

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	根木 宏
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 <i>In Vitro</i> Safety and Quality of Magnetically Labeled Human Mesenchymal Stem Cells Preparation for Cartilage Repair (軟骨修復に対する <i>in vitro</i> における磁性化ヒト骨髄間葉系幹細胞の安全性と品質評価)			
論文審査担当者			
主査	教授	一戸 辰夫	印
審査委員	教授	池上 浩司	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>関節軟骨は一度損傷すると修復が困難であり変形性関節症に移行し，疼痛や関節機能の低下につながる。ヒト骨髄間葉系幹細胞(MSC)は軟骨分化能を有し，軟骨損傷に対する治療の有効な手段として研究されてきた。KobayashiらはMSCの細胞質に超常磁性酸化鉄(Ferucarbotran)を取り込ませ磁性化させることで，外部からの磁場によって細胞を軟骨欠損部に誘導する磁気ターゲティング法を報告した。磁気ターゲティング法は，低侵襲にMSCを効率的に軟骨欠損部に誘導することが可能であり，ミニブタを用いたモデルでは良好な軟骨修復が得られた。一方で高濃度のFerucarbotranによる磁性化がヒトMSCの軟骨分化を阻害することが明らかとなり磁気ターゲティングの臨床応用に向けてMSCの磁性化における安全性と品質の評価が必要である。本研究の目的は軟骨修復における磁性化ヒトMSCの安全性と品質を評価することである。</p> <p>実験には購入した3つの異なるドナーのヒトMSCを用いた。磁性化MSCの安全性の評価のため，ヒトMSCを過去の報告と同様のFerucarbotran添加濃度(97.56µg Fe/mL)で12時間磁性化し5.48Tの磁束密度のもと10分間磁場を照射し核型分析，コロニー形成アッセイ，そして長期培養における細胞増殖能の評価を行った。細胞増殖能の評価については磁性化を行わないcontrolに加え，Ferucarbotran添加量を倍量にしたもの，磁性化時間を3倍にしたものを作成し培養時間に対する累積世代数(PDL：population doubling level)を検討した。磁性化MSCの品質評価のためFerucarbotran添加濃度(97.56µg Fe/mL=標準濃度)で磁性化する群に加えて，1/4，1/2，3/4および2倍の濃度で磁性化する群，磁性化をしないcontrol群を作成した。各群でtrypan blue染色を行いcell viabilityを測定した。またそれぞれの磁性化濃度における細胞ライセートを作成し細胞内の鉄含有量を測定した。磁場への反応性を評価するため各群において永久磁石(0T,100mT,250mT,500mT)を設置したMicro fluidics chipへ3.0×10<sup>5</sup>個/mlに調整した磁性化細胞を注入し，磁石に反応性を示さなかった細胞数(UAC)を検討した。さらに軟骨分</p>			

化能を評価するためペレットカルチャーによる軟骨分化誘導を行い、スフェロイドの長径およびその切片の Toluidine 染色による組織学的評価, glycosaminoglycan(GAG)量, Type II コラーゲンの mRNA 発現量を評価した。

核型分析ではいずれのドナーにおいても異常は認めなかった。コロニー形成アッセイでは足場依存性のコロニーの形成は認めなかった。細胞増殖能についてはいずれのドナーにおいても磁性化によってわずかに増殖能の促進を認めたが、1つのロットにおいては2倍の濃度で磁性化を行ったものよりも通常濃度で磁性化を行った MSC に増殖能が高い傾向が認められた。すべてのドナーにおいて100日以内にMSCの細胞増殖は低下を示した。品質評価において、いずれの濃度においても磁性化MSCの cell viability に有意差は認めなかった。それぞれの磁性化濃度における細胞内鉄含有量は濃度依存性に上昇する傾向を認めたが、ドナー間で鉄含有量には差を認めた。ペレットカルチャーにおけるスフェロイドのサイズは2倍の濃度で磁性化を行った場合はいずれのドナーにおいても小さく、Toluidineによる染色性も低かった。また、細胞内鉄含有量が多い傾向にあるドナーでは全体的にサイズが小さく Toluidine による染色性も低い傾向にあった。同様に GAG 量及び Type II コラーゲンの mRNA 発現量についても濃度依存性に低下を認め、細胞内鉄含有量が多い傾向にあるドナーでは特に低下を認めた。磁場に対する磁性化 MSC の反応性については磁束密度 0mT 下においてはいずれの濃度においても差は認めなかったが、磁束密度の上昇とともに UAC 量は減少し、標準濃度においては 100mT 以上の磁束密度下では全てのドナーにおいて control 群に比較し UAC 量は有意に低下した。一方で、細胞内鉄含有量が多い傾向にあるドナーにおいては 100mT の磁束密度下においても 1/2 の Ferucarbotran 添加濃度で UAC 量の有意な低下を示した。

本研究の結果、MSCの磁性化はMSCの核型への影響は示さず、コロニー形成アッセイでは足場非依存性増殖を示さなかった。また磁性化に伴い増殖能が亢進する一方で、長期の経過に伴い増殖は停止していた。以上のことからMSCの磁性化はその増殖能を促進させる一方で異常な増殖を来す悪性転化は起こさず、MSCの安全性に影響を及ぼさないことが示された。一方で、ペレットカルチャーの結果、過去の報告と同様に添加される Ferucarbotran の濃度によって軟骨分化能が障害されることが判明した。過去の報告に基づいた Ferucarbotran 添加濃度 (97.56  $\mu$ g Fe/mL) では磁気ターゲティング法により良好な軟骨の修復が獲得できている。本研究においても同濃度による磁性化を行えば 100mT 以上の磁束密度下において磁性化 MSC の誘導性が獲得できることが示された。一方で、同等の濃度と磁性化時間で磁性化を行ってもドナー間で細胞内の鉄含有量が異なるため、事前に移植する MSC の品質を評価することで軟骨欠損部への磁性化 MSC の誘導および欠損部における軟骨分化を効率的に行うことが可能であると考えられる。

以上の結果から、本論文は磁気ターゲティングにおける MSC の磁性化の安全性と実用に向けた磁性化の条件を示唆し、今後、臨床に応用できる可能性があり、整形外科学領域の発展に資すること大である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が根木宏に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。