

ふりがな氏名	そん うちく 孫 雨竹
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第1004号
学位授与の日付	令和6年3月1日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項に該当
学位論文題目	Evaluation of Osteogenic Potential for Rat Adipose-Derived Stem Cells under Xeno-Free Environment (ゼノフリー環境下におけるラット脂肪由来幹細胞の骨形成能の評価)
学位論文掲載誌	International Journal of Molecular Sciences 第24巻 第24号 令和5年12月
論文調査委員	主査 橋本 典也 教授 副査 合田 征司 教授 副査 本田 義知 教授

論文内容要旨

近年、異種由来成分やウシ胎児血清（FBS）に含まれるウイルスや病原体によるコンタミネーションリスクを回避するため、異種成分を含まない（ゼノフリー）細胞培養法が注目されている。これまでに、ゼノフリーのコラーゲン様リコンビナントペプチド足場（Cellnest）と幹細胞（歯髄幹細胞および骨髄由来間葉系幹細胞）との集合体（CellSaic）が、ラット骨欠損に対する修復に有効であることを示した。本研究では、ゼノフリー培地を用いて培養したラット脂肪幹細胞集合体（rADSC-CellSaic）の骨形成能を *in vitro* および *in vivo* で評価した。

FBS を含む培地あるいはゼノフリー培地で培養した rADSC（FBS-rADSC あるいは XF-rADSC）を位相差顕微鏡で観察し、フローサイトメトリーにて幹細胞表面マーカーを分析した。加えて、未分化能の維持を確認するため、それぞれの rADSC の Sox2 遺伝子発現レベルを調べた。細胞非接着表面をもつ U 底 96 穴プレートを用いて調製したそれぞれの細胞集合体（FBS-rADSC-CellSaic あるいは XF-rADSC-CellSaic）の内部構造を走査型電子顕微鏡で観察するとともに、細胞増殖挙動を評価した。それぞれの CellSaic に対して、21 日間の分化培養（骨、脂肪、軟骨分化）を行い、種々の染色法（Alizarin red S, Oil red O, Alcian blue）にて、分化挙動を評価した。CellSaic の骨分化挙動については、経時的（分化誘導 7, 14, 21 日後）にカルシウム沈着、アルカリホスファターゼ活性、および骨分化関連遺伝子（RUNX2, COL1a1, iBSP, および OCN）の発現レベルを評価した。骨分化誘導した CellSaic をラット先天性顎裂モデルに移植し、マイクロ CT による骨形態解析と組織学的評価により、骨形成能を調べた。

FBS-rADSC と XF-rADSC は、紡錘状の形態を示し、同等の幹細胞表面マーカーを有していた。また、FBS-rADSC と XF-rADSC は、ともに未分化性を維持していた。いずれの rADSC も CellSaic を形成していることがわかった。CellSaic 中の FBS-rADSC と XF-rADSC は、骨、脂肪、軟骨細胞へ分化した。骨分化培養した XF-rADSC-CellSaic は、時間とともにカルシウムを沈着し、その程度は FBS-rADSC-CellSaic と比較して高かった。骨分化培養下における XF-rADSC の骨分化関連遺伝子の発現は、FBS-rADSC と比較して早期に上昇した。ラット先天性顎裂モデルに対する XF-rADSC-CellSaic 移植群は、FBS-rADSC-CellSaic 移植群と比較して優れた骨形成能を示した。

論文審査結果要旨

近年、異種由来成分やウシ胎児血清 (FBS) に含まれるウイルスや病原体によるコンタミネーションリスクを回避するため、異種成分を含まない (ゼノフリー) 細胞培養法が注目されている。これまでに、ゼノフリーのコラーゲン様リコンビナントペプチド足場 (Cellnest) と幹細胞 (歯髄幹細胞および骨髄由来間葉系幹細胞) との集合体 (CellSaic) が、ラット骨欠損に対する修復に有効であることを示した。本研究では、ゼノフリー培地を用いて培養したラット脂肪幹細胞集合体 (rADSC-CellSaic) の骨形成能を *in vitro* および *in vivo* で評価した。

ゼノフリーで培養した rADSC は、通常培養の rADSC と比較して、早期に骨分化し、優れた骨形成能を示した。これは、ゼノフリー培地に添加されている因子が骨形成能に有効であったためと考えられる。本研究で示した新しいゼノフリー培養法は、臨床グレードの脂肪由来幹細胞培養における参照データとなると考えられる。以上、本論文は博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。