

## 審査の結果の要旨

氏名 保 呂 聰

本論文は、「静水圧を用いた ES 細胞の分化に関する研究」と題し、本文 6 章からなる。以下に論文の概要、続いて各章についての要旨を述べる。

高齢化社会に突入している現在においては慢性関節リウマチや変形関節症などの関節軟骨についての疾患は深刻な問題となっており、再生医療への応用を目指して幹細胞から軟骨細胞への分化研究が求められている。一方で、全ての細胞に分化することが可能な ES 細胞についての研究は、主に化学的刺激を用いることによって多数行われているが、それらの研究では臨床での安全性が不透明な外来因子を用いている。そのため、化学的刺激に比べ、より安全な物理的刺激による ES 細胞の分化制御法が研究され始めているが、これまでに ES 細胞は高いせん断応力により動脈内皮細胞に、低いせん断応力により静脈内皮細胞に、また、引張刺激により平滑筋細胞に分化誘導されることが報告されており、実際の生体内で受ける物理的刺激と ES 細胞の分化は関連付けられると考えられている。そこで、本研究では生体内で軟骨細胞へ負荷されている静水圧刺激に注目し、ES 細胞への静水圧負荷システム、およびその前後の培養系を構築して、静水圧負荷が ES 細胞の分化に与える効果を検証した。また、ES 細胞における静水圧刺激の認知の有無を細胞レベルで評価するため、静水圧負荷下での ES 細胞およびそのシグナルのリアルタイム観測系を構築し、典型的なシグナル応答である  $Ca^{2+}$  の挙動を検証した。

1 章 「序章」では、研究の背景として ES 細胞などの幹細胞について得られている知見や、これまでに提案されてきた関節疾患の治療法およびその問題点、物理的刺激と細胞の分化との関連、細胞の物理的刺激認知機構についての仮説を述べ、また、静水圧を細胞へと負荷したこれまでの研究を総括した。また、これらをもとに、本研究の特色である、静水圧刺激を ES 細胞へと負荷することの持つ意義について述べた。

2 章 「目的」では、序章の内容を背景として本研究の目的を述べた。具体的には静水圧刺激を ES 細胞へと負荷する二種類のシステムを構築すること、およびそれらのシステムを用いて、一方では静水圧刺激が ES 細胞の分化へ与える影響を検証し、他方では静水圧を負荷した ES 細胞内の  $Ca^{2+}$  挙動を検証するという目的を示した。

3 章 「実験方法」では、本研究で使用した細胞種やその培養法、分析の手法などの実験の実験手順について述べた。

4 章 「実験結果」では、まず比較対象として化学的刺激を負荷した際の ES 細胞の分化

をリアルタイム PCR を用いて分析した結果を述べた。次に、いくつかの分析手法を用いて静水圧刺激を負荷された ES 細胞の分化を評価した結果を述べた。具体的には複数の染色法やウエスタンブロッティング、アルカリフォスファターゼ活性測定、およびリアルタイム PCR を用いて評価したが、それらによって静水圧刺激は、化学的刺激と同様に ES 細胞の骨・軟骨系細胞への分化を誘導することを世界で初めて実証した。また、静水圧負荷後の静置培養日数と分化誘導との関連を検証した結果を示し、本論文で提唱した実験方法では静置培養日数は 7 日間が適切であることを示した。続いて、ES 細胞に比べ、倫理的な問題や免疫拒絶の問題などが少なく、より臨床応用への期待がされている iPS 細胞へと静水圧刺激を負荷し、その分化の有無を検証した結果を示した。ここでは、iPS 細胞は ES 細胞に比べてその分化能力は劣るものの、静水圧刺激によってある程度軟骨細胞へ分化誘導されるということ、また、その一方で骨細胞への分化は誘導されないということを示した。次に、静水圧を負荷した後に担体へと播種した際の ES 細胞の分化誘導の有無を調査し、コーゲンゲルへ播種した場合も静水圧刺激によって分化誘導が促進されることを示し、その臨床応用への可能性を示した。静水圧刺激による ES 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  挙動を検証する実験においては、まず、細胞へ刺激を負荷しない際の挙動を観察し、刺激無負荷時には  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が大きく変動をしないことを示した。また、これまでにすでに ES 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を一過性に上昇させることが知られている ATP を ES 細胞へと負荷し、その  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を観察することにより、構築した計測システムの有効性を確認した。こうしてその有効性を確かめた  $\text{Ca}^{2+}$  濃度計測システムを用いて静水圧を負荷した際の ES 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を計測した結果、これまでに報告されている成熟軟骨細胞と同様に、ES 細胞においても刺激除去時に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇することを世界で初めて観測し、未成熟な ES 細胞にも成熟軟骨細胞と同様に静水圧感受機構がすでに存在している可能性を示した。

5 章 「考察」では、本研究で得られた結果を過去の文献と照らし合わせた上、それらが持つ意義を分化誘導実験と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度計測実験に分けて述べた。また、得られた知見を今後の再生医療においてどのように利用すべきかを述べた。

6 章 「結論」では、本研究で得られた結果の総括を述べた。

以上のように、本論文では静水圧刺激を ES 細胞へと負荷する二種類のシステムを構築し、さらにそれらのシステムを用いて、静水圧刺激が ES 細胞を骨・軟骨系細胞へと分化誘導可能であるということや、ES 細胞にも成熟軟骨細胞と同様に静水圧感受機構が存在している可能性があることを示したが、これらは、工学的手法を用いることによって再生医療に貢献出来る大きな可能性を示しており、工学的な意義が大きいと考えられる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。