

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	小松 奈央
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 骨髄間葉系幹細胞集塊 C-MSCs における YAP/TAZ の役割			
論文審査担当者			
主査	教授 柴 秀樹	印	
審査委員	教授 吉子 裕二		
審査委員	准教授 武知 正晃		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯周炎は歯周病原菌の感染に対する宿主応答の結果、歯周組織の破壊が起こる炎症性疾患である。歯周炎は糖尿病、関節リウマチ、血管障害、非アルコール性脂肪性肝炎、早産／低体重児出産など様々な疾患の発症や進行に関わっている。歯周組織再生療法によって破壊された歯周組織の構造および機能を回復することは、歯周炎の再発リスクを低減するだけでなく全身の健康の維持・増進に重要である。</p> <p>現在の歯周組織再生療法の適応症は小規模な組織破壊であり、GTR 法やサイトカイン療法がある。一方で、実際には1壁性骨欠損や水平性骨吸収など、広範囲にわたる歯周組織破壊も多い。大規模な歯周組織欠損では組織再生に関わる細胞数が少なく、残存する細胞の機能を制御するだけでは組織再生は困難である。そのため、大規模な歯周組織欠損に対しては全く新しい概念の再生療法の確立が必要であり、再生に関与する細胞を生体外から補充する細胞治療が適していると考えられる。</p> <p>申請者が所属する研究室では様々な形態や大きさの組織欠損を治療対象とするための unit として骨髄間葉系幹細胞 (MSCs) と細胞自身が産生する細胞外基質 (ECM) から、3次元的な細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs) を作製した。C-MSCs の特徴として以下の3点が挙げられる。①直径約 1mm の球状細胞集塊で、その大きさと形状から良好な操作性を示す。②人工の足場材料を用いることなく欠損部位に直接移植することができる。③複数の C-MSCs をさらに結合させることが可能であり様々な形や大きさに適用できる。これまでにラットの頭蓋冠欠損モデルやビーグル犬のⅢ級根分岐部病変モデルにおいて C-MSCs の移植が効果的な骨再生を誘導することを明らかにしてきた。また ex vivo において骨分化誘導を施した C-MSCs は、骨再生をより効果的に促進することを報告した。さらに、免疫調節能を向上させた C-MSCs は異種移植拒絶を抑制しながら骨再生能を発揮することを明らかにした。このように C-MSCs は硬組織再生療法に有効といえるが、実際に臨床応用するためには、C-MSCs 内部の細胞の性質を詳細に解明しておく必要がある。</p> <p>近年、基質の固さ、細胞密度、浮遊状態などの因子がメカノトランスダクションを誘導し、転写共役因子 YAP/TAZ を介して MSCs の細胞分化を制御することが報告された。C-MSCs は立体的で浮遊状態にあり、自己産生した ECM のみが足場であるというこれまでにない培養環境にあるため、C-MSCs には独特なメカノトランスダクション機構が生じ、C-MSCs 内部の細胞性質に影響を及ぼしていると考えた。本研究では、C-MSCs の性質を解明するために、C-MSCs および骨分化誘導を施した C-MSCs (OIM-C-MSCs) における YAP/TAZ の動態とそのシグナル伝達経路について明らかにすることとした。</p> <p>C-MSCs の作製方法として、まず MSCs に ECM を産生させ MSCs/ECM 複合体を形成するために、MSCs を 24well プレートに 2.0×10^5 cells /well となるように播種し、増殖培地に 50 $\mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸を添加したもので 4 日間培養した。その後、MSCs/ECM 複合体を</p>			

ウェルから鈍的に剥離して培地中に浮遊させ、浮遊培養用マイクロプレートに移し、さらに増殖培地で培養すると、浮遊させたシート状の MSCs/ECM 複合体は 1 日後には球状の細胞集塊 C-MSCs となった。またこれとは別に C-MSCs 作製過程を骨分化誘導培地で行うことで、OIM-C-MSCs を作製した。C-MSCs および OIM-C-MSCs について、培養過程における I 型コラーゲンの発現、F-actin の形態、YAP/TAZ の局在と活性、さらに MSCs の分化能を解析した。

浮遊状態で 3 次元培養される C-MSCs において、YAP/TAZ 活性は著しく低下しており、F-actin の脱重合と LATS1/2 の活性化によってその動態が制御されていることが示された。さらに、その YAP/TAZ 活性の低下が、C-MSCs における脂肪・軟骨誘導のかかりやすさに関与していることが明らかとなった。一方、OIM-C-MSCs では、豊富な I 型コラーゲンによってインテグリン $\beta 1$ 、ROCK が活性化し、F-actin が伸展することで YAP/TAZ が核内へと移行することが示された。そしてその YAP/TAZ 活性の上昇が、骨分化マスター制御因子の *RUNX2* の発現を上昇させた。さらに、活性化した YAP/TAZ は I 型コラーゲンの産生も促進し、その増加した I 型コラーゲンが OIM-C-MSCs 内のメカノトランスダクション経路を維持するというポジティブフィードバックループの存在が示唆された。

以上の結果から、C-MSCs 内の YAP/TAZ を中心としたメカノトランスダクションには様々な経路が存在し、その相違が細胞分化の方向付けに関与していることが示された。

本論文の研究成果は、MSCs を用いた細胞再生治療の分子基盤の確立に寄与するとともに、MSCs バイオロジー、YAP/TAZ バイオロジーに新知見を与えるものとする。

よって審査委員会委員全員は、本論文が小松奈央に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものとして認めた。

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	小松 奈央
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 骨髄間葉系幹細胞集塊 C-MSCs における YAP/TAZ の役割			
最終試験担当者			
主査	教授 柴 秀樹	印	
審査委員	教授 吉子 裕二		
審査委員	准教授 武知 正晃		
〔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11月1日の広島大学研究科発表会（歯学）及び平成30年1月30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 再生治療における分化誘導された C-MSC の利点と欠点 2 歯周組織を構成する細胞への C-MSC の分化誘導方法 3 YAP/TAZ の細胞内局在における細胞密度と細胞外基質の影響 4 YAP/TAZ による骨分化因子転写調節機構 5 細胞骨格と YAP/TAZ 発現の関係 6 YAP/TAZ 活性の調節による骨再生療法の展望 <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>			