HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハイドロキシアパタイト複合化ダブルネットワークハイドロゲル上での骨髄間葉系幹細胞の骨分化能評価 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	甲斐原, 拓真
Description	配架番号：2753
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15435号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89882
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KAIBARA_Takuma_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏名　甲　斐　原　拓　真

主査　　教授　　近　藤　英　司
審査担当者　副査　准教授　　舟　山　恵　美
副査　准教授　　和　田　は　る　か

学 位 論 文 題 名
ハイドロキシアパタイト複合化ダブルネットワークハイドロゲル上での
骨髄間葉系幹細胞の骨分化能評価
（Hydroxyapatite-hybridized double-network hydrogel surface enhances differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to osteogenic cells）

膝関節軟骨損傷に対して様々な手術法が開発されてきたが、未だ確立された治療法はなく、新たな治療法の開発が求められている。新たな治療法の１つとして、ハイドロゲルを用いた人工軟骨の開発が行われてきた。しかし、これまで開発されたハイドロゲルは、荷重関節である膝関節の負荷に耐え得る材料特性を有さず、骨と接着できないため、臨床応用には至っていない。

申請者の研究グループは、独自に開発したPAMPS/PDMAAm Double Network (DN)ゲルが人工軟骨として応用可能な材料特性を有することを明らかにし、ハイドロキシアパタイト(HAp)を複合化(HAp/DNゲル)させることで骨に接着することを明らかにしてきた。申請者は、HAp/DNゲルの骨への接着機序は、HAp/DNゲル表面が周囲の骨組織中に存在する間葉系幹細胞(MSC)を骨系統細胞へ分化誘導させることによるという仮説を立て、これを明らかにするための一連の研究を行なった。本論文ではまず、兎骨髄由来細胞は同種血清(ABS)を用いてPS dish上で培養するとMSCとしての性質を有することを明らかにした。そして、MSCをHAp/DNゲル上で培養すると８つの骨分化マーカーの遺伝子発現上昇とアルカリフォスファターゼ活性の上昇がみられ、*in vitro*でのHAp/DNゲルによるMSCの骨系統細胞への分化促進能を示した。さらに、*in vivo*の条件でHAp/DNゲルが表面に早期にMSCをリクルートし、MSCを骨系統細胞へ分化させることを示した。最後にHAp/DNゲルが表面粗造構造を有し、CaとPイオンの溶出能を有することを明らかにし、これらがHAp/DNゲルがMSCを骨系統細胞へ分化させる機序である可能性に関して文献を引用しながら示した。これらの結果から、HAp/DNゲル表面はMSCを骨系統細胞へ分化誘導させると結論付けた。

審査にあたり、まず副査の舟山恵美准教授から、ウシ胎児血清(FBS)とABSを用いた場合に細胞の多分化能に差が生じたのはなぜか質問があった。申請者は、今回の研究ではどのような因子が細胞の多分化能に影響したか明らかにできないが、FBSを用いて培養した細胞では大型の細胞が観察され、細胞増殖能に乏しかったことから 、Senescenceや脱分化が起こった可能性があると

回答した。さらに、ABS を用いる条件ではアンジオポエチンなどのアポトーシスを抑制する遺伝子の発現が上昇することが報告されていることを説明した。また、糖尿病などの内科疾患で変形性膝関節が進行しやすい理由に関して質問があった。申請者は、内科疾患により軟骨組織の代謝が阻害されること、内科的疾患を有する患者では BMI が高い傾向にあるために膝関節への力学的負荷が増加することが原因と考えられると回答した。

副査の和田はるか准教授からは、なぜ兎骨髄由来の MCS を実験に用いたのか質問があった。申請者は、兎を用いた過去の研究で HAp/DN ゲルの骨への接着性が実証されてきたため、今回の実験でも兎骨髄由来の MSC を用いたと回答した。さらに、MSC の骨系統細胞への分化機構に関して質問があった。申請者は、MSC の骨系統細胞への分化の初期には転写因子である Runx2 が重要であり、TGF-β や BMP-2 の刺激やカルシウムの細胞内流入によって Runx2 がリン酸化され、核内に移行して１型コラーゲン、オステオポンチン、オステオカルシンなどのプロモータ領域に結合し、発現を調整すると回答した。最後に、HAp/DN ゲルを人工軟骨として臨床応用するに当たってどのような実験が必要なのか質問があった。申請者は、より大型の動物を用いて実臨床に近いモデルを作製して実験を行っていく必要があると回答した。

最後に主査の近藤英司は、in vivo 実験において、円柱状のゲルを関節内ではなく関節外の大腿骨外側顆に埋植した理由について質問した。申請者は、関節内へのゲル埋植は関節液の流入やゲル埋植の深さなど様々な要因に影響されるため、そうした要因を排除するために関節外へのゲル埋植を選択したと回答した。過去の研究と照合し関節内へのゲル埋植であっても関節外へのゲル埋植と同様の結果が得られる可能性が高いと説明した。さらに近藤英司は、DN ゲルが人工軟骨としての材料特性を有するのみならず軟骨再生能を有することに関して、どう考えているのか質問した。申請者は、DN ゲルが骨に接着する部位のみに HAp を複合化させ、関節表面の相対する軟骨に対しては人工軟骨としての機能を有し、移植周囲の軟骨欠損に対しては軟骨再生能を有するという２つの異なる機能を持ち、かつ骨に接着するゲルとしての可能性に関して言及し、これを明らかにするための実験を行っていると回答した。

この論文では、HAp/DNゲル表面はMSCを骨系統細胞へ分化誘導させることを明らかにし、この骨分化誘導機序について、HAp/DNゲルの有する表面粗造構造とCaとPイオンの溶出能を評価した点において高く評価され、今後のDNゲルの人工軟骨としての臨床応用が期待される。

審査員一同は，これらの成果を高く評価し，大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ，申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。