

氏名	Yazhou CHEN
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第9391号
学位授与年月日	令和2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	数理物質科学研究科
学位論文題目	Preparation of Stepwise Tissue Development-Mimicking ECM-Deposited PLGA-Collagen Hybrid Meshes and Their Influence on Stem Cell Functions

(組織分化模倣型細胞外マトリックスで修飾した PLGA-コラーゲン複合メッシュの作製及び幹細胞機能への影響)

主査	筑波大学教授(連係大学院)	博士(工学)	陳 国平
副査	筑波大学教授(連係大学院)	博士(工学)	田口 哲志
副査	筑波大学准教授(連係大学院)	博士(工学)	荏原 充宏
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	辻村 清也

## 論 文 の 要 旨

本論文は、組織発生模倣型マトリックスを沈着させた生体吸収性合成高分子 PLGA とコラーゲンの複合メッシュの作製及び複合メッシュによる幹細胞機能への影響について述べたものである。

第 1 章では、細胞外マトリックス (ECM) の組成と機能及び生体模倣マトリックス材料の研究に関する先行文献調査を踏まえて、本論文を貫く目的が提示されている。ECM はタンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン等からなる超分子集合体で、生体内では ECM は細胞と相互作用し、接着や移動、分化などを制御している。細胞と ECM との相互作用の解明は細胞機能の制御及び再生医療に大きな役割を果たす。近年、この相互作用を調べるために、ECM 成分を単離したり、組織や臓器を脱細胞化したりすることで得られる ECM 模倣型マトリックスが用いられている。単離した ECM 成分を用いる場合、生体内の ECM の組成と構造を完全に模倣することは困難である。これに対して、組織や臓器を脱細胞化して得られる脱細胞マトリックスは、生体内の ECM の成分と構造をより正確に模倣できるが、幹細胞の分化及び組織発生の過程で動的に変化する ECM を模倣することはできない。そこで、培養細胞に ECM を産生させ、ECM 模倣型マトリックスを作製する方法が開発された。ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞 (hMSCs) の骨分化、脂肪分化、及び骨・脂肪同時分化の進行を段階的に制御し、その後、細胞成分のみを除去することで培養皿表面に沈着した骨分化模倣型マトリックス、脂肪分化模倣型マトリックス、骨・脂肪同時分化模倣型

マトリックス材料が開発された。しかし、培養皿表面に沈着したこれらの二次元マトリックス材料は、生体内で細胞を取り囲む三次元 ECM とは異なる。幹細胞研究及び再生医療のためには、三次元マトリックス材料の開発が望まれる。ただし、三次元マトリックス材料は、力学強度が低いことが懸念される。そこで本研究では、生体吸収性合成高分子である PLGA と天然高分子のコラーゲンとの複合メッシュを支持体として用い、hMSCs を三次元培養し、細胞が分泌する ECM を沈着させた三次元マトリックス材料を創出した。ここで、hMSCs の骨分化、脂肪分化、及び骨・脂肪同時分化をそれぞれ段階的に制御することによって、骨分化及び脂肪分化模倣型細胞外マトリックスを沈着した三次元マトリックス材料を作製した。本マトリックス材料の組成及び幹細胞分化などの機能に与える影響を調べる事が述べられている。続く第 2~4 章では、その詳細を述べている。

第 2 章では、間葉系幹細胞を段階的に脂肪細胞に分化誘導し、その過程で細胞が産生する ECM を沈着させた PLGA-コラーゲン複合メッシュの作製、及びそれによる hMSCs の脂肪分化に与える影響について述べている。まず、PLGA ネットメッシュの空隙にコラーゲンのマイクロスポンジを形成させ、PLGA-コラーゲン複合メッシュを作製した。次に、その複合メッシュで hMSCs を培養し、培地の組成と培養時間を適切に選択することで、hMSCs を未分化、脂肪分化初期、及び脂肪分化後期の各段階に制御した。沈着した ECM を残しつつ細胞成分のみを除去し、ECM が沈着した PLGA-コラーゲン複合メッシュを得た。複合メッシュに沈着した ECM の組成は hMSCs の分化段階により異なっていた。未分化、脂肪分化初期、及び脂肪分化後期の細胞より作製した複合メッシュをそれぞれ幹細胞 ECM、脂肪分化初期 ECM と脂肪分化後期 ECM を沈着した複合メッシュと名付けた。さらに、得られた複合メッシュで hMSCs を培養し、沈着した ECM による hMSCs の脂肪分化への影響を調べた。脂肪分化は、オイルレッド-O(ORO)による脂肪滴の染色、及び脂肪分化マーカーの遺伝子発現レベルによって確認した。その結果、脂肪分化初期 ECM を沈着した PLGA-コラーゲン複合メッシュは hMSCs の脂肪分化を促進したが、幹細胞及び脂肪分化後期 ECM を沈着した PLGA-コラーゲン複合メッシュはこのような促進効果はなかった。したがって、これらの ECM の組成は分化段階によって異なり、hMSCs の脂肪分化に異なる効果を示した。

