

京都大学	博士（医学）	氏名	金 永輝
論文題目	Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence <i>via</i> down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase (低酸素下における培養はp16とERKを低下させることによって間葉系幹細胞の老化を回避させる)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>組織幹細胞の一つである間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell、MSC)は、骨、軟骨及び脂肪への分化能を有する付着性の細胞という機能により定義される組織幹細胞である。その分子レベルでの本態は明らかにされていないが、既に様々な領域で再生医療への応用が開始されている。組織幹細胞と同様にMSCの増殖能は有限であり、細胞老化により増殖を停止する。細胞の老化は内因性と外因性の両方の要因によって引き起こされ、テロメアの短縮は内因性要因における最も重要な因子であり、増殖シグナルやDNA損傷は主たる外因性要因である。活性酸素分子によって引き起こされる酸化ストレスはDNA損傷を誘発する一因である。MSCはこれまでに脂肪、滑膜、臍帯といった組織から分離されているが、骨髄由来のものが最も汎用されている。骨髄中の酸素濃度は骨髄洞からの距離によって1~7%という異なった値をとることが知られている。骨髄内でのMSCの正確な局在は不確定であるが、MSCを取り巻く生理的な状態での酸素濃度が、体外培養条件下での酸素濃度(20%)に比べてはるかに低いことは明らかである。このような高い酸素濃度は過度な酸化ストレスを誘発し、MSCを老化へと導く可能性が懸念される。このような観点から、MSCを低酸素条件下で培養する幾つかの試みがなされ、低酸素条件下での培養は間葉系幹細胞の増殖や分化誘導にとってよい影響を及ぼすことが示されている。しかし、その分子機構は解明されていない。</p> <p>本研究では、4株の初代培養MSCを通常酸素濃度(20%、以下通常酸素群)及び低酸素濃度(1%、以下低酸素群)環境で長期間(200日以上)培養し、細胞増殖の動態及び骨、軟骨、脂肪の3つの細胞系譜への分化能力を比較検討した。まず増殖動態に関しては、倍加数約15(培養日数約50日)までは、両群に差を認めなかったが、その後、通常酸素群は増殖を停止したのに対し、低酸素群はほぼ同等の倍加時間で増殖を続け、最終的な倍加数で両群には2倍以上の差が生じた。細胞老化の状態をsenescence-associated-<math>\beta</math>-gal(SA-<math>\beta</math>-gal)染色で評価したところ、増殖をほぼ停止した時期の通常酸素群では、50~80%の細胞がSA-<math>\beta</math>-gal陽性であったのに対し、同時期の低酸素群では、SA-<math>\beta</math>-gal陽性細胞は10%以下であった。これまでの研究により、MSCの細胞老化に深く関わる因子であるサイクリン依存性キナーゼの阻害因子であるp16の発現を解析したところ、通常酸素群では、培養経過とともに発現が亢進したのに対し、低酸素群では、低値が維持されており、細胞老化の回避と強く関連していることが示唆された。</p> <p>分化能に関しては、骨分化能は、両群間に有意な差は認められなかったが、脂肪と軟骨への分化能は、低酸素群が通常酸素群を上回っていた。これらの事象の分子基盤を検討するために、MSCの増殖・分化に関連するシグナルであるMAPK(mitogen-activated protein kinase)ファミリーの変化を解析したところ</p>			

、ERK(extracellular signal regulated kinase)の活性が低酸素群で抑制されていることが判明した。このERKの抑制は低酸素下で誘導される重要な因子であるHIF-1 $\alpha$ (hypoxia-induced factor-1 $\alpha$ )とは独立した現象であった。更にp16の発現抑制との関連性を解析するために、ERKの活性化を司るMEK(MAPK/ERK kinase)の阻害剤であるU0216を用いて、通常酸素濃度下でERKの活性化を阻害した。その結果、ERKの活性化抑制と同時にp16遺伝子の発現も抑制されており、両者が関連している可能性を示唆する結果が得られた。以上の結果より、低酸素下での培養はp16及びERKを阻害することにより、MSCを細胞老化から回避させ、同時に多分化能を維持させることができることが明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell、MSC)は、骨、軟骨、脂肪等の間葉系細胞に分化できる組織幹細胞であり、再生医療に有用な細胞として期待されているが、その生物学的特性については未解決な点が多い。そこで申請者は培養時酸素濃度のMSCに対する影響を解析した。ドナー骨髄より単離したMSCを通常酸素濃度群(20%)と低酸素濃度群(1%)に分け、200日以上長期培養を継続した。培養日数約50日までは両群に差を認めなかったが、その後通常酸素群では大部分が細胞老化となり増殖を停止したのに対し、低酸素群では増殖を続け、累積細胞数で通常酸素群が平均 $2^{39}$ 個であったのに対し低酸素群では $2^{55}$ 個であった。この低酸素群での細胞老化からの回避は細胞周期制御因子p16の発現抑制と関連していた。分化能に関しては、脂肪と軟骨への分化能に関して低酸素群が通常酸素群を上回っていた。MSCの増殖・分化に関与するMAPKシグナルについて解析したところ、ERKの活性が低酸素群で抑制されており、これがp16遺伝子の発現抑制と関連していることが判明した。以上より、低酸素濃度下での培養はERKの活性及びp16発現を阻害することにより、MSCを細胞老化から回避させ、多分化能を維持させることが明らかになった。以上の研究はMSCの生物学的特性の解明に貢献し、適切な培養系を構築することに寄与するところが多い。

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。

なお、本学位授与申請者は、平成22年2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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降