

## 論文審査の結果の要旨

氏名：大 熊 啓 嗣

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：臍帯血生着不全モデルマウスを用いたヒト胎児付属物由来幹細胞の生着促進効果の検討

審査委員：（主 査） 教授 森 山 光 彦

（副 査） 教授 高 山 忠 利 教授 相 澤 信

教授 高 橋 悟

近年、造血幹細胞と骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)の同時移植により生着不全を回避できることが報告されている。一方レシピエントの骨髄 MSC を調製することは、がん細胞の混入の可能性などから困難であり、また健常人から骨髄 MSC を採取するには侵襲が高い。胎盤や臍帯などの胎児付属物には MSC が豊富に含まれ、数種類の MSC が単離・増殖できることが報告されているが、これら胎児付属物由来 MSC の造血幹細胞生着促進作用の相違については明確でない。

著者は、胎児付属物に由来する3種類の MSC として、①羊膜間質由来幹細胞(amnion mesenchymal stem cell: AMC)、②羊膜上皮由来幹細胞(amnion epithelial stem cell: AEC)、③Wharton's jelly 由来間葉系幹細胞(Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cell: WJ-MS C)を調製し、臍帯血生着不全モデルマウスにヒト造血幹細胞と共にこれらの細胞を共移植し、その生着促進作用を比較検討した。これらの検討から、造血幹細胞生着促進を目的として細胞治療のソースとして適切な細胞の同定を試みた。方法は、計 48 匹の NOD/SCID マウスに放射線照射(3 Gy)を行った後、ランダムに 4 群 (コントロール群、AMC 群、AEC 群、WJ-MS C 群) に分け、それぞれ 24 時間後にヒト臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞 ( $5 \times 10^4$ )単独、もしくはヒト臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞( $5 \times 10^4$ )と AMC、AEC および WJ-MS C(各  $5 \times 10^5$ )を尾静脈より投与した。12 週後にマウスを安楽死させた後大腿骨を摘出し、骨髄細胞を採取した。骨髄細胞中のヒト血液細胞の割合をフローサイトメーターを用いて解析した。また、計 8 頭の NOD/SCID マウスに放射線照射(3 Gy)を行った後、24 時間後に Qtracker® で蛍光標識した WJ-MS C( $5 \times 10^5$ )を尾静脈より投与した。投与 24 時間後にマウスを安楽死させ肺と大腿骨を摘出し、肺はホルマリン固定後パラフィン切片を作成し、蛍光顕微鏡で WJ-MS C の存在を観察した。大腿骨からは骨髄細胞を採取し、フローサイトメトリーで Qtracker<sup>+</sup>細胞を解析した。さらに、AMC、AEC および WJ-MS C の培養上清の stromal cell-derived factor 1(SDF-1)および hepatocyte growth factor (HGF)タンパク質濃度を Enzyme Linked Immunosolvent Assay(ELISA)法にて測定した。

この結果、AMC、AEC および WJ はいずれも Passage 3 の時点において MSC の形質に一致する細胞表面マーカーを発現することを確認した。ヒト臍帯血生着不全モデルマウスに対する共移植実験では、WJ-MS C 群では、Control 群に比べ、有意にヒトヒト CD45<sup>+</sup>細胞、CD34<sup>+</sup>細胞、CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>細胞の生着が増加した ( $p < 0.05$ )。また、WJ-MS C の体内動態実験では、移植した WJ-MS C は肺には検出されたが、骨髄内には検出されなかった。培養上清中の分泌タンパク質の解析では、SDF-1 濃度は、AEC、AMC、WJ-MS C の間で明らかな差は認められなかった。HGF 濃度は、AEC、AMC に比べ WJ-MS C で有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。以上の結果より、WJ-MS C の投与は、ヒト臍帯血生着不全モデルマウス移植実験における生着率を増加させたが、WJ-MS C は投与後に骨髄内には移行せず、肺にトラップされ種々のサイトカインを放出し、生着促進作用を生み出している事が示唆された。以上より申請論文は、臍帯血と WJ-MS C の同時移植は、臍帯血移植における生着不全を予防する有効な治療法となりうる可能性を提示したことより、臨床応用を視野に入れた大変優れた論文である。

よって本論文は、博士（医学）の学位を授与されるに値するものと認める。

以 上

平成 27 年 2 月 18 日