第 3 章では、間葉系幹細胞を段階的に骨芽細胞に分化誘導し、その過程で細胞が産生する三次元 ECM が hMSCs の骨分化に与える影響について述べている。すなわち、第 2 章で作製した PLGA-コラーゲン複合メッシュで hMSCs を三次元的に培養し、hMSCs の増殖培地及び骨分化誘導培養を用いることにより、hMSCs を未分化(幹細胞)、骨分化初期(骨芽細胞)及び骨分化後期(成熟骨芽細胞)に制御した。骨分化の段階は、アルカリホスファターゼ活性、カルシウム沈着、及び骨分化遺伝子の発現により確認した。それぞれの分化段階の細胞が分泌した ECM を PLGA-コラーゲン複合メッシュに沈着した後、脱細胞化することにより、幹細胞 ECM、骨分化初期段階 ECM 及び骨分化後期段階 ECM を模倣する PLGA-コラーゲン-ECM 複合メッシュを作製した。作製した PLGA-コラーゲン-ECM 複合メッシュを主要な ECM 分子の抗体で免疫染色し、その組成を調べた。その結果、各分化段階の細胞が沈着した ECM の組成パターンが異なることが分かった。PLGA-コラーゲン-ECM 複合メッシュにおける hMSCs の接着、増殖と骨分化を調べた結果、hMSCs はこれらの複合メッシュに良く接着し、増殖することが分かった。hMSCs の骨分化への影響に関して、ECM の種類によって異なることは示された。骨分化初期段階 ECM を沈着した複合メッシュが hMSCs の骨分化を最も促進し、骨分化後期段階 ECM を模倣する複合メッシュも hMSCs の骨分化に促進効果を示したが、一方で幹細胞 ECM を沈着した複合メッシュにはこのよ

うな促進効果はなかった。

第4章では、間葉系幹細胞の骨・脂肪同時分化を段階的に誘導し、その過程で細胞が産生する三次元ECMがhMSCsの分化に与える影響について述べている。すなわち、第二章で作製したPLGA-コラーゲン複合メッシュを用いてhMSCsを骨分化誘導培地と脂肪分化誘導培地の混合培地で三次元培養した。混合培地の組成と培養時間を選択し、hMSCsの分化段階を幹細胞、骨分化初期・脂肪分化初期、骨分化初期・脂肪分化後期、骨分化後期・脂肪分化初期、骨分化後期・脂肪分化後期にした。その後、脱細胞化により、各分化段階のECMを模倣したPLGA-コラーゲン-ECM複合メッシュを作製した。これらのPLGA-コラーゲン-ECM複合メッシュにおけるECMの成分が異なることは免疫染色より明らかになった。また、PLGA-コラーゲン-ECM複合メッシュはhMSCsの接着を促進し、細胞増殖を支持した。さらに、PLGA-コラーゲン-ECM複合メッシュによるhMSCsの骨分化及び脂肪分化への効果も明らかになった。骨分化初期・脂肪分化初期ECMを模倣する複合メッシュはhMSCsの脂肪分化に促進効果を示したが、骨分化初期・脂肪分化後期ECMを模倣する複合メッシュにはこのような促進効果はなかった。これに対して、骨分化後期・脂肪分化初期ECM、及び骨分化後期・脂肪分化後期ECMを模倣する複合メッシュはhMSCsの骨分化だけでなく、脂肪分化も促進することが明らかになった。

第5章では、本論文全体を総括している。PLGA-コラーゲン複合メッシュを用いてヒト骨髄由来の間葉系幹細胞を三次元培養し、培地の組成及び培養時間を選択することで、hMSCsの脂肪分化、骨分化、及び骨・脂肪同時分化をそれぞれ初期段階と後期段階に制御し、分泌したECMをPLGA-コラーゲン複合メッシュに沈着した組織分化模倣型ECM複合メッシュを開発した。得られたECM複合メッシュの組成及びhMSCsの分化への影響はECMの種類によって異なることが明らかになった。本論文で開発したECM複合メッシュは細胞-ECM間相互作用を調べるための良いモデルになるだけでなく、再生医療のための足場材料の研究開発にも寄与すると述べられている。

## 審 査 の 要 旨

〔批評〕

本論文では、異なる分化段階の細胞が産生するECMを模倣した三次元マトリックス複合材料の作製及び幹細胞の機能への影響に関する研究成果がまとめられている。生体内で細胞を取り囲むECMは細胞の機能を制御し、組織の発生や再生に重要な役割を果たしている。しかしながら、幹細胞の分化や組織発生の過程で動的に変化するECMを模倣した三次元マトリックス材料の研究はほとんど手つかずであった。そこで著者は、PLGA-コラーゲン複合メッシュを用いて間葉系幹細胞を三次元培養し、hMSCsの脂肪分化、骨分化、及び骨・脂肪同時分化を段階的に制御することにより、動的に変化するECMを沈着させた三次元マトリックス材料を作製する方法を提案している。本方法により得られた組織分化模倣型三次元マトリックス複合材料の組成を分析し、マトリックス複合材料による間葉系幹細胞の骨分化と脂肪分化に与える影響を明らかにした。本研究成果は、細胞-細胞外マトリックス間相互作用に関する研究に重要な学術的知見を与えるだけでなく、幹細胞工学及び再生医療の発展においてきわめて重要な貢献をもたらすものと考えられる。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として十分に高い学術的価値をもつと認められる。

〔最終試験結果〕

令和2年2月18日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。