

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	TRY KY
学位授与の条件	学位規則第4条第①2項該当		
論文題目 Differentiation of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells into Early Chondrocytes in Three-dimensional Culture (ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の三次元培養下における軟骨細胞への分化)			
論文審査担当者			
主査教授 宿南 知佐			印
審査委員 教授 谷本 幸太郎			
審査委員 教授 津賀 一弘			
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hBMSCs）は，軟骨を対象とする再生治療用細胞ソースとして有望である。しかしながら，hBMSCs から分化した軟骨細胞は，次第に肥大軟骨細胞へと分化し，その後，石灰化が進行して骨の生成に至るため，新生軟骨を維持するのは難しい。したがって，hBMSCs を用いる軟骨の再生医療では，肥大軟骨細胞への分化の抑制について考えることが重要である。本研究では，hBMSCs の3次元ペレット培養における軟骨分化促進と肥大軟骨への分化抑制を両立し得る条件について検討することを目的とした。とくに，ペレット培養の開始時における細胞分化度の違い，ならびに，ペレット中の酸素濃度勾配が軟骨分化に及ぼす影響について検討するとともに，栄養素（グルコース）濃度の違いが肥大軟骨細胞への分化に及ぼす影響について知見を得ることを目的とした。</p> <p>本研究で用いたhBMSCs (UE6E7T-3 株) はJCRB細胞バンクより入手した。培養には2種類の培地を用いた。すなわち，増殖培地（10%ウシ胎児血清及び抗生物質を含むDMEM）および分化培地（10%ウシ胎児血清及び抗生物質を含むαMEMに，TGF-β3，アスコルビン酸リン酸，デキサメサゾン，ピルビン酸，ITS+を添加）である。2.5 × 10⁶ 個の細胞を含む分散液を 500 gで 5 分間遠心することによってペレットを得た。その後，ペレットを増殖培地あるいは分化培地中で浮遊培養した。所定期間培養したのち，ペレットの組織切片を作製し，ヘマトキシリン-エオジン（H.E）およびトルイジンブルーO（TBO）で染色した。また，組織切片を低酸素誘導因子（HIF-1α）およびX型コラーゲンに対する抗体を用いて蛍光免疫染色することによって，それらの発現を分析した。また，ネクローシスあるいはアポトーシスによって死滅した細胞を，それぞれヨウ化プロピジウム(PI) 染色およびTUNELアッセイによって分析した。組織切片上の染色細胞の定量的解析には，ImageJ ソフトウェアを用いた。さらに，軟骨細胞のマーカー遺伝子（Sox9 およびII型コラーゲン）およびミトコンドリア電子伝達系複合体タンパク質の発現量について定量的RT-PCR法によって分析した。</p> <p>まず，培地の条件の違いが細胞の酸素消費量および壊死/生存に与える影響について検討した。最初に，hBMSCs を増殖培地あるいは分化培地で単層培養した。その結果，分化培地中で培養した細胞では，ミトコンドリアにおける電子伝達系複合体タンパク質の産生量が，増殖培地中で培養した細胞に比べて少ないことがわかった。この結果から，分化の進行した細胞では酸素消費量の少ないことが示唆された。一方，三</p>			

次元ペレット培養下では、増殖培地中に比べ、分化培地中で培養した場合にペレットに含まれる壊死細胞の数が少なかった。上述のように、分化した軟骨細胞はより少ない酸素を必要するため、低酸素状態にあると思われるペレット中心部においても生存細胞の割合が高かったのであろう。

次に、低酸素状態が軟骨分化に与える影響を調べるため、ペレットを増殖培地あるいは分化培地で培養した後、それらを分化培地中にて培養した。その結果、未分化細胞から調製したペレットでは、壊死細胞がコア領域に多く存在した。この結果は、細胞一個あたりの酸素消費速度及び酸素の拡散係数をパラメーターとし、フィックの第1法則を用いて見積ったペレット内の酸素濃度勾配から単純に説明できる。しかしながら、ペレット培養を分化の進んだ細胞から開始すると、壊死細胞はコア領域においても比較的少なかった。これは、分化した軟骨細胞では酸素消費量が少ないためであろう。この結果は、ペレット中心部における低酸素状態は、壊死を抑えるのみならず、軟骨細胞の密度を高めるのに寄与することを示唆する。

