

論 文 内 容 要 旨

題 目

Analysis of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell Kinetics after Short-term Stimulation with Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )

(TNF- $\alpha$  短期刺激による骨髄由来間葉系幹細胞の細胞動態解析)

著 者

成谷 美緒

内容要旨

骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) は自己再生能力および多分化能を有し、その研究や臨床応用が盛んに進められている。しかしながら、BMSC は骨髄中の全細胞の 0.001~0.01% にしかすぎず、ドナー年齢の高齢化や培養中に継代を繰り返すことによる性質低下が報告されている。幹細胞治療が著しい発展を遂げているにも関わらず、再生医療を必要とする高齢者からは治療に必要な量の BMSC 採取が難しいのが現状である。現在の医学では老化などにより変性した細胞から未分化性を再獲得させる培養技術は未だ確立されておらず、その開発は治療を必要とする多くの患者を救うことができると考えられる。腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) は炎症反応に基づく骨吸収、関節破壊、腫脹、浮腫などを惹起する一方で、創傷治癒過程において成長因子やサイトカインの発現誘導などによる組織再生への関与が示唆されている。過去に我々の研究室では、TNF- $\alpha$  の短期刺激によりヒト歯髄細胞が未分化性を獲得することを報告している。この技術を BMSC に応用することができれば、高齢患者に必要な再生医療を提供するための安全かつ簡便な新規培養法開発の一助となると考えられる。そこで本研究では、ラット BMSC に TNF- $\alpha$  短期刺激を行い細胞動態に与える影響について検証した。

5~6 週齢の Sprague-Dawley ラット大腿骨・脛骨から BMSC を採取し、10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM 培地にて培養を行った。60%コンフルエント時にリコンビナントラット TNF- $\alpha$  (rTNF- $\alpha$ ) を 1~100 ng/ml 添加し 2 日間培養した後、継代し rTNF- $\alpha$  を培地中から完全に除去したものを TNF- $\alpha$  刺激群とした。同様の培養工程にて rTNF- $\alpha$  刺激を行わなかったものをコントロール群とした。これらの細胞動態の評価として細胞形態、増殖能、未分化性マーカー発現の解析を行い、rTNF- $\alpha$  短期刺激による BMSC の未分化性への影響を検討した。また、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞、脂肪細胞への分化誘導を行い、各種マーカー遺伝子発現の解析を行った。骨芽細胞分化については長期観察を行い、rTNF- $\alpha$  短期刺激による BMSC の分化能への影響を検討した。なお、本実験は徳島大学動物実験委員会 (承認番号: T27-79 号) の承認を得た上で行った。

rTNF- $\alpha$  10 ng/ml 刺激群において、他群と比較して未分化性マーカー発現が有意に増加した。また、rTNF- $\alpha$  10 ng/ml 刺激群において、コントロール群と比較して細胞形態や増殖

能について差は認めなかった。rTNF- $\alpha$  50, 100 ng/ml 刺激群では、他群と比較して刺激 2 日後にアポトーシスした細胞が有意に増加し、その後の細胞増殖能において有意に低い値を示した。これらより、BMSC への rTNF- $\alpha$  刺激には至適濃度が存在し、rTNF- $\alpha$  10 ng/ml による短期刺激は BMSC の形態および増殖に影響を及ぼさず、未分化性の獲得に寄与することが示唆された。rTNF- $\alpha$  10 ng/ml 刺激群とコントロール群に各種分化誘導を行ったところ、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞において刺激群では遺伝子マーカー発現が有意に抑制された。脂肪細胞については両群に差は認めなかった。骨芽細胞分化誘導についての長期観察では、培養 21 日目までは刺激群ではコントロール群と比較して石灰化結節の形成が抑制されていたが、28 日目の時点では同程度まで回復していることが観察された。これらより、rTNF- $\alpha$  10 ng/ml による短期刺激は BMSC の骨分化現象に遅延を引き起していることが示唆された。

骨髓中には幹細胞だけでなく前駆細胞や分化の進んだ細胞などヘテロな細胞種が混在している。TNF- $\alpha$  が BMSC の生細胞数を保持したまま未分化性を有する細胞を増加させ、一時的に分化遅延を引き起こしたことから、様々な分化過程にある骨髓（前駆）細胞の一部が再び未分化性を獲得したのではないかと推測された。将来的に高齢患者から採取した細胞を未分化な状態に変化させることを可能にする新規培養法の開発に貢献できる可能性を有すると考えられる。