

Title	Proliferative activity of skeletal myoblast sheet by paracrine effects of mesenchymal stem cells
Author(s)	梅澤, 貴志
Journal	歯科学報, 118(1): 76-77
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/4470">http://hdl.handle.net/10130/4470</a>
Right	
Description	

氏名(本籍)	梅 <sup>うめ</sup> 澤 <sup>ざわ</sup> 貴 <sup>たか</sup> 志 <sup>し</sup> (東京都)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 2127 号(甲第 1332 号)
学位授与の日付	平成28年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Proliferative activity of skeletal myoblast sheet by paracrine effects of mesenchymal stem cells
掲載雑誌名	Journal of Oral Biosciences 第58巻 4号 158-166頁 2016年 doi : org/10.1016/j.job.2016.05.005
論文審査委員	(主査) 山本 仁教授 (副査) 田崎 雅和教授 阿部 伸一教授 片倉 朗教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

間葉系幹細胞は、中胚葉性組織(間葉)に由来する体性幹細胞であり、間葉系に属する細胞への分化能をもつことが知られている。近年、この細胞が Hepatocyte growth factor(HGF)を分泌することが明らかになった。HGFには筋芽細胞の細胞増殖活性促進作用があることが知られている。また、間葉系幹細胞が筋芽細胞のHGF産生に影響を与えることが報告されている。しかし、間葉系幹細胞が骨格筋筋芽細胞シートに対して与える影響についての報告は少なく、不明な点が多い。そこで本研究では、間葉系幹細胞を加えた骨格筋筋芽細胞シートの経日的形態変化と間葉系幹細胞が筋芽細胞のタンパク質産生、分化および増殖活性に与える影響を *in vitro* で明らかにすることを目的とした。

#### 2. 研究方法

ウサギ口腔粘膜下結合組織・筋組織より採取、分離した細胞を用いて、間葉系幹細胞と共培養した骨格筋筋芽細胞シート(MC+)と間葉系幹細胞と共培養していない骨格筋筋芽細胞シート(MC-)を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)により、シートの形態変化の観察を行った。加えて、免疫組織化学的染色によりタンパク質の局在を、reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)により mRNA の発現を、さらに DNA 細胞周期解析により細胞増殖活性を検索し、MC+とMC-について比較・検討を行った。

#### 3. 研究成績および結論

シートの形態観察結果から、MC+, MC-ともに、経日的に厚みを増すことを確認した。7日目にはMC+の方が厚径が大きく、12日目にはその差は減少した。また、desminの局在はシートの重層化部分と一致していた。この結果より、シートの重層化は筋芽細胞の増殖によるものと考えられた。MyoD, myogenin, PAX7のmRNA発現については、MC+とMC-の間に差異は認められなかった。この結果より、シート中には分化段階の異なる細胞が混在していることが示唆された。一方、DNA細胞周期解析による細胞増殖活性の測定の結果、7日目において、MC+が有意に高い値を示したが、12日目には有意な差を認めなかった。また、MC+の2日目、及びMC+とMC-ともに7日目において、HGFのmRNA発現を認めた。この結果より、骨格筋筋芽細胞シートの細胞増殖活性の促進は、間葉系幹細胞が分泌するHGFによるものと推測された。

本研究によって、間葉系幹細胞は共培養開始早期に骨格筋筋芽細胞シートの細胞増殖活性を促進し、シートの厚みを増大させるが、培養開始から12日目にはその影響が認められなくなることが明らかになった。一方、12日目には共培養の影響が認められなくなったことから、骨格筋筋芽細胞シートの成熟には神経刺激など、別の要素も関与している可能性が示唆された。

### 論文審査の要旨

間葉系幹細胞は、中胚葉性組織(間葉)に由来する体性幹細胞であり、間葉系に属する細胞への分化能をもつことが知られている。本論文では、間葉系幹細胞が骨格筋筋芽細胞シートに及ぼす影響を明らかにすることを目的として、間葉系幹細胞と骨格筋筋芽細胞シートを共培養し、細胞シートの経日的形態変化、筋芽細胞のタンパク質産生、分化および増殖活性を評価した。その結果、共培養開始早期に、間葉系幹細胞が骨格筋筋芽細胞シートの細胞増殖活性を促進し、シートの厚みを増大させることが明らかとなった。

本審査委員会では1) Type I A Collagen gel を使用した理由、2) MyoD, Myogenin を観察した理由、3) 12日目において HGF の mRNA が確認できていない理由、4) 間葉系幹細胞に対して分化誘導を行った理由、などが質疑としてあげられた。これらに対して、1) 筋芽細胞増殖の足場となる scaffold として、Type I A Collagen gel を使用した、2) 筋芽細胞の分化段階を確認するために、発現時期の異なる MyoD, Myogenin を観察した、3) 筋芽細胞の細胞密度が増したことによる contact inhibition が原因と考えられる、