

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	林 悠太
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 The therapeutic capacity of bone marrow MSC-derived extracellular vesicles in Achilles tendon healing is passage-dependent and indicated by specific glycans (骨髄間葉系幹細胞由来細胞外小胞のアキレス腱修復効果は、細胞継代数に依存し、細胞外小胞の表面に発現する糖鎖に関連する)			
論文審査担当者			
主 査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	東 幸仁	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>腱損傷は、運動器外傷の中でも頻度の多い疾患であるが、治療法は、10 年以上大きな進歩がなく、治療の長期化と高い合併症発症率が、医学的にも社会的にも問題となっている。そのため、質の高い腱への修復を促す革新的な治療法が望まれている。これまでに当教室では、間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) および MSC 由来の分泌因子の一つである細胞外小胞 (EVs: extracellular vesicles) に着目し、MSC や MSC 由来 EVs (MSC-EVs) の投与による運動器組織修復促進効果を報告してきた。近年、MSC-EVs の治療効果を示す論文は増加しているが、MSC-EVs の単離法や組織修復における作用機序、動態など基盤となる知見は未だ不明な点が多い。その中で、MSC-EVs の治療効果は、分泌源となる細胞の種類、培養条件、回収方法によっても変化すると考えられており、治療効果の高い MSC-EVs の単離や評価が、臨床応用に向けた課題となるであろう。近年、幹細胞表面に発現している糖鎖は、幹細胞の老化や分化能のマーカーの一つとして報告され、さらに、EVs の機能に関与していることが示されている。しかし、治療効果の高い EVs (質) と糖鎖の関係については、十分に理解されていない。</p> <p>本研究は、アキレス腱損傷モデルマウスを用いて、継代数の異なる MSC から回収した MSC-EVs のアキレス腱修復効果の違いと MSC-EVs 表面の糖鎖プロファイルを明らかにすることを目的とした。</p> <p>① 継代培養による MSC と MSC-EVs の性質</p> <p>継代数 5 と 12 のヒト骨髄 MSC (P5 MSC, P12 MSC、3 ドナー) の細胞老化の状態を評価した。P12 MSC は、P5 MSC と比較し有意に増殖能が低下しており、SA-βGal 陽性細胞の割合や老化マーカー遺伝子の発現が有意に増加していたことから、細胞老化が誘導されていることが示された。よって、P12 MSC 由来 EVs は老化細胞から分泌された EVs と定義した。P5 および P12 MSC より分泌した P5 MSC-EVs (P5 EVs) および P12 MSC-EVs (P12 EVs) の粒子数、粒子径は P5 EVs と P12 EVs で有意差を認めなかった。</p> <p>② アキレス腱修復に関する MSC-EVs の治療効果</p> <p>1) 培養腱線維芽細胞を用いた解析</p> <p>P5 EVs および P12 EVs のアキレス腱修復促進効果を検証するため、P5 EVs および P12 EVs を培養腱線維芽細胞に添加した際の取り込まれる率、細胞増殖能と遊走能を評価した。その結果、腱線維芽細胞への EVs 取り込み効率は、P5 EVs, P12 EVs の間に差がなかったが、P5 EVs を添加した腱線維芽細胞では、増殖能および遊走能が、P12 EVs に比し有意に増加した。</p> <p>2) アキレス腱損傷モデルマウスを用いた解析</p> <p>アキレス腱完全切離によるアキレス腱損傷モデルマウスを用いた評価を行った。アキレス腱切離後翌日と 1 週後に、切離部に、それぞれ P5 EVs, P12 EVs と対象群として、PBS を注射した。切離後 1 週の修復組織内の線維量の違いを、マッソントリクローム染色による組織学的評価した。さらに、切離後 4 週の修復組織を、組織修復スコアリングシステムにより評価した。また、切離後 4 週時点の修復組織内のコラーゲン線維径を、透過型電子顕微鏡画像により評価した。その結果、切離後 1 週では、修復組織内のコラーゲン線維量が</p>			

P5 EVs 投与群で有意に増加していることが明らかとなり、さらに、4 週では、組織修復スコアが有意に高値であった。一方で、**P12 EVs** 群は、修復組織内の異所性軟骨化や修復組織周辺との癒着を起こす頻度が高値であった。電子顕微鏡による解析では、修復組織内のコラーゲン線維径が、対照群および **P12 EVs** と比較し、**P5 EVs** で太いコラーゲン線維の形成が有意に促進されていた。以上より、**P5 MSC-EVs** は、老化した **P12 MSC-EVs** と比較して、異所性軟骨化や癒着を抑えた良好なアキレス腱修復を促すことが明らかになった。

② **P5** および **P12 MSC** と **EVs** の糖鎖プロファイリング

EVs の質を評価するために、レクチンアレーを用いて糖鎖プロファイリングを行った。フコース特異的レクチンである **TJA-II** への結合強度は、**P12 EV** と比較して **P5 EV** において有意に増加していた。これらの結果より、糖鎖を指標とした **MSC-EVs** の質を評価できる可能性が示唆された。

本研究では、治療効果の高い（質の高い）**MSC-EVs** は、**EVs** 分泌細胞の継代数に依存しており、その指標として、**EVs** の糖鎖が利用できることを提唱した。**MSC-EVs** の実用化に向けて **EVs** の糖鎖を利用した **EVs** の質の評価法や、より質の高い **EVs** のみを単離する技術などの開発が期待される。

以上の結果から、本論文は、**MSC** 由来の細胞外小胞が、腱修復を促進することを示し、一方で、老化した **MSC** 由来の細胞外小胞は、腱修復促進能が低下することを示した。現在問題となっている腱損傷治療の臨床的問題点と、再生医療の臨床応用への課題を克服する可能性を有した研究であることから、本研究は臨床的に高く評価される。

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。