

京都大学	博士(医学)	氏名	小山 典昭
論文題目	Investigation of chondrogenic differentiation capability using human orofacial tissue-derived multipotent cells and human iPS cells (ヒト口腔顔面組織由来多分化能細胞およびヒト iPS 細胞を用いた軟骨分化能の検討)		
(論文内容の要旨)			
<p>近年、関節軟骨の変性を伴う高齢者の変形性顎関節症が増加傾向にあり、難治例も存在する。関節軟骨組織は血管に乏しく、損傷後の自然治癒は期待出来ないため、軟骨再生医療の実現が期待されている。本研究では軟骨再生医療の細胞源として、脱落乳歯および智歯由来歯髄幹細胞、顎関節症患者の関節滑液由来細胞、iPS 細胞の可能性について検討した。</p> <p><u>I. 脱落乳歯および智歯由来歯髄幹細胞を用いた検討</u></p> <p>脱落乳歯あるいは智歯の歯髄組織には、多分化能を持つ歯髄幹細胞の存在が報告されている。高濃度の細胞溶液を培養皿に接着させ mass として培養するマイクロマス培養を用いて、これらの歯髄幹細胞から軟骨分化誘導を行った。2 週間の培養により、初期および後期の軟骨分化マーカーである II 型、X 型コラーゲンの遺伝子発現を認めた。智歯に比べ脱落乳歯由来歯髄幹細胞から誘導した軟骨細胞では、両遺伝子の発現がより高く、軟骨基質を検出するアルシアンブルー染色においても細胞周囲がより強く染色された。以上より、智歯よりも脱落乳歯由来歯髄幹細胞の方が軟骨分化能に優れていることが示唆された。</p> <p><u>II. 顎関節症関節滑液由来細胞を用いた検討</u></p> <p>炎症を生じた関節滑液中には組織再生能力を持つ細胞が含まれることが報告されており、顎関節症においても同様の細胞の存在が予想された。そこで、顎関節症患者の顎関節腔内洗浄液から接着細胞を採取し、分化誘導を行った。2 週間のマイクロマス培養により II 型、X 型コラーゲン遺伝子を発現する軟骨細胞が誘導された。脱落乳歯由来歯髄幹細胞と比較し、誘導軟骨細胞はより軟骨細胞様の形態を示し、細胞周囲はアルシアンブルー染色において濃染した。骨芽細胞、脂肪細胞、神経細胞への分化も認めた。顎関節症関節滑液中に、歯髄幹細胞以上の軟骨分化能を有する多分化能細胞の存在を証明出来たが、継代数の増加に伴い分化能の低下を認めた。</p> <p><u>III. ヒト iPS 細胞を用いた検討</u></p> <p>ヒト iPS 細胞は再生医療の新たな細胞源として期待される。しかし軟骨細胞への明らかな形態的变化を示す分化誘導法は報告が無いため、今回誘導法の開発を行った。ヒト iPS 細胞株 201B7 を用いて検討した結果、①未分化 iPS 細胞からの胚様体 (EB) 形成、②培養皿上に接着させた EB からの細胞増殖、③単一細胞に解離させ残存 EB を除去後の単層培養、④3次元のペレット培養の4段階から成る培養法により、軟骨細胞を誘導することに成功した。</p> <p>ペレット培養開始後 21 日目には、ペレット内の細胞は明るい細胞質を有する大型で円形の軟骨細胞様の形態となり、細胞周囲はアルシアンブルー染色で濃染し、軟骨基質の産生が示された。II 型コラーゲン、アグリカンの遺伝子発現も経時的に増加した</p>			

<p>が、X 型コラーゲン遺伝子の発現は認めなかった。軟骨細胞への誘導成功率は約 73% であった。他の複数のヒト iPS 細胞株でも軟骨細胞分化が確認された。ただし免疫組織化学的検討では II 型コラーゲンを検出できず、軟骨細胞としての成熟度は不十分である可能性がある。</p> <p>ヒト歯髄幹細胞、顎関節症関節滑液由来細胞、iPS 細胞を用いて <i>in vitro</i> における軟骨細胞への分化能の検討を行った。歯髄幹細胞、滑液由来細胞から誘導した軟骨細胞は後期分化マーカーまで発現していたが、得られる細胞数や分化能の維持に限界があった。ヒト iPS 細胞については十分に成熟した軟骨細胞を誘導するにはさらなる改良が必要である。将来的な軟骨再生医療には欠損部位やサイズに応じた適切な細胞選択が必要になると考察されるが、本研究は顎関節症に対する軟骨再生医療における 3 種類の細胞源の可能性を提示するものである。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>ヒトの脱落乳歯及び智歯由来歯髄幹細胞、顎関節滑液由来細胞、iPS 細胞を用いて各々の軟骨細胞分化能について検討した。脱落乳歯及び智歯由来歯髄幹細胞は、生体への侵襲なく採取できる。骨髄由来間葉系幹細胞には劣るが、ともに軟骨細胞分化能を有し、智歯よりも脱落乳歯由来歯髄幹細胞でより軟骨細胞に分化しやすかった。また、顎関節症患者の関節滑液中に多分化能細胞の存在を証明した。遺伝子発現や組織学的検討より、骨髄由来間葉系幹細胞と同等もしくはそれ以上の分化能を認めた。顎関節滑液は治療過程で採取可能であるが、得られる細胞数が少なく、継代数増加に伴い増殖能・分化能の低下を認めた。さらに、4 段階から成る誘導法を用いて、iPS 細胞から II 型コラーゲン、アグリカン遺伝子を発現する軟骨細胞を誘導し得た。しかし免疫組織化学的検討より、軟骨細胞としての成熟度は不十分であると考えられた。歯髄幹細胞、滑液由来細胞からの誘導軟骨細胞は後期分化マーカーである X 型コラーゲンまで発現していたが、得られる細胞数や分化能の維持に限界があった。一方、iPS 細胞については、十分に成熟した軟骨細胞を誘導するにはさらなる方法の改良が必要である。軟骨再生医療の細胞源として 3 種類の細胞の異なる特性が示された。</p> <p>以上の研究は軟骨再生医療における細胞供給源の選択についての理解に貢献し、顎関節症のみならず今後の軟骨再生医療の発展に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 1 月 16 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
<p>要旨公開可能日： 年 月 日 以降</p>