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_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（歯学）　氏　名　渡　辺　陽　久

審査担当者
主査　教授　飯村　忠　浩
副査　教授　北川　善　政
副査　特任教授　田村　正　人

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）

審査は、審査担当者全員の出席のもと、対面形式の公聴会として行われた。はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ、審査担当者が論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。

以下に論文内容と審査の要旨を述べる。

間葉系幹細胞(MSC)は、再生医療への応用が期待され広く研究されている。MSC の生体への移植の際には、比較的大量の細胞を確保する必要があり、予め生体外において増殖させる必要がある。細胞の増殖には、一般に動物由来の血清を含む培地が用いられるが、動物由来の成分は組成が未知かつ不均一であり病原体を含む可能性も懸念される。そこで、幹細胞の再生医療には、動物由来成分を含ない（Xeno-free）培地が開発されてきた。しかし、従来の血清を含む培地（Xeno 培地）と、Xeno-free 培地による培養条件が、間葉系幹細胞の増殖や分化能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。そこで、本研究では、Xeno 培地と、Xeno-free 培地で増殖させたヒト骨髄由来 MSC 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。

細胞増殖能を比較するため、Cell counting kit-8 を用いて経時的な検討を行った。Xeno 培養条件では比較的速い増殖を示したが、培養 16 日目には細胞の死滅が観察された。一方、Xeno-free 培養条件では増殖速度は比較的遅かったが細胞の死滅は観察されなかった。続いて、骨芽細胞および脂肪細胞への分化能を比較するため、Xeno 培養条件、Xeno-free 培養条件で 7 日間細胞を培養したのち、骨芽細胞分化誘導培地あるいは脂肪細胞分化誘導培地にて分化誘導を行った。その結果、分化誘導前に Xeno-free 培養を行った群では、骨芽細胞分化が比較的促進されたが、脂肪細胞への分化は有意に抑制された。

細胞増殖および分化能の違いをさらに明らかにすべく、経時的な細胞形態およびミトコンドリア形態の差について検討をおこなった。接着初期および分化誘導直前の細胞の形態について、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細胞の伸展が顕著であり、培養後期では紡錘形の均一な細胞集団として観察された。一方、Xeno 培養条件では、接着初期の細胞の伸展は顕著では無かったが、経時的に伸展した細胞も観察され、培養後期では比較的大きな細胞形態を含む多様な形態を持つ細胞集団が観察された。さらに、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比較観察を行った。培養後 1 日目においては、ミトコンドリアは共に細胞質全体に分布していたが、Xeno-free 培養条件群でのみ一部のミトコンドリアに断片化が観察された。培養 7 日目では、Xeno 培養条件群のミトコンドリアは細胞質全体に広く分布して比較的長く融合していた。Xeno-free 培養条件群のミトコンドリアは断片化され核周囲に集積していた。

遺伝子発現の分析では、未分化および分化マーカー発現に有意な差は認められなかったが、リシン代謝に関与する遺伝子群である ALDH7A1 と AASS は Xeno-free 培養条件で有意な上昇が見らた。

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。今回得られた知見は、間葉系幹細胞を応用した再生医療に重要な知見をもたらす可能性があると考えられた。

上記の論文内容および関連事項について、以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

1. Xeno-free培地は数ある中で、今回のXeno-free培地を選択した理由は何か。
2. Xeno-free培養条件の細胞外基質としてラミニン511E8フラグメントを選択した理由および他の細胞外基質が間葉系幹細胞与える影響はどうか。
3. 間葉系幹細胞のロット差はあると考えられるか。
4. 長期培養した際、Xeno培養群とXeno-free培養群で増殖の結果に差が生じた理由は何か。
5. ミトコンドリア形態と細胞内分布の変化は、分化に与える影響があると考えるか。
6. 遺伝子発現解析について、分化誘導直前のqPCRで骨芽細胞分化に関する遺伝子発現はXeno-free培養群で有意に上昇していないのはどう解釈するか。
7. リシン代謝マーカーの遺伝子発現が有意にXeno-free培養群で上昇していたが、骨芽細胞分化への影響はどう考えるか。
8. 間葉系幹細胞の抗炎症作用について機序および応用方法についての知見はどうか。
9. Xeno培養群で細胞外基質のコーティングを行うと、予想される結果はどうか。
10. 培養に用いられる血清にはラミニンは含まれているか。

これらの質問に対して、学位申請者から明解な説明と回答が得られた。本研究の内容から審査担当者全員は、学位申請者が博士（歯学）の学位を授与されるに相応しいと認めた。