

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	古高 慎司
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
Magnetic Targeted Delivery of Induced Pluripotent Stem Cells Promotes Articular Cartilage Repair (磁性化 iPS 細胞を用いた関節軟骨再生の有用性)			
論文審査担当者			
主査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	青山 裕彦	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>関節軟骨組織は自己修復能が乏しく，関節軟骨損傷は治療に苦渋することが多い。現在，臨床では骨髄刺激法や骨軟骨移植法などが行われているが，すべてを硝子軟骨で修復できない。そこで，間葉系幹細胞（MSCs）や胚葉性幹細胞（ES 細胞）を用いた軟骨再生医療が行われてきているが，MSCs は侵襲や細胞数の問題，ES 細胞は倫理的問題があるとされ，最近では iPS 細胞を用いた再生医療が盛んになっている。iPS 細胞を用いた軟骨再生医療は，倫理的問題や拒絶反応のない細胞移植療法であり，十分な細胞数を得ることができる。一方で多能性の裏返しであるテラトーマの形成の問題がある。したがって，iPS 細胞から軟骨細胞などへ分化誘導したのちに移植する方法が安全とされている。しかし，ラットの iPS 細胞を分化させずにアテロコラーゲンと混合させ，関節軟骨欠損部に限局して移植すると，軟骨は再生され，テラトーマ形成しないとの報告がある。一方で Kamei ら（2013）は磁性化した MSCs を作成し，外磁場を用いて損傷部位へ効率よく細胞を集積させる細胞移植法を確立し，臨床応用している。そこで著者は，磁性化した iPS 細胞を作成し，外磁場によって軟骨欠損部に限局的に輸送することができれば，テラトーマの形成なく，軟骨再生可能との仮説を立てた。</p> <p>本研究の目的は，iPS 細胞の磁性化の可否，磁性化 iPS 細胞の多能性の維持を検討すること，磁性化した iPS 細胞を外磁場により損傷部位へ効率よく細胞を集積させ，それにより軟骨再生が可能かどうかを検討することである。</p> <p>ヒト iPS 細胞の培養系に MRI 造影剤であるフェルカルボトランを添加して，磁性体を貪食させ，磁性化率を検討した。外磁場にて集積される磁性化 iPS 細胞(m-iPSC)と，集積されない非磁性化 iPS 細胞(non m-iPSC)を分離し，磁性体の封入を確認するために，それぞれベルリン青染色を行った。さらに，ヌードラットへの皮下移植によるテラトーマ形成の有無と，分化誘導により胚様体を形成させ，免疫蛍光染色(β III-チューブリン，デスミン，ビメンチン，α-フェトプロテイン)にて三胚葉の形成から多能性を評価した。In vivo 実験として，ヌードラットの大腿骨滑車面に軟骨欠損を作成し，アテロコラーゲンゲルに包埋した m-iPSC を外磁場によ</p>			

り軟骨欠損部に集積させた。また、コントロール群として m-iPSC を軟骨欠損部に外磁場を用いずに移植した群と、軟骨欠損部に PBS のみを移植した群を作成した。それぞれの群を 4 週と 6 週、8 週で屠殺し、組織学的評価を行った。

フェルカルボトランが 0.25mg Fe/ml, 磁気標識する細胞数が 1.0×10^5 /35mm dish で磁性化率が 96%と最も高かった。ベルリン青染色では、m-iPSC では細胞内にフェルカルボトランが封入されていたが、non m-iPSC には封入されていなかった。ヌードラットの皮下移植では、移植後 7 週において腫瘍形成が確認され、三胚葉が確認できたことからテラトーマの形成を確認した。また、m-iPSC の分化誘導により胚様体が形成され、免疫蛍光染色にて三胚葉の形成を認めた。m-iPSC を外磁場により軟骨欠損部に集積させた群では、サフラニン O 染色で 2 型コラーゲンの形成を認めたが、その他の 2 群では 2 型コラーゲンの形成はわずかであった。Pineda スコアは、m-iPSC を外磁場により軟骨欠損部に集積させた群が、その他の 2 群と比較し、有意に低値であった。また、抗ヒトミトコンドリア抗体を用いた蛍光免疫染色では、m-iPSC を外磁場により軟骨欠損部に集積させた群の軟骨細胞が蛍光染色された。

Kamei ら (2013) が確立した磁性化法にて iPS 細胞は効率よく磁性化可能であり、多能性も失われなかった。磁性化した iPS 細胞は、外磁場により軟骨欠損部に集積することが可能であり、さらにテラトーマの形成なく軟骨再生が可能であった。

以上の結果から、外磁場を用いた磁性化 iPS 細胞の移植は、軟骨再生に有用な方法と考えられ、今後、臨床応用できる可能性があり、本論文は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。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	古高 慎司
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
Magnetic Targeted Delivery of Induced Pluripotent Stem Cells Promotes Articular Cartilage Repair (磁性化 iPS 細胞を用いた関節軟骨再生の有用性)			
最終試験担当者			
主査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	青山 裕彦	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年2月1日の第73回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年1月31日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. iPS細胞を磁性化した際の鉄粒子の動態 2. 鉄粒子を取り込むことによるiPS細胞への影響 3. 磁場による細胞の定着 4. 磁性化iPS細胞移植後の長期成績 5. 本研究の臨床応用 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			