

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	吉野 舞
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Distinctive Biological Properties between Mesenchymal Stem Cell Spheroids and Clumps of Mesenchymal Stem Cells/Extracellular Matrix Complexes in 3D Culture Systems (3 次元培養システムにおける間葉系幹細胞スフェロイドと間葉系幹細胞集塊との間の識別的生物学的特性)			
論文審査担当者			
主 査	教授 太田 耕司	印	
審査委員	教授 柿本 直也		
審査委員	教授 加来 真人		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【背景・目的】 自己複製能、多分化能、及びパラクライン効果で知られる間葉系幹細胞 (MSCs) は、医学的に重要な関心を集めている。また、通常細胞は 3 次元 (3D) の環境内で機能し挙動することから、MSCs スフェロイド培養は、MSCs の生物学的特性を 3D 環境で研究するために広く採用されている。対照的に、かねてより我々は、間葉系幹細胞とその細胞自身が産生した細胞外基質から構成される間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs) を開発していた。スフェロイドと異なる作製法を用いる C-MSCs は、人工的足場無しに組織欠損部位へ移植することが可能であるという特性も有している。本研究の目的は、3D 培養システムにおける MSCs スフェロイドと C-MSCs の基本的な生物学的違いを明らかにすることである。</p> <p>【材料と方法】</p> <p>1. 細胞培養 ヒト骨髄由来 MSCs は DMEM、10%FBS、100 μg/ml streptomycin、100U/ml penicillin にて構成された成長培地にて培養された。MSCs スフェロイドはハンギングドロップ法を採用した。成長培地に 50 μg/ml の L-アスコルビン酸を添加した 20 μl の懸濁培地中に細胞数 2.5\times10⁴、5.0\times10⁴、10.0\times10⁴、20.0\times10⁴ の密度で懸濁され、細胞懸濁液はプレートの内蓋にハンギングドロップとして置かれ、48 時間培養、細胞凝集後 96 ウェル低接着プレートに移され、さらに 48 時間培養された。その後細胞凝集体は成長培地で 5 日間維持され、MSCs スフェロイドを形成した。C-MSCs の作製法については、まず MSCs は 1 ウェルあたり細胞数 5.0\times10⁴、10.0\times10⁴、20.0\times10⁴ の細胞密度で、それぞれ 96 ウェル、48 ウェル、24 ウェルプレートに播種された。これらの細胞は 50 μg/ml の L-アスコルビン酸を添加した成長培地で 4 日間培養された。その後細胞外基質からなる細胞シートは、マイクロピペットを用いて鈍的に剥離、浮遊された。その後細胞シートは各々の低接着プレートに移され成長培地で維持、5 日間の培養後成熟した円形の細胞集塊である C-MSCs が得られた。</p> <p>2. 組織学的および免疫蛍光解析 MSCs スフェロイド及び C-MSCs は 4%のparaホルムアルデヒドで固定され、8 μm 厚のparaフィン切片が作製された。試料はヘマトキシリン・エオジン染色、TUNEL 染色後、顕微鏡で観察された。免疫蛍光染色では、固定された試料から凍結切片 (20 μm 厚) が作製された。その後抗ヒト COL1 IgG、抗ヒト N-Cadherin IgG、Phalloidin によって免疫染色、DAPI を用いて対比染色が行われ、共焦点顕微鏡にて観察された。</p> <p>3. RNA-Seq 解析及びリアルタイム PCR 解析 次の 3 つの異なる細胞培養グループから総 RNA を抽出した：それぞれ 24 ウェル</p>			

プレート内に(1) 1 ウェルあたり細胞数 2.0×10^5 で播種された 2D 培養 (n=3)、(2) それぞれが細胞数 2.5×10^4 から構成された 8 つの MSCs スフェロイドのセット (n=3)、(3) 細胞数 2.0×10^5 から形成される単一の C-MSCs (n=3)。抽出された RNA を用いてシーケンスが行われ、解析としてヒートマップ、ベン図、および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 解析が行われた。また同条件の RNA を用いてリアルタイム PCR により RNA-seq の結果を検証した。

【結果】

1. MSCs スフェロイドは密でコンパクトな細胞凝集体であるのに対し、C-MSCs は細胞と細胞外基質で構成され、より大きなサイズの細胞集塊が作製できる。肉眼所見では細胞数 2.5×10^4 、 5.0×10^4 、 10.0×10^4 で形成された MSCs スフェロイドは球状構造を持つが、細胞数 20.0×10^4 では不安定な構造が見られた。一方で、C-MSCs は異なる細胞数でも一貫して球状構造を形成した。両者ともに細胞数に依存してサイズが増加し、C-MSCs は MSCs スフェロイドよりも大きな直径を示した。組織学的に、MSCs スフェロイドは細胞密度が高く、今回の検証では細胞数 10.0×10^4 以上の大きなサイズでは内部構造が崩れ、アポトーシスが増加した。一方、C-MSCs は安定した球状構造で ECM 成分も観察され、細胞密度が低かった。以上のことから細胞数 2.5×10^4 の MSCs スフェロイド、 2.0×10^5 の C-MSCs が、各種の 3D 細胞構造が最も安定していることから、さらなる分析の対象とされた。この検証により、代表的な構造的特性を示す条件下での直接比較が可能となった。

2. MSCs スフェロイドは主に N-Cadherin による細胞-細胞接触に依存しており、一方で C-MSCs は主に細胞外基質、COL1 によって形成されている。免疫蛍光染色にて、MSCs スフェロイドは COL1 の発現が低いのに対し C-MSCs は COL1 の発現が豊富な上、F-アクチンファイバーを有していた。一方で、MSCs スフェロイドは N-Cadherin が強く広範に発現し、C-MSCs では弱く散在していた。

3. 3D 培養された MSCs スフェロイドと C-MSCs の遺伝子発現パターンには差異が認められる。

RNA シークエンスにてスフェロイドと C-MSCs は 2D 対照群よりも免疫調節及び細胞保護因子の発現が増加しており、C-MSCs がより顕著であることが示された。さらに、MSCs スフェロイドは主に「細胞接着」に、C-MSCs は「サイトカイン伝達経路」に関連する遺伝子が豊富なことが GO 解析で示された。これらの結果は、MSCs スフェロイドと C-MSCs が異なる生物学的特性を持つことを示唆している。

【結論】

以上の結果から、本論文は各細胞凝集体の異なる特性を認識することで、3D 細胞培養技術の進化の可能性や各々の特性を活かした治療法の可能性について、洞察を与えるものとなった。

これらの研究成果は、歯科医学の発展に寄与するものが大きいと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が吉野舞に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。