

学位審査結果報告書

学位申請者氏名 森谷 友貴

学位論文題目 Spheroid culture enhances osteogenic potential of periodontal ligament mesenchymal stem cells

審査委員（主査） 竹 内 弘



（副査） 松 尾 拓



（副査） 鷺 尾 絢 子



学位審査結果の要旨

ヒト歯根膜細胞由来間葉系幹細胞（hPDLMSC）は歯周組織の恒常性の維持や再生に関与することが知られており、組織再生療法への応用が期待されている。申請者の森谷友貴氏は、hPDLMSC の骨再生促進におけるスフェロイド培養の影響を検討するため、本研究で単層培養した hPDLMSC と hPDLMSC スフェロイドの *in vitro* および *in vivo* における骨分化能を比較した。

基板表面をポリエチレングリコールで修飾し、細胞非接着性としたマイクロウェルチップに hPDLMSC を播種し、スフェロイドを形成させた。hPDLMSC スフェロイドにおける間葉系幹細胞（MSC）マーカー発現をフローサイトメトリー及び蛍光免疫染色により解析した。定量的リアルタイム PCR 解析により、単層培養 hPDLMSC と hPDLMSC スフェロイドにおける幹細胞性マーカーと骨関連遺伝子の発現を調べた。hPDLMSC スフェロイドの骨分化能を検討するために、石灰化結節の形成、アルカリホスファターゼ（ALP）活性測定、マウス頭蓋骨欠損モデルへの移植実験を行った。hPDLMSC スフェロイドの骨分化促進のメカニズムを調べるために、分泌型フリズルド関連タンパク質 3（SFRP3）の siRNA を用いたノックダウン実験を行い、ALP 遺伝子発現と ALP 活性を測定した。単層またはスフェロイド培養した hPDLMSC の骨分化誘導培地（OIM）中における SFRP3 発現をリアルタイム PCR とウェスタンブロッティングにより解析した。

hPDLMSC スフェロイドは単層培養した hPDLMSC と同様の MSC マーカーを発現していた。幹細胞性を調節する転写因子の発現は、単層培養した hPDLMSC と比べて hPDLMSC スフェロイドで有意に上昇した。OIM 中における hPDLMSC の石灰化結節形成量、ALP 活性、骨関連遺伝子発現量は、単層培養した hPDLMSC と比べて hPDLMSC スフェロイドで有意に増加した。また、頭蓋骨欠損モデルマウスへの hPDLMSC スフェロイド移植は、単層培養 hPDLMSC 移植と比べて有意に新生骨の形成を促進した。スフェロイド培養した hPDLMSC の OIM 中における ALP 活性上昇への影響のメカニズムを調べるために、Wnt シグナルのアンタゴニストである SFRP3 の siRNA を用いたノックダウン実験を行った。SFRP3 のノックダウンにより、スフェロイド培養した hPDLMSC を OIM 中で培養すると誘導される ALP 遺伝子発現と ALP 活性は有意に減少した。以上の結果は、hPDLMSC はスフェロイド培養すると単層培養と比較して、幹細胞性を上昇させ、OIM 中で SFRP3 を介して骨分化並びに骨形成を亢進することことを示しており、スフェロイド培養は骨疾患に対する細胞治療や再生医療における新規の有用なツールと成り得ることが示唆された。

本研究内容について申請者の森谷氏に対し、公開審査会において主査と 2 名の副査による試問を行い、実験方法や結果の解釈および当該分野における意義と今後の展望と課題について概ね適切な回答を得た。本研究の成果は、hPDLMSC を応用した歯周病その他の骨関連疾患の治療法開発に寄与することが期待できることから、審査委員会では本論文を学位論文として価値あるものと判断した。