

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)	氏名	VERONICA SAINIK RONALD
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
The improved performance of mesenchymal stem cell cultures by fibronectin and mixed self-assembled monolayers under serum-free conditions (無血清培養下でのフィブロネクチンと混合自己組織化単分子膜による間葉系幹細胞培養系の性能改善)			
論文審査担当者			
主 査	教授 加藤 功一	印	
審査委員	教授 谷本 幸太郎		
審査委員	准教授 能城 光秀		
〔論文審査の要旨〕			
<p>組織培養と組織工学では、フィブロネクチン(FN)などによるコーティングや化学合成した表面を利用して、移植用細胞の接着を促進する。しかし、間葉系幹細胞(MSC)の遺伝子発現や代謝活性に及ぼすこれらの表面処理の影響についてはほとんど知られていない。そこで申請者は、本論文において、混合自己組織化単分子膜 (混合 SAM) および FN コーティングが、MSC の遺伝子発現と代謝活性に及ぼす影響について検討した。</p> <p>本論文では、対照として組織培養用プラスチック培養皿(TCP)を、実験群として FN でコートした TCP、水酸基とカルボキシル基を一定比率(60:40)で発現する混合 SAM を使用した。なお血清を用いると、感染リスクや免疫反応リスクがあるため、従来の研究で用いられた血清含有培地ではなく、増殖用の無血清培地である STK2 および骨分化用の無血清培地である STK3 を使用した。また、遺伝子発現の解析には、Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray を用いた。代謝活性に及ぼす混合 SAM の影響には、液体クロマトグラフィーと質量分析(LC-MS)を用いた。</p> <p>本研究において、播種後 2 および 24 時間で、FN はヒト骨髄由来 MSC の伸展を促進し細胞サイズを増加させた。また継代培養の 6-18 日後において、FN は細胞増殖を促進した。さらに無血清の骨分化誘導培地で MSC を培養すると、骨関連遺伝子である alkaline phosphatase liver type (ALPL), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteocalcin (OCN) および osteopontin (OPN) の発現を FN は促進した。しかし、アリザリンレッド染色では、FN による石灰化の亢進は観察されなかった。同様に、混合 SAM もこれらの骨関連遺伝子の発現を亢進したもののカルシウムの沈着量には影響しなかった。つまり FN および混合 SAM は、MSC の骨関連遺伝子の発現を促進し、石灰化能を高レベルに維持した。</p>			

DNA microarray 解析では、細胞播種の 24 時間後において、146 及び 101 遺伝子が FN によってそれぞれ下方制御および上方制御された。また Wiki pathway 解析では、osteoclast signaling pathway が FN による選択的な下方制御を受けたものの、Gene Ontology (GO)解析ではFNにより選択的に制御される遺伝子グループは見いだされなかった。すなわち、FN は遺伝子プロファイルに実質的な影響を及ぼさなかった。一方、混合 SAM 培養系では、1333 および 957 遺伝子がそれぞれ下方制御および上方制御された。また Wiki pathway 解析および Gene Ontology (GO)解析で多くの遺伝子グループが混合 SAM によって下方制御された。これらの下方制御された遺伝子グループには、ミトコンドリア関連遺伝子である COX7B, COX7C, NDUFB3, NDUFS4 と UQCRB 遺伝子が含まれていた。なお、これらの DNA microarray 法で得られた遺伝子発現の変動は、定量的 PCR 法の結果と一致した。さらに、メタボローム解析において、2-oxoglutaric acid レベル及び lactate/pyruvate 比が混合 SAM 培養系 で増加した。

本研究の結果から、FN 及び混合 SAM は、無血清培養系での MSC の増殖を促進すること、高レベルの骨分化能を維持することが明らかとなった。播種後 24 時間において、FN は細胞サイズを増加させたものの遺伝子発現プロファイルにはほとんど影響しなかった。一方、混合 SAM は、細胞サイズにはほとんど影響しなかったものの、MSC の増殖を促進した。さらに混合 SAM は、遺伝子発現プロファイルを大きく変動させ、ミトコンドリア関連遺伝子の発現を低下させ、かつ 2-oxoglutaric acid レベル及び lactate/pyruvate 比を上昇させた。つまり、培養初期の MSC 培養系で、培養表層が遺伝子発現プロファイルと代謝活性に影響することが示された。

以上の結果から、本論文は、MSC の伸展、増殖、分化に及ぼす培養／足場表面の影響を理解するために、かつ MSC の無血清培養法を改良するのに役立つと期待される。よって審査委員会全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するのに十分な価値があるものと認めた。