決しなければならない幾つもの研究課題も残されている。例えば、骨髄から筋前駆細胞を濃縮する系の確立や、骨髄中筋前駆細胞の *in vitro* での増幅である。一つ一つのハードルがクリアされ、一日も早い治療の普及、患者の病気克服を願うとともに、その一端でも私の研究が貢献することを切に願う。

論文審査の結果の要旨

遺伝性筋疾患、特に筋ジストロフィーは、骨格筋が変性と壊死を繰り返す進行性の遺伝性筋疾患の総称で、ジストロフィンをはじめとした種々の骨格筋構成タンパク質の異常によって引き起される致命的な疾患である。現時点で有効な治療法はないが、近年遺伝子治療法の適用が研究されている。一方遺伝子治療法以外に、最近、再生医学的治療法にも注目が集まっている。その理由に、マウスやラットの骨髄中に筋肉に分化し得る細胞が存在すること、さらに骨髄細胞移植でドナー由来細胞が筋再生に参加していることが示されたことが挙げられる。

本研究では、筋細胞生理学的基礎研究を進めるとともに、再生医学的治療法が遺伝性筋疾患の治療に適用できるか、治療法の確立のためにはどのような問題点があり、それはどのような方法で解決していけるかという点に焦点を絞って研究を進め、以下のことを明らかにした。

1. 放射線照射骨髄キメラマウスを作成し、その筋肉を精査することで、骨髄細胞が筋細胞に分化できることを明らかにした。
2. 骨髄細胞以外にも、マウス胎児肝細胞や胎児血液細胞中にも筋肉に分化し得る細胞が存在することがわかった。
3. 新生児キメラマウスでは、移植したドナー細胞の一部が骨格筋内幹細胞である筋衛星細胞に分化した。骨髄や胎児肝の幹細胞と筋肉内幹細胞との関係を示す興味深い知見である。
4. 筋前駆細胞を選択的に濃縮するために、筋衛星細胞に対する新規モノクローナル抗体を作成し、筋組織から筋衛

星細胞を効率よく回収することができた。

5. 筋再生の細胞学的研究から、再生過程ではマクロファージの浸潤が必須であることがわかった。

以上の知見のうち2～5については世界に先駆けた研究成果であり、これら成果を発展させることで、遺伝性筋疾患の再生医学的治療法の基礎研究がさらに進むものと思われ、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。