



Title	骨髄由来幹細胞による消化管再生治療の基礎的検討
Author(s)	林, 裕二郎
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48904">https://hdl.handle.net/11094/48904</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	はやし 林 裕 二 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (保健学)
学位記番号	第 2 1 8 9 3 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科保健学専攻
学位論文名	骨髓由来幹細胞による消化管再生治療の基礎的検討
論文審査委員	(主査) 教授 三善 英知 (副査) 教授 松浦 成昭 教授 杉山 治夫

#### 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】間葉系幹細胞 (MSC) は骨髓由来細胞から接着性などの特徴を利用することによって、血球系細胞と分離し、*in vitro* で増殖が可能である。MSC はその多分化能の高さから再生医療において新たな治療法的手段として非常に期待されている。そこで本研究では MSC の胃壁局所移植が潰瘍治癒に与える影響を検討した。

【方法】雄 SD ラット (7 週齢) 大腿骨、脛骨より骨髓細胞を採取後、培養皿にて  $\alpha$  MEM 培地 (10% FBS 含有) で培養し、3~5 継代することにより骨髓由来 MSC を樹立した。同系雌ラット (7 週齢) の胃に岡部ら (*Am J Dig Dis.* 1971) の方法に従い 100% 酢酸を胃に 60 秒接触させることにより、穿通性胃潰瘍である酢酸胃潰瘍を作成した。ラット生体内で MSC の動態を観察するため、PKH67 (緑色蛍光色素) で標識した MSC  $1 \times 10^7$  cells を潰瘍作成後、潰瘍近傍の粘膜下層 5 箇所をわけ 29 ゲージ注射針で局所投与した。対照群としては PBS を投与した。細胞投与後、3 日、6 日、9 日目にラットを安楽死させ、潰瘍の治癒を肉眼的、組織学的に観察した。また、MSC 潰瘍治癒促進機序について検討するため、MSC が発現する増殖因子を中心に *in vitro* と *in vivo* で調べた。そして VEGF 中和抗体が MSC の潰瘍治癒促進に与える影響を調べた。

【結果】胃の潰瘍径がほぼ最大となる酢酸潰瘍作成 3 日後の潰瘍面積は両群間で有意差はなかったが、潰瘍作成 6 日後、9 日後の潰瘍面積は MSC 投与群で対照群に比して有意に小さかった。免疫組織学的に検索したところ、MSC は潰瘍周辺の粘膜下層に生着しており VEGF、HGF を発現していた。*in vitro* の条件下で MSC は損傷治癒に重要な因子である血管内皮細胞増殖因子 VEGF、肝細胞増殖因子 HGF mRNA を発現しており、特に VEGF の発現が著明であった。そこで同じモデルのラットに VEGF 中和抗体を投与したところ、MSC 投与群でみられた潰瘍治癒促進効果は VEGF 中和抗体の用量依存的に抑制され、VEGF 中和抗体  $10 \mu\text{g}$  の用量で対照群に比して有意に抑制された。

【まとめ】MSC 胃壁内投与により、MSC は粘膜下層に生着し胃潰瘍治癒を促進した。MSC は *in vitro*、*in vivo* のいずれの条件下でも VEGF、HGF を発現していた。この結果より MSC の潰瘍治癒促進効果には VEGF、HGF が関与し、免疫中和実験により特に VEGF が重要であることが示された。MSC 局所移植は実地臨床の場においても内視鏡的に移植できる可能性があるため、新たな消化管再生治療法として期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

消化管は多種多様な細胞が混在し、それ自身が内胚葉由来であるため、再生が最も難しい臓器であると考えられていた。しかしながら、最近になって中胚葉由来である骨髄細胞が消化管上皮細胞にも分化 (transdifferentiation) することが報告され、再生医療において非常に注目されている。本研究では、骨髄由来細胞の幹細胞に着目した。ラットの胃に酢酸潰瘍を作成し、ラット大腿骨、脛骨から採取した骨髄細胞を分離し、継代培養して得た間葉系幹細胞 (MSC ; Mesenchymal Stem Cell) を潰瘍作成周辺部に5箇所に分けて局所投与 (移植) した。胃の潰瘍径は酢酸暴露3日後にはほぼ最大となり、この時点では MSC 投与群と対照群の間に有意な差はみられなかったが、6、9日後の潰瘍径は MSC 投与群が対照群に比べ有意に小さく、MSC が潰瘍治癒を促進することを示した。また、MSC が潰瘍治癒を促進する機序について検討した。MSC は多様な増殖因子、サイトカインを分泌するが、この研究で注目したのは組織の修復に関する増殖因子である。継代培養後 MSC の mRNA を解析した結果、血管内皮増殖因子 (VEGF ; Vascular Endothelial Growth Factor)、肝細胞増殖因子 (HGF ; Hepatocyte Growth Factor) が発現しており、特に VEGF の発現が著明であった。そこでラット酢酸胃潰瘍の実験において、MSC と VEGF 中和抗体を同時に投与したところ、VEGF 中和抗体は用量依存的に MSC の治癒促進効果を抑制した。MSC の局所投与は潰瘍治癒を促進するが、VEGF、HGF が関与することを示し、中和抗体投与実験などにより特に VEGF が重要であることを証明した。一般的に多くの胃潰瘍は既存の薬物治療により治癒するが、未だ高齢者や抗生剤耐性のピロリ菌感染者など、難治性で再発を繰り返す症例も少なくないため、今後の新たな治療法としても期待できる。

以上のように、本研究は独創性が高く、今後の発展性が期待される示唆に富む研究内容で、学位授与に値するものと認める。