

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	氏名	大久保 敦子
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
<p>Low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) activates DLX expression and osteogenic differentiation of donor bone marrow-derived human mesenchymal stem cells (低出力超音波パルスは患者由来の骨髄間葉系幹細胞において DLX 遺伝子の発現と骨分化を促進する)</p>			
論文審査担当者			
主 査	教授	瀧原 義宏	
審査委員	教授	一戸 辰夫	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔論文審査の要旨〕			
<p>近年、再生医学分野での研究が盛んに行われている。様々な状況に対し培養細胞移植が行われるようになったが、多分化能を持ち、かつ培養で大量に製造可能である体性幹細胞は有用な細胞ソースである。本研究では低出力超音波 (low-intensity pulsed ultrasound: 以下 LIPUS) がヒト間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells: 以下 hMSCs) の骨分化に与える影響を検討した。LIPUS は骨分化促進作用が確認されている治療機器で、遷延治療骨折に使用される。機序に関する <i>in vitro</i> 実験系は複数みられるが、大部分が動物細胞や株化細胞を用いた検討である。刺激への反応性が高く明確な結果を得やすい株化細胞に比べ、初代培養細胞は増殖が遅く培養継続により脱分化しやすいなど、培養維持が比較的難しいが、正常性が高く元臓器と類似した性質をもつ患者由来細胞を用いた研究は、実際の生体反応を反映するものとして重要である。従って本研究では、骨分化誘導下の患者由来 hMSCs に対し LIPUS 照射が及ぼす作用の検討を行った。また、骨芽細胞分化指標として注目される 2 つのホメオボックス遺伝子 <i>distal-less homeobox 3</i> (以下 DLX3) と <i>distal-less homeobox 5</i> (以下 DLX5) 遺伝子の発現に着目した。</p> <p>人工股関節全置換術施行の成人女性 4 名の腸骨稜より骨髄液を採取し、密度勾配遠心分離により単核球の分画を得た。この細胞を 10% 仔ウシ血清を含む培地中で培養した後、接</p>			

着細胞を2継代し、フローサイトメトリー解析を行った。これを骨分化誘導培地で培養し、培養皿底面より連日 LIPUS 照射(20分, 周波数 1.5 MHz, 1kHz パルス波, 平均強度 30 mW/cm²)を行った。照射から7日, 14日で hMSCs から全 RNA を抽出し real-time PCR 解析を行った。解析項目は osteocalcin (以下 OCN), Alkaline Phosphatase (以下 ALP), Runt-related transcription factor (以下 RUNX2), DLX3, DLX5 とした。また同タイムポイントの細胞からタンパク質を抽出し, ウェスタンブロットにより OCN タンパク質の発現量を分析した。照射14日後の石灰化指標としてアリザリンレッド S 染色を行った。

フローサイトメトリー解析より, hMSCs は表面抗原 CD44, CD105 が陽性, かつ CD133, CD34, CD45 が陰性であり, 過去報告と一致した。real-time PCR 解析から, hMSCs における OCN, RUNX2, DLX3, DLX5, ALP の mRNA 発現は骨分化誘導により上昇したが, LIPUS 照射により, 7日目での DLX3 mRNA が非照射の約5倍の発現量となった。他の遺伝子発現も LIPUS 照射14日目には顕著に上昇した。ALP, RUNX2, DLX3, DLX5 の mRNA 発現量は骨分化誘導14日では7日目より低下したが, LIPUS 照射によりこの発現量が増加した。細胞の成熟と共に増加した OCN の mRNA 発現も, LIPUS 照射により大幅に増加した。なお, OCN タンパク質の発現量も LIPUS 照射により7日後, 14日後に著しく増加した。ただし, 石灰化に対する照射による変化は認められなかった。

培養細胞移植の最終目的は, 効率的な生着と, 目的細胞への確実な分化・機能である。体内での MSCs 増殖には長期間を要するため, MSCs と足場を組み合わせ, 適切な分化促進処置下で培養することで人工骨を生体外で作成し, 移植・生着させることが現実的とされている。本研究で初代培養細胞において LIPUS の効果を確認できたことは意義深く, 細胞工学的手法においても細胞増殖や分化をリスクなく促進できる技術として機械的刺激が有用となる可能性が示された。また, これまで DLX3, DLX5 は骨分化に重要とされていたが, リモデリングにどう関わるかの詳細は不明であった。骨では骨形成と骨吸収が同時に生じ, 骨梁と皮質骨で反応性が異なるため, 一因子がどちら側に働くかを判断することが容易でない。しかし近年, 骨の恒常性維持に対して DLX5 は骨形成活性化方向へ, 逆に DLX3 は骨形成制御方向への調節因子として関わるということが解明された。本研究は機械的刺激により DLX5 だけでなく DLX3 の発現も上昇することを初めて示し, これまで骨形成促進効果のみが着目されていた LIPUS の作用機序には, 骨形成にブレーキをかける負の作用も潜在する可能性を示唆した。この事実は *in vivo* で示される最終的な骨量増加という結果のみからは検出不可能であったと考えられる。ただし, 骨芽細胞の成熟を制御することは, 前駆細胞の増殖状態を保つために有用である可能性も考えられるため, DLX3 の発現を抑制した場合に生じる細胞数や石灰化に関する変化を含め, 更なる検討が必要である。

本研究は, 今後, microRNA 等を用いた DLX3 抑制と LIPUS の併用による骨形成促進効果について研究を展開する一助となるものであり, 整形外科ならびに理学療法分野の発展に貢献することが大きい。よって審査委員会委員全員は, 本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。