

氏名（本籍）	菅谷 久（千葉県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 7043 号		
学位授与年月	平成 26 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	家兔骨壊死モデルへ移植した自家骨髄間葉系幹細胞の長期追跡		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	大根田 修
副査	筑波大学教授	医学博士	千葉 滋
副査	筑波大学講師	博士（医学）	三好 浩稔
副査	筑波大学講師	博士（医学）	坪井 洋人

論文の内容の要旨

（目的）

家兔骨髄間葉系幹細胞に量子ドットを導入し骨壊死組織に移植した後、移植細胞を追跡しその分化過程を評価する。加えて、骨芽細胞に分化した細胞内に量子ドットが含まれていることを示し、移植細胞から直接分化していることを示す。以上 2 点を明らかにすることにより、間葉系幹細胞の生体内移植方法の確立を目的として本研究を遂行した。

（対象と方法）

12 週齢家兔から骨髄血を採取し骨髄間葉系幹細胞を単離培養した後、量子ドットを骨髄間葉系幹細胞に導入できたかを *in vitro* で評価した。フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原マーカーにより骨髄間葉系幹細胞の特性を、蛍光顕微鏡での観察により量子ドットの導入率を、各々算出し評価した。

次に、12 週齢家兔第 4 足根骨を壊死させ背面皮下に留置後、壊死骨内に量子ドットを導入した骨髄間葉系幹細胞を自家移植し、移植後組織での移植細胞の局在及び骨新生について組織学的に評価した。

（結果）

著者は細胞表面抗原マーカーによる評価を行い、陽性マーカーである CD81 が陽性となる細胞が 90%、陰性マーカーである CD34 および HLA-DR が陽性となる細胞がそれぞれ 5.6%、1%未満であることを見出した。

細胞質全体に赤色に蛍光される量子ドットを認め、量子ドット導入率が 93.3 ± 2.0 %であることを見出した。

組織学的解析では、著者は、移植後 4 週では量子ドットの局在と一致してアルカリフォスファターゼ

(ALP)染色で陽染される領域およびトルイジン青(TB)染色で蛍光染色される領域の重なりを観察し、この結果は、移植後 8 週および移植後 4 週共に類似していることを明らかにした。また、移植後 12 週では、量子ドット・ALP 染色・TB 染色の局在が一致している領域と、量子ドット・TB 染色の局在は一致しているが ALP 染色で染色されない領域が混在していることを明らかにした。一方、移植後 24 週では、量子ドット・ALP 染色・TB 染色の局在が一致している領域を見出せなかった。

電子顕微鏡による解析では、豊富な粗面小胞体やミトコンドリアを含んだ、活性化状態の骨芽細胞の特徴に矛盾のない細胞を見出し、その細胞質内には量子ドットを確認した。

(考察)

著者は、骨髄間葉系幹細胞に量子ドットを高い導入率で導入する方法を確立した。この方法を基盤として、壊死骨内に移植後 24 週経過しても、量子ドットを導入した骨髄間葉系幹細胞を確認することができた。以上から、量子ドットを用いた方法が骨髄間葉系幹細胞の追跡マーカーとして有用であることを示した。

次に著者らは、細胞内に量子ドットが存在することを直接示すために電子顕微鏡による解析を行なった。骨芽細胞内に量子ドットを観察することができたことから、移植した骨髄間葉系幹細胞が骨芽細胞に直接分化し、骨新生に寄与していることを明らかにした。

今後、以下の 2 点において、著者がさらに研究を進展させることが期待できる：

- 1) より臨床疾患に即した動物モデル、臨床治療に近い移植方法、他の治療との併用など様々な角度から検討を行い、臨床で実施している骨壊死に対する濃縮自家骨髄血移植の有用性を明らかにする。
- 2) 骨新生効果が期待される治療法を開発し、臨床治療に応用する。

審査の結果の要旨

(批評)

本博士論文は、量子ドットを用いることで間葉系幹細胞を長期間に渡り観察することが可能となり、特に移植後の生体内モニターリングシステムの確立に向けて大きく進展させる内容である。本博士論文において新規に発見された内容は、今後、間葉系幹細胞を用いた幹細胞治療法の有効性を評価する一つの指標となりうる意義ある研究成果を示している。

平成 25 年 12 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。