

学位論文審査結果要旨

氏 名	畠山 昌久			
論文審査委員	主査 所属	障害機構系	病態機構部門	田中 良哉
	副査 所属	生体情報系	病態情報部門	鈴木 秀明
		生体適応系	生体構造部門	森本 景之
		系	部門	部門
		系	部門	部門

論文題目

Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cell derived from hip joints. A comparative analysis with a matched control knee group

(股関節内滑膜組織由来の間葉系幹細胞の単離と特徴: 同一患者の膝関節内滑膜組織由来 MSCs との比較研究)

学位論文審査結果要旨

外傷や変性等によって破壊された骨・軟骨の機能は不可逆的であり、再生を目指した治療法の開発が必要不可欠である。本邦では、iPS 細胞を用いた再生医療が注目されるが、間葉系幹細胞も期待されている。間葉系幹細胞は、骨芽細胞・骨細胞、軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞等の関節を構成する中胚葉系細胞に分化する多能性幹細胞で、顕著な自己増殖能、複製能を有する。また、骨髄や脂肪組織などからも容易に採取可能で、種々の炎症性細胞に作用して強力な免疫抑制作用を発揮し、移植拒絶反応に対して臨床応用されている

本研究では、同日に膝と股関節の関節鏡手術を施行した 8 症例に於いて、股関節と膝関節の滑膜組織から間葉系幹細胞を単離し、自己増殖維持能、多分化能などを比較検討した。関節内滑膜組織をコラゲナーゼで処理し、得られた有核細胞を 6 枚の 90cm² dish に 20%ウシ血清入り培地で 14 日間培養した。さらにトリプシンを用いて細胞を剥離して 21 日間培養し、得られた passage 1 細胞を凍結保存した。

その結果、単一重量当たりの得られた有核細胞数は股関節よりも膝関節内滑膜からの方が多かったが、colony 形成能には有意差は認めなかった。膝関節滑膜由来の間葉系幹細胞の方が股関節と比べ Oil red O 染色陽性率、real time PCR での adipsin の発現率が高く、脂肪細胞への分化能が示された。また、膝関節由来の間葉系幹細胞のほうが、COL2A1 の発現が有意に高く、軟骨細胞への分化能が示唆された。さらに、骨細胞分化能については、膝由来と股関節由来の間葉系幹細胞では、von Kossa と ALP の二重染色陽性率に差はなかったが、RUNX2 と BGLAP の発現は膝関節の方が有意に高く、ALP と COL1A1 の発現は股関節由来で高かった。

以上から、膝関節に加えて、股関節の滑膜からも間葉系幹細胞を単離し得たが、膝関節滑膜由来の間葉系幹細胞のほうが、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞への分化能がいずれも高いことが明らかになった。間葉系幹細胞の再生医療への応用を考えると、膝関節由来の滑膜の方が有用性が高い可能性が示唆された。

本論文では、膝関節滑膜由来の間葉系幹細胞が脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞へ高い分化能を有する事を明らかにし、外傷や変性等によって破壊された骨・軟骨の再生医療を目指す上では、大変に重要な報告である。よって、本学の学位論文として適格であると判断した。

氏 名	畠山 昌久
論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)	
Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cell derived from hip joints. A comparative analysis with a matched control knee group	
(股関節内滑膜組織由来の間葉系幹細胞の単離と特徴：同一患者の膝関節内滑膜組織由来の間葉系幹細胞との比較)	
論文要旨	
目的：股関節内滑膜組織からの間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells(以下 MSCs)) の単離と、同一患者の膝関節内滑膜組織由来の MSCs の自己増殖維持能、多分化能を比較すること	
方法：同日膝と股関節の関節鏡手術を施行した 8 人の症例から関節液と滑膜を採取した。膝と股関節内滑膜組織をコラゲナーゼ処理し、得られた有核細胞を 6 枚の 90cm ² dish に 20%ウシ血清入り培地で 14 日間培養した。14 日後、3 枚の dish をクリスタルバイオレット染色を用いて、形成した colony 数を count した。残りの 3 枚はトリプシンを用いて、細胞を剥がし、さらに 21 日間培養した。得られた passage 1 細胞を凍結保存した。凍結した細胞は解凍し、自己増殖維持能、多分化能 (脂肪分化、骨分化、軟骨分化) の実験に用いた。	
膝関節と股関節の滑膜組織から単離した有核細胞数、colony 形成能、MSCs の自己増殖維持能、多分化能を比較した。	
結果：単一重量当たりの得られた有核細胞数は股関節よりも膝関節内滑膜からの方が多かった。colony 形成能に有意差は認めなかった。膝の関節液からは MSCs を単離し得たが、股関節の関節液からは単離できなかった。脂肪分化能では、Oil red O 染色で colony 陽性率は、膝関節滑膜由来の MSCs の方が股関節と比べ有意に高く、real time PCR で adipsin の発現も膝関節の方が高かった。骨分化能では、von Kossa と ALP の二重染色にて colony 陽性率に差はなかったが、real time PCR では股関節の方が ALP と COL1A1 の発現が有意に高く、RUNX2 と BGLAP の発現は膝関節の方が有意に高かった。軟骨分化能では、COL2A1 の発現が膝関節の方が有意に高かった。	
結論：股関節内の滑膜から MSCs の単離をしえた。しかし、同一症例の膝関節内滑膜由来の MSCs と比較すると、脂肪分化能、骨分化能は膝関節の方が高かった。膝関節滑膜由来の MSCs は幹細胞を利用した再生医療において、股関節由来のものに比べ良い供給源となりうることが示唆された。	