HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A study on the differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells under Xeno-free culture condition [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	渡辺, 陽久
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15964号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92607
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Haruhisa_Watanabe_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　渡　辺　陽　久

学　位　論　文　題　名

A study on the differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells under Xeno-free culture condition

（動物由来成分を含まない培養条件による骨髄由来間葉系幹細胞の分化能に関する研究）

キーワード（５つ）Mesenchymal stem cell, Xeno-free culture, pluripotency, osteoblast, adipocyte

間葉系幹細胞は、多能性幹細胞であり、骨、軟骨、脂肪、線維芽細胞および血管周囲細胞や血管平滑筋細胞などの血管支持組織に分化する。多能性幹細胞の再生医療や細胞治療への応用が期待され、広く研究されている。歯科口腔外科領域においては、顎骨壊死の治療や、歯槽骨再生において、骨髄由来間葉系幹細胞の移植による組織再生医療への応用が研究されている。

間葉系幹細胞の移植による組織再生医療の際には、予め、生体外において間葉系幹細胞を培養し、その細胞数を増加させる必要がある。細胞培養には、古典的に、ウシ胎児由来血清など動物由来の血清が培養補助剤として用いられている。しかしながら、生体内に培養細胞を移植するにあたって、動物由来の成分の組成は未知かつ不均一であり、ロット間でも差があることが問題となっている。そのため、動物由来成分が含まれていない、Xeno-free 培地が開発され、再生医療においては、Xeno-free 条件にて培養された間葉系幹細胞を用いることが期待されている。

しかしながら、従来の血清を含む培養条件（Xeno 培養）と、Xeno-free 培養の条件により、間葉系幹細胞の増殖や分化能ににどのような差異が生じるかに関しては未知な部分が多い。従って本研究では、Xeno 培養と、Xeno-free 培養で増殖させたヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖・分化能への影響について比較検討することを目的とした。

まず、接着初期および分化誘導直前の細胞の形態について検討を行うべく、培養後、3 時間、6 時間、1 日後、7 日後において、Xeno 培養条件と Xeno-free 培養条件にて免疫染色にて比較検討を行った。Xeno-free 培養条件では接着初期において進展した、強固な細胞接着が得られた。経時的に紡錘形の均一な細胞集団に変化することを確認した。一方、Xeno 培養条件では、接着初期では細胞は進展しなかったが、経時的に進展し、比較的大きな細胞形態を含む、多様な形態を示した。

続いて、細胞増殖について、Cell counting kit-8 を用いて経時的な検討を行った。Xeno 培養条件の方が Xeno-free 培養条件よりも早い増殖が得られたが、Xeno 培養条件ではコンフルエントになった後速やかに細胞が死滅、減少したのに対して、Xeno-free 培養条件では死滅すること無く安定した培養を得ることができた。

骨芽細胞および脂肪細胞分化への影響を調べるべく、Xeno 培養条件、Xeno-free 培養条件で 7 日間細胞を培養したのち、共通した分化誘導培地にて分化誘導を行った。分化誘導前に Xeno-free 培養条件で培養を行った群では、骨芽細胞分化が Xeno 培養条件群と比較して有意に促進されたにもかかわらず、脂肪細胞分化は Xeno 培養条件群と比べて有意に抑制された。

細胞増殖および分化能の違いがあることから、細胞のエネルギー代謝状態が違うことが考えられた。そこで、Xeno 培養条件、Xeno-free 培養条件にて培養後 1 日目および 7 日目のミトコンドリア形態の観察を行った。培養後 1 日目では細胞質全体に分布するミトコンドリアが観察され、Xeno-free 培養条件群においては一部のミトコンドリアに断片化が観察されたが、Xeno 培養条件ではミトコンドリアの断片化は観察されなかった。一方、7 日目の時点におけるミトコンドリア形態は、Xeno 培養条件群では細胞質全体に存在する比較的長く融合したミトコンドリアが観察されたのに対して、Xeno-free 培養条件群では、培養 1 日目と同様に、断片化されたミトコンドリアが観察された。これらの観察は、異なる培養条件下でのエネルギー代謝の違いを反映しているものと考えられた。

分化誘導実験の結果から、Xeno 培養群と、Xeno-free 培養群が間葉系幹細胞の分化運命を決定していることが考えられた。そこで、分化誘導直前の時点である、細胞培養 7 日目において、Xeno 培養条件および Xeno-free 培養条件の遺伝子発現の差を RT-qPCR にて観察した。未分化マーカーとして用いられる NANOG、Oct4、骨芽細胞分化マーカーとして用いられる Sp7、RUNX2 は、Xeno-free 培養群で減少傾向を認めたが有意差は認めなかった。同様に、脂肪細胞分化マーカーとして用いられる PPARγ、ADIPOQ、軟骨細胞分化マーカーとして用いられる SOX9、間葉系幹細胞の分類に用いられる CXCL12、PDGFRβ、LEPR はいずれも Xeno-free 培養条件群で減少傾向を認めたが、有意な差は認められなかった。一方で、幹細胞の分化能に影響があることが知られているリシン代謝に関与する遺伝子群、ALDH7A1、AASS は、Xeno-free 培養条件群で有意な上昇が認められた。これらのことは、未分化能や分化能に重要な遺伝子の発現調節に有意な差異はないものの、リシン代謝に変化があることを示唆していた。

以上の研究成果から、Xeno-free 培養条件で培養された骨髄由来間葉系幹細胞は、従来の Xeno 培地で培養した場合と比較して、骨芽細胞への分化能力が高く、脂肪細胞への分化能が抑制されていることが明らかとなった。また、これらの分化能の違いには細胞の代謝状態の変化が関与していることが考えられた。