

審査の結果の要旨

氏名 王文杰

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) は、間葉に由来する体性幹細胞であり、間葉系に属する細胞 (骨細胞、心筋細胞、軟骨細胞、脂肪細胞など) への分化能を有しており、再生医療への応用が期待されている。このような MSC を先端医療に応用するためには、高効率かつ高信頼性の分化誘導技術の確立が重要である。本論文では、ガラス基板上に 100 μm の間隔で 100 μm の直径を有する細胞接着性マイクロパターンを構築し、その基板上で MSC をパターン培養することによって、100 μm の均一なサイズを有した MSC のスフェロイドが形成されることを見出した。さらに、本論文では、培地中に分化誘導シグナルを与えた場合、上記の MSC スフェロイドは、単層培養された MSC よりも高効率で脂肪細胞、骨芽細胞、肝細胞へと誘導されることを明らかにした。このように、本論文は、MSC の高効率かつ高信頼性の分化誘導技術としてのマイクロパターン化基板上でのスフェロイド培養法の可能性について検討を行っている。本論文は全 6 章より構成されている。

第一章では、序論として幹細胞および MSC の歴史とその性質さらに MSC の分化誘導法について概説し、本研究の背景及び目的を述べている。

第二章では、マイクロパターン化細胞培養基板の作製法と基板上での細胞培養によるスフェロイド形成について記述している。肝細胞、ヒト由来 MSC(hMSC)からスフェロイドが形成されることを報告している。

第三章では、マイクロパターン化された hMSC スフェロイドの脂肪細胞および骨芽細胞への分化誘導について検討を行っている。本章では、分化誘導シグナルとして適切な化学的刺激を与えることによって、MSC から脂肪細胞および骨芽細胞への分化が誘導され、スフェロイド培養は単層培養よりも高い分化誘導効率を示すことを細胞の特異的染色法(オイルレッド O 染色、アリザリンレッド染色)およびリアルタイム PCR による特異的 mRNA の定量によって明らかにした。さらに、スフェロイド培養では、スフェロイド内部においても細胞が壊死することなく、ほぼ 100%の細胞が分化していることが明らかになった。

第四章では、hMSC スフェロイドの脂肪細胞および骨芽細胞への分化のメカニズムをマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析によって検討している。スフェロイド培養と単層培養で発現量が変化した遺伝子の数を評価したところ、スフェロイド培養ではより多くの遺伝子の発現量に変化が見られることが明らかになった。また、第三章のリアルタイム PCR の結果と一致して、脂肪細胞および骨芽細胞の分化過程に関与する代表的な遺伝子の発現量がスフェロイド培養においてより大きく変化していることを示している。さらに、MSC

の未分化状態の維持に寄与する遺伝子群の発現がスフェロイド培養では顕著に低下していることも示唆された。一方、スフェロイド培養が高い分化誘導効率を示す理由に関しては、細胞外マトリックスや細胞間相互作用に関連した遺伝子群の発現量が単層培養とスフェロイド培養で大きく異なっていることが明らかとなり、これらの遺伝子群の関与が示唆された。このスフェロイド培養による分化誘導メカニズムに関しては更に詳細に解析する価値があるものと思われる。

第五章では、hMSC スフェロイドの肝細胞への分化誘導について検討を行っている。本章では、適切な分化誘導シグナルを与えることで、MSC が肝細胞様の細胞へと分化し、アルブミンの発現や CYP1A1 の遺伝子発現が増大することを明らかにしている。

第六章では、第二章から第五章までの研究を総括し、本論文の成果を含めて今後の展望について論じている。

以上のように、本論文では、マイクロパターン化されたスフェロイド培養を利用した MSC の高効率かつ高信頼性の分化誘導技術について述べていた。この技術は、再生医療や薬剤スクリーニングなどへの幅広い応用が期待でき、先端医療に大きく貢献することが期待される。

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。