

Title	Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces Prolongation of the Life Span of Bone Marrow Stromal Cells from an Elderly Donor without Affecting Their Neurogenic Potential
Sub Title	高齢者ドナー由来の骨髄間葉系細胞へのhTERT及びbmi-1, E6, E7遺伝子導入組み合わせによる寿命延長と神経様細胞への分化誘導
Author	森, 泰昌 (Mori, Taisuke)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.4 (2005. 12) ,p.8-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20051202-0008">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20051202-0008</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Combination of hTERT and *bmi-1*, E6, or E7 Induces Prolongation of the Life Span of Bone Marrow Stromal Cells from an Elderly Donor without Affecting Their Neurogenic Potential

(高齢者ドナー由来の骨髄間葉系細胞へのhTERT及び*bmi-1*, E6, E7遺伝子導入組み合わせによる寿命延長と神経様細胞への分化誘導)

森 泰 昌

## 内容の要旨

ヒト骨髄間葉系細胞はこれまで骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞等の中胚葉由来である細胞のみならず神経外胚葉への分化も報告されている。しかしながらヒト骨髄間質細胞は分離培養が容易であるがその増殖には限界がある。ヒト骨髄由来間葉系細胞はES細胞、ある種の癌細胞とは異なりテロメラーゼ活性が存在せず理論的にテロメア短縮により絶対寿命が存在する。またテロメラーゼサブユニットであるhTERTのみの導入では延命できないことが報告されている。本研究では、91歳の高齢者から得られたいくつかの骨髄間質細胞種からH4-1と名付けたクローンをその対象とした。これらの骨髄間質細胞もこれまでの報告と同様にhTERTのみの導入によるテロメラーゼ活性を誘導しても延命できなかった。またこの際にp16の発現増加が見られRb経路の活性がin vitroにおける寿命を規定していることが示された。Rb/p16経路に拮抗するために内因性遺伝子である*Bmi-1*、HPVのE7の高発現により細胞は寿命を延長し、さらにp53経路に拮抗するHPVのE6の導入により細胞は長期増殖が可能となった。またE6E7のみの導入により長期延命した細胞にはテロメラーゼ活性は起きずにテロメア短縮によるクライシスを迎えることが確認された。これらの細胞のうちE7, hTERT導入群では長期培養にもかかわらず染色体の異常を認めなかった。次にこれらの寿命延長細胞が遺伝子導入前の骨髄間質細胞の性格を保持しているかの検討を行った。in vitroの系を用いて神経系への分化誘導プロトコールを作成し、神経系への分化誘導を行ったところ突起の延長等の形態学的に神経細胞様への変化をきたした。これらの細胞の分化誘導前後をgene chipによる遺伝子の発現の網羅的解析による比較検討を行った結果いくつかの重要な神経関連遺伝子の発現がみられ、それらの分子について遺伝子および蛋白レベルでの発現を確認した。さらにこれらの神経様細胞が細胞興奮性を有しているかをカルシウムイメージング法により検討した結果、細胞の興奮性が確認された。

本研究において本来の骨髄間質細胞の性質を維持した状態での寿命延長が可能であることが示された。また骨髄間質細胞の寿命延長機構を解明した。今後本研究において得られた遺伝子導入による寿命延長細胞は、細胞の増殖と癌化のメカニズム、そして可塑性を有す未分化機構の解明の有用なツールとなると考えられる。また将来的に中枢神経系の自己細胞移植による治療法開発に貢献する可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

ヒト骨髄間葉系細胞は、これまで多分化能を有することが報告されている。しかしながらヒト骨髄間葉系細胞は腫瘍細胞株以外での長期にわたる研究は困難であった。本研究では、高齢者から得られたH4-1と名付けたクローンを対象とした。この細胞のRb/p16経路に拮抗するために*Bmi-1*, E7遺伝子の導入、さらにp53経路に拮抗するE6により長期増殖が可能となった。これらの細胞に予めhTERTを導入した細胞群は事実上の不死化が示され、E7, hTERT導入群では、長期の培養によっても染色体の異常を認めなかった。次に寿命延長細胞をin vitroの系を用いて神経系への分化誘導を行ったところ神経細胞様分化を示し、分化誘導前後を遺伝子、蛋白レベルでの発現解析を行った。さらにカルシウムイメージング法による細胞の興奮性が確認された。以上より本来の性質を維持した状態での寿命延長が可能であることが示された。

審査では、まず導入した遺伝子の上記の組み合わせの理由について、また単一の遺伝子導入での結果について質問がなされた。これについて、単一遺伝子のみの導入では寿命延長を得られなかったこと、またこれまでのE6, E7, hTERTの研究成果を基盤にp16蛋白を抑制する内因性遺伝子である*bmi-1*を組み合わせることで細胞寿命延長と間葉系細胞の有す多分化能の維持を目的としたと回答された。次に作成された細胞のクローナリティー及びそれぞれのクローン間の違いについての質問がなされた。クローナリティーについてはおそらくクローナルな集団と考えているがその詳細な検討は行ってないこと、及び各遺伝子の組み合わせに各3クローン作成して検討した結果、基本的に同様の性質を示すも一部では異なる性質を示すクローンも認めたと回答された。次にこれらの細胞でのがん化と不死化の違いについての質問がなされた。これについて、増殖能の極めて高い細胞クローンに対して分化誘導を行うと細胞形態の変化と共に細胞死を起こすことなくその増殖を停止する。また移植し長期間の観察を行っても、これまでの結果では、腫瘍の形成を認めていないと回答された。この原因については興味深い遺伝子の関与が予測されているがその機構は解析されて今後課題となるとの現状が説明された。また神経分化誘導に際し*Num1*の過剰発現についての意義、その機能についての質問がなされた。これに対して、現状では検討はなされておらず詳細について更なる検討が必要であると回答された。また神経細胞機能の検討としてカルシウムイメージングだけでは不十分であり、また領域特異的な遺伝子の発現等を含め詳細な検討が必要であるとの指摘を受けた。

以上の様に本研究は今後更に検討すべき点はあるものの、未分化能を維持した寿命延長細胞の確立と、本研究において得られた寿命延長細胞は、細胞の増殖と癌化のメカニズム、そして可塑性を有す未分化機構の解明の有用なツールとなり今後の研究の発展が期待される点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 病理学 坂元 亨宇

発生・分化生物学 須田 年生 生理学 岡野 栄之  
病理学 岡田 保典

学力確認担当者：

審査委員長：須田 年生

試問日：平成17年 9月21日