

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	機能再建・再生領域 脊椎脊髄病態修復学教育 研究分野 4年 劉希哲
(論文題目) High osteogenic potential of adipose- and muscle- derived mesenchymal stem cells in spinal ossification model mice (骨化モデルマウス組織由来間葉系幹細胞の骨化能に関する検討)	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景】脊柱靱帯骨化症(後縦靱帯骨化症、黄色靱帯骨化症など)は厚生労働省の難治性疾患に指定され、患者のQuality of Lifeを著しく低下させるが、その機序は明らかではなく、治療法も確立していないのが現状である。これまで我々は、脊柱靱帯に存在する間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells:MSCs)の誤った分化が脊柱靱帯異所性骨化の起因であり、脊柱靱帯骨化症患者では非骨化症患者と比較し脊柱靱帯に存在する間葉系幹細胞がより高い骨分化能を有することを報告している(Asari T. BBRC.2012, Chin S. BBRC.2013, Harada Y. BBRC.2014, Chiba N. JPS.2015)。</p> <p>【目的】頭頸移行部の骨化による脊髄慢性圧迫の自然発症モデルである遺伝性骨軟骨異常マウス(tiptoe-walking mice;ttwマウス)において、その組織由来MSCsの役割は不明な点が多い。本研究の目的はttwマウスの異なった組織からMSCsを樹立し、ttwマウス由来間葉系幹細胞の骨化能と行動学的評価との関連を検討することである。</p> <p>【方法】採取組織は骨髄、脂肪、筋肉、皮膚とし、8週齢、20週齢の雄C57BL/6Jマウス(WT)とttwマウスから麻酔下に採取した。採取した脂肪、筋肉、皮膚に対してcollagenase TypeI処理後、線維芽細胞様細胞を単離した。MSCsは各組織より得られた細胞をそれぞれ3回継代後、そこからCD34-negative(-)、CD45-negative(-)、CD105-positive(+)をマーカーとしてfluorescence-activated cell sorting (FACS)で分離した。それぞれ分離したMSCsの骨分化能は、アリザリンレッドS染色の吸光度と骨化関連遺伝子の発現をリアルタイムPCRにより評価した。骨化の評価はマイクロCTを用いて、組織学的評価はHE染色、トルイジンブルー染色、ALP、TRAP染色をttwマウス4週齢から20週齢まで4週ごとに行った。運動機能評価はBasso Mouse scale (BMS)を用い、感覚機能評価は機械的刺激、熱刺激を経時的に評価し、WTマウスと比較検討した。</p> <p>【結果】WTマウス、ttwマウスそれぞれで脂肪、筋肉の組織からCD34(-)、CD45(-)、CD105(+)細胞が樹立された。WTマウス、ttwマウス共に、それぞれの組織から得られるCD34(-)、CD45(-)、CD105(+)細胞の収率は70-80%で同程度の値を示した。8週齢ttwマウスの脂肪と筋由来のMSCsは、WTマウス由来MSCsと比較してアリザリンレッドS吸光度は有意に高値を示した。8週齢ttwマウスの脂肪および筋由来MSCsはWTと比較して骨化関連遺伝子であるOPN、OCN、BMP2が有意に高値であった。マイクロCTでは8週齢から骨化が出現し、経時的に増大を認めた。HE染色とトルイジンブルー染色でも8週から骨化が出現することが示された。ALP&TRAP染色の結果、8週から骨芽細胞が増加し、12週でピークを向かえ、16週から減少した。ttwマウスのBMSはWTマウスと比較して、12週齢から経時的に有意に低下した。機械的刺激、熱刺激に対する反応時間は運動機能の低下より早く8週齢から有意に延長した。</p> <p>【考察および結論】MSCsの樹立はttwマウス由来組織脂肪と筋肉からも可能であった。8週齢から骨化が出現するttwマウスは運動機能より感覚機能が脊髄障害をより鋭敏に反映し、同時期のttwマウス由来のMSCsは高い骨化能を示した。本研究の結果からttwマウスの骨化メカニズムにMSCsが関与することが明らかとなった。</p>	

- ※1 乙の場合, ○○領域○○教育研究分野にかえて, 所属の○○講座を記入すること。
- ※2 論文題目が英文の場合は()内に和訳を付記すること。