

第 8 号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 歯 学 )	氏名	竹下 慶
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目 間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex (C-MSC)を用いた他家細胞移植骨再生療法の基礎研究			
論文審査担当者			
主 査	教授	吉子 裕二	印
審査委員	教授	谷本 幸太郎	
審査委員	准教授	武知 正晃	
〔論文審査の要旨〕			
<p>本論文は間葉系幹細胞 (MSCs) を用いた他家細胞移植骨再生療法の開発に関する基礎研究について報告したものである。私たちの研究室では、MSCs と細胞自身の産生する細胞外基質 (ECM) を利用して得られる細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex (C-MSC) を作製し、組織の再生を効果的に促進できることを明らかにしている。MSCs を細胞製剤として供給するための細胞バンクの設立が注目を集めている。しかし細胞バンクから提供される MSCs は他家のものであるため、移植拒絶等のリスクが残る。一方、MSCs は免疫制御能を持つことが知られており、IFN-<math>\gamma</math> によって免疫調節能を向上させ、他家移植に利用する試みが報告されている。そこで、本研究では IFN-<math>\gamma</math> により免疫調節性 C-MSC を誘導し、他家 C-MSC 細胞治療法を開発することを試みた。ヒト MSCs (理科学研究所から提供) を、24well プレートに <math>20 \times 10^4</math>/well の密度で播種し、アスコルビン酸含有の増殖培地 (Hi-glucose DMEM+10% FBS) で 4 日間培養することで、ECM 産生を誘導した。培養した細胞を鈍的にウェルから剥離し、ECM と MSCs から構成されるシート状の複合体とした。この浮遊した MSCs/ECM 複合体を ultra-low binding プレートに移し、さらに球状になるまで増殖培地で培養することによって細胞集塊 C-MSC を得た。IFN-<math>\gamma</math> (0, 10, 50, 100 ng/ml) で刺激し、免疫調節因子 indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) mRNA 発現量を Real-time PCR 法で、タンパク発現量を Western blotting 法で測定した。IDO 活性分析は、培養上清中の IDO 代謝</p>			

産物であるキヌレニン量で定量した。また骨関連タンパク (*Opn*, *Alp*, *Ocn*, *Bmp-2*) mRNA 発現量を Real-time PCR 法で分析した。以下、IFN- $\gamma$  (10, 50, 100 ng/ml) で刺激した C-MSC をそれぞれ C-MSC  $\gamma$  (10, 50, 100) とする。C-MSC  $\gamma$  の免疫調節能は、ヒトから採取した末梢血単核細胞と C-MSC  $\gamma$  をトランズウェルを用いて共培養し、T 細胞増殖アッセイで分析した。同時に、IDO 阻害剤として 1-MT を用いた。 *In vivo* において C-MSC  $\gamma$  の異種移植骨再生効果を検討するために、マウス頭蓋骨に作製した直径 1.6mm 径の小規模骨欠損もしくは直径 4mm 径の大規模骨欠損に対し、C-MSC  $\gamma$  を、対照群として C-MSC を移植した。移植後 4 もしくは 12 週にマイクロ CT 解析を行い、欠損部の新生骨の体積を算出した。さらに、組織切片を作製し HE 染色後、鏡検した。IFN- $\gamma$  10 ng/ml 刺激群は、時間依存的に *IDO* mRNA 発現量を上昇させ、IFN- $\gamma$  24 時間刺激群は、*IDO* mRNA 発現量を濃度依存的に上昇させた。また IFN- $\gamma$  刺激群は、無刺激群と比較し C-MSC における *IDO* protein 発現量、*IDO* 活性を上昇させた。一方、骨関連タンパク mRNA 発現については IFN- $\gamma$  24 時間刺激によって、*Opn* の発現が濃度依存的に減少した。*Ocn* は IFN  $\gamma$  100 ng/ml 刺激時のみ発現量が減少していた。*Alp* および *Bmp-2* は影響を受けなかった。これらのことから、高濃度の IFN- $\gamma$  は C-MSC の石灰化能を低下させる可能性が示唆された。免疫調節能の検討については、C-MSC  $\gamma$  (50, 100) が C-MSC と比較し、有意に T 細胞の増殖を抑制し、1-MT はこれをレスキューした。これらの結果から、C-MSC  $\gamma$  が *IDO* を介して免疫調節能を発揮することが示唆された。異種移植骨再生効果についての検討では、マウス頭蓋骨小規模骨欠損に C-MSC  $\gamma$  (10, 50) 移植 4 週後に、対照群と比較して豊富な結合組織と骨再生が観察された。同様に、マウス頭蓋骨大規模骨欠損に対して、C-MSC  $\gamma$  (10, 50) 移植群で広い範囲での新生骨が観察され、マイクロ CT 解析ではコントロールの約 2 倍の有意な骨再生量を示した。ヒト C-MSC  $\gamma$  (10, 50) の移植がマウス頭蓋骨欠損の再生を促進したことは、IFN- $\gamma$  によって上昇した *IDO* が異種移植免疫拒絶反応を抑制した結果と考えられる。以上のことから、C-MSC  $\gamma$  は免疫調節能を有し、他家移植による再生医療に有用な細胞/細胞外基質複合体であると考えられた。よって審査委員会は、本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。