ペレット内部の低酸素状態と軟骨細胞分化についてさらに詳細な洞察を得るため、HIF-1 α に着目した。このタンパク質は転写因子の一つであり、Sox9 遺伝子のプロモータ領域に結合して軟骨分化を促進することが知られている。さらに、HIF-1 α は、ミトコンドリア電子伝達系複合体を形成する種々のタンパク質の発現を抑制することが報告されている。その結果、ATP 合成反応の副産物であり、細胞壊死の原因となる活性酸素の産生が抑えられる。本研究の結果、予め軟骨分化を進行させた細胞を用いて作製したペレットでは、未分化の細胞を用いた場合に比べて、HIF-1 α の発現レベルが高かった。また、TBO 染色の結果から、前者では後者に比べて、軟骨組織様の細胞外基質の合成がより亢進しており、軟骨分化がより進んでいることが示唆された。いずれの結果も、上述のように、HIF-1 α が多様な機能をもつことを考慮するとうまく説明できる。

最後に、肥大軟骨への分化の進行に及ぼすグルコースの影響について検討した。hBMSCs から軟骨への分化過程で、前駆細胞が初期軟骨細胞へと分化し、その後、後期軟骨細胞（肥大軟骨細胞）へと分化がさらに進むことが知られている。この肥大軟骨細胞は、次第に石灰化し、最後には骨組織へと成熟する。したがって、軟骨の再生治療を考える場合、肥大軟骨細胞への転換を抑制する条件について知見を得ることは重要である。本研究では、予め軟骨分化を進行させた細胞を用いてペレットを作製し、比較的低濃度（6 mM）のグルコースを含有する分化培地中で培養することによって、高グルコース濃度（30 mM）の場合より、ペレット中での肥大軟骨細胞への転換が有意に抑えられることが明らかとなった。

以上を総括すると、hBMSCs から分化した軟骨細胞は、未分化 hBMSCs と比較して少ない量の酸素を消費する。このように、軟骨細胞と hBMSCs の酸素消費速度の相違、および、ペレット内に形成された酸素濃度勾配、低酸素状態における HIF-1 α の発現が、ペレット内での壊死細胞の分布および軟骨分化に協奏的な影響を及ぼす。肥大軟骨細胞への転換は、低濃度のグルコースを含む培地を用いることで抑制することができる。以上の結果から、ペレット作製前に分化を進行させ、かつ、低グルコース濃度条件下で分化培養を行うことは、初期軟骨細胞の誘導と肥大軟骨細胞への分化の抑制に効果のあることが示され、**今後、hBMSCs による軟骨再生治療の効果を高める可能性が示唆された。**

よって審査委員会委員全員は、本論文が TRY KY に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	TRY KY
学位授与の条件	学位規則第4条第①2項該当		
論文題目 Differentiation of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells into Early Chondrocytes in Three-dimensional Culture (ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の三次元培養下における軟骨細胞への分化)			
最終試験担当者			
主査教授 宿南 知佐		印	
審査委員 教授 谷本 幸太郎			
審査委員 教授 津賀 一弘			
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年6月14日の広島大学研究科発表会（歯学）及び平成29年8月9日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 本論文中で用いた統計分析法の妥当性について 2 ペレットを用いることの利点およびそのサイズが細胞分化に及ぼす影響について 3 軟骨再生技術の臨床上の必要性および培養ペレットの適用方法について 4 種々の成長因子、分化抑制因子、壊死細胞の影響について 5 肥大軟骨細胞の運命について 6 軟骨分化の促進と分化転換の抑制との関係について <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			