

氏名（本籍）	佐藤 和聡（宮城県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 7494 号		
学位授与年月	平成 27 年 4 月 30 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	高い培養安定性と細胞増殖促進作用を持つ脂肪由来間葉系幹細胞用無血清培養系の開発と培養細胞の性質及び組織修復能の評価		
主査	筑波大学教授（連携大学院）	博士（薬学）	谷口 彰良
副査	筑波大学教授	薬学博士	橋本 幸一
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	大石 久史
副査	筑波大学講師	博士（医学）	三島 初

論文の内容の要旨

（目的）

再生医療や細胞治療に使用される細胞ソースはES細胞、iPS細胞や組織幹細胞などがある。その中でも脂肪由来幹細胞は採取に関わる倫理的なハードルが低く、比較的多くの細胞を容易に採取できるという利点がある。したがって、脂肪由来幹細胞を用いた多くの研究がなされていて、様々な疾患に対して有用性が示されている。このことから、脂肪由来幹細胞は幹細胞の中でも特に有用な細胞として再生医療への早期実現が期待されている。

脂肪由来幹細胞を用いた臨床研究には多くの細胞を必要とする。そこで、必要な細胞数を確保するために事前に牛由来の血清を含む培地で細胞の培養及び増殖が行われる。しかし、牛由来の血清にはロット差が大きいことやウイルスの混入などの問題がある。そこで、一般的には1-2継代までは血清培養液を使用し、その後無血清培地に切り替える培養法が用いられている。しかし、安全性の問題からすべての行程を無血清培地で培養する方法が求められる。そこで、すべての行程を無血清培地で培養する方法が試みられているが、安定的に細胞が増殖できる方法は未だ確立されていない。そこで、本研究は脂肪由来幹細胞をすべての行程を無血清培地で培養できる培地を開発し、その培養細胞の性質と組織修復能を評価検討することを目的とした。

（対象と方法）

ヒト脂肪組織からの脂肪由来幹細胞の分離は筑波大学附属病院臨床研究倫理委員会の承認を得て行

った。開発した培地の評価は細胞増殖、表面抗原解析、分化能、遺伝子発現、及びマーカートンパク質の発現量で検討した。組織修復能は大腿骨骨折モデルマウスを用いて検討した。

(結果)

無血清培地の開発では現状の問題点の抽出から行っている。問題点は①増殖能に良否があり不安定、②増殖効率が血清入り培地より低い、③細胞接着が良く無い、の3点であるとしている。適切な増殖因子の選定により①と②は解決でき、細胞外マトリックスの添加で③が解決できると考え検討した。実際、bFGF, PDGFBB, TGF-beta の添加により①、②が解決できた。さらにフィブロネクチンを添加することで③を解決することができた。さらに、基礎培地の成分を最適化することにより最終的には脂肪由来幹細胞をすべての行程を無血清培地で培養できる培地の開発に成功した。

ここで開発した培地と細胞分離方法を評価する目的で、通常の方法で分離した細胞とここで開発した方法と培地で分離・増殖した細胞の遺伝子発現を比較した。その結果、BMP2 や CCL2, CCL5, IL-6 といった増殖因子、サイトカインやケモカインの発現が上昇していることが明らかになった。さらに大腿骨骨折モデルマウスを用いて組織修復能を検討した。その結果、この方法は高い組織修復能はあることを示した。

以上の結果、ここで開発した培地と細胞分離方法は再生医療に有用な方法であることが示唆された。

(考察)

脂肪由来幹細胞をすべての行程を無血清培地で培養できる培地の開発においては、基礎培地、増殖因子、細胞接着因子を最適化することにより血清入り培地に匹敵する増殖と安定性を兼ね備えた安全な培地の開発に成功した。さらに、開発した培地と細胞分離方法を評価する目的で大腿骨骨折モデルマウスを用いて組織修復能を検討した。その結果、この方法は高い組織修復能はあることを示した。この培地で培養した細胞はいくつかのサイトカインの発現が高かったため、これが結果的に組織修復能を高めたのではないかと考察している。以上の結果、ここで開発した培地と細胞分離方法は再生医療に有用な方法であろうと考察している。

審査の結果の要旨

(批評)

佐藤和聡氏の学位論文は高い培養安定性と細胞増殖促進作用を持つ脂肪由来間葉系幹細胞用無血清培地と細胞分離方法および培養方法の開発とその培養方法で分離増殖させた細胞の性質と大腿骨骨折モデルマウスを用いて組織修復能の評価を行ったものである。結果として脂肪由来幹細胞を安定に増殖させることのできる培地の開発に成功し、組織修復能が十分ある細胞を分離、増殖できることを示している。研究内容には新規性も認められる。予備審査では論文中で問題点の抽出、仮説、問題解決までの論理が明確でないとの指摘があったが、本審査までに論文を修正し、最終的には論文内で明確な論理を展開することができている。

平成 27 年 2 月 10 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。