

**【目的】** 幹細胞を用いた再生治療において、移植の成功を左右する重要な課題は、移植に必要な品質の高い幹細胞を培養する技術である。そして、移植後も安定した高い再生治療効果を有する幹細胞製剤の開発である。幹細胞は培養条件に依存し、分化し幹細胞性を失うと、再生治療材料としての能力が急激に低下してしまう。また、幹細胞は、生物由来製剤であり、その由来となるドナーの条件によって品質が影響を受ける。一方、時計遺伝子は、周期的な振幅により生体の様々な機能の恒常性維持を司っており、時計遺伝子の変動は幹細胞の細胞状態を反映する指標となる。本研究では、移植効率の高い幹細胞製剤を構築するため、時計遺伝子を指標として幹細胞の評価を行った。本研究によって、時計遺伝子に着目し、移植効率の高い幹細胞ドラッグデリバリー製剤を構築する。

**【方法】** 生活習慣病の基礎疾患を有するドナーより採取した幹細胞の時計遺伝子 (*Dbp*, *Per2*, *Cry1*) の発現を定量的PCR法により4時間おきに解析した。幹細胞の時計遺伝子の振幅は、細胞の恒常性に大きな影響を与える。そこで、幹細胞のエネルギー産生を担う細胞小器官ミトコンドリアを透過型電子顕微鏡により観察した。さらに、ミトコンドリア酵素活性を、MTTアッセイ法を用いて定量し、ミトコンドリアDNAコピー数を定量的PCRにより定量した。移植効果の違いを明らかにするため、我々が開発した幹細胞スフェア培養法により幹細胞製剤を調製し、免疫不全マウスの背部皮下に移植した。幹細胞割合を明らかにするため、フローサイトメトリーを用いて幹細胞マーカー (CD90, CD73, CD105) 陽性細胞を定量した。細胞障害を評価するため、核膜タンパク質の発現を免疫染色法・ウエスタンブロット法を用いて定量した。

**【結果】** 本研究では、移植効率の高い幹細胞製剤を構築するため、時計遺伝子を指標として幹細胞の評価を行った。II型糖尿病患者由来の幹細胞では、時計遺伝子の発現振幅が健常者由来の幹細胞に比較して弱いことを明らかにした。時計遺伝子の振幅が低下したドナー由来の幹細胞製剤では、ミトコンドリアが変性し、ATP活性やミトコンドリアDNAコピー数が低下することを明らかにした。時計遺伝子の振幅が低下したドナー由来の幹細胞製剤では、幹細胞割合が低下することで移植効率が悪くなることを明らかにした。本研究により、幹細胞製剤を開発する上で、時計遺伝子を定量することの重要性が明らかとなった。本研究成果は、幹細胞製剤の開発に重要な成果となり、再生治療の普及に繋がるものであった。

幹細胞における時計遺伝子の発現変動

