

ふりがな氏名	とうぶんき 鄧文琪
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 950 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 3 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	Senescence-associated secretory phenotypes in rat-derived dedifferentiated fat cells with replicative senescence (複製老化したラット由来脱分化脂肪細胞における老化関連分泌形質)
学位論文掲載誌	Dental Materials Journal 第 42 巻 第 号 令和 5 年 月
論文調査委員	主査 松本 尚之 教授 副査 橋本 典也 教授 副査 本田 義知 教授

論文内容要旨

口蓋裂などの先天異常や外傷による顎顔面骨欠損に対して、幹細胞・前駆細胞を用いた骨再生治療が注目されている。脂肪由来の脱分化脂肪細胞（dedifferentiated fat cells ;DFAT）は、ドナー年齢や基礎疾患に関係なく脂肪組織から低侵襲的に採取でき、均質な多分化能（骨、軟骨など）を有する細胞が調製できることから、実用性の高い再生医療の細胞ソースとして期待されている。一般的に、細胞を用いた再生医療では、十分量の幹細胞・前駆細胞が必要となる。そのため、継代培養により細胞を必要な数まで増殖させる必要がある。近年、この継代培養操作により、骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞にも細胞老化（複製老化）が誘導されることが報告された。細胞老化は、自身の増殖を不可逆に停止するだけでなく、senescence-associated secretory phenotype（SASP）を周囲組織へ分泌して組織炎症や疾患の発症要因となることが示されてきた。本研究では、複製老化した DFAT から分泌される SASP の種類を解析することを目的とした。

8 週齢の雄性 F344 系ラットの鼠径部から脂肪を採取後、天井培養法で DFAT 細胞を得た。コンフルエントに達した後、継代培養を繰り返して行い、継代数の低い細胞（p3-DFAT）と高い細胞（p60-DFAT）を実験に用いた。まず、フローサイトメトリーで各細胞の表面抗原を調べた。次に、細胞形態の変化、細胞増殖能、老化関連 β -ガラクトシダーゼ（SA- β -gal）活性、および老化関連タンパク質および遺伝子の発現を調べ、各細胞の老化挙動を評価した。最後に、各細胞の SASP 関連遺伝子の発現レベルを PCR array で評価した。

p3-DFAT と p60-DFAT の表面抗原は、CD34、CD45 陰性、CD90、CD105 陽性となり、継代数による違いは認められなかった。p60-DFAT は、p3-DFAT と比較して巨大化・扁平化が観察され、

増殖能が低下していた。また、p60-DFAT は、p3-DFAT と比較して老化関連タンパク質 (p21、p16、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベータ受容体、および γ H2AX) ならびに老化関連遺伝子 (Cdkn1a および Cdkn2a) を有意に高発現していた。さらに、p60-DFAT は、p3-DFAT と比較して、16 の SASP 関連遺伝子 (*Ccl11*, *Ccl13*, *Ccl21*, *Ccl5*, *Csf2*, *Cxcl1*, *Cxcl12*, *Ifna2*, *IL11*, *IL12a*, *IL13*, *IL1a*, *IL1rn*, *IL6*, *Mif*, *Tnf*) を有意に高発現していることがわかった。以上の結果から、DFAT も複製老化を起こし、様々な SASP を分泌する可能性が認められた。したがって、継代数の高い DFAT を移植治療に用いる場合、SASP 分泌の影響を考慮する必要があることが示唆された。

論文審査結果要旨

継代培養により、ラット由来脂肪脱分化細胞 (DFAT) の複製老化挙動を調べ、老化した DFAT から分泌される senescence-associated secretory phenotype (SASP) の種類を解析したものである。

8 週齢の雄性 F344 系ラットの鼠径部から脂肪を採取後、天井培養法で DFAT 細胞を得た。継代培養を繰り返して行い、継代数の少ない細胞 (p3-DFAT) と多い細胞 (p60-DFAT) を実験に用いた。p3-DFAT と p60-DFAT の表面抗原は継代数による違いは認められなかった。p60-DFAT は、p3-DFAT と比較して巨大化・扁平化が観察され、増殖能が低下していた。また、p3-DFAT より、p60-DFAT の SA- β -gal 活性、老化関連遺伝子ならびに老化関連タンパク質を有意に高発現していた。さらに、p60-DFAT は、p3-DFAT と比較して、16 の SASP 関連遺伝子 (*Ccl11*, *Ccl13*, *Ccl21*, *Ccl5*, *Csf2*, *Cxcl1*, *Cxcl12*, *Ifna2*, *IL11*, *IL12a*, *IL13*, *IL1a*, *IL1rn*, *IL6*, *Mif*, *Tnf*) を有意に高発現していることがわかった。

以上、DFAT も複製老化を起こし、様々な SASP を分泌する可能性があるため、継代数の高い DFAT を移植治療に用いる場合、SASP 分泌の影響を考慮する必要があることが示唆されたという点において、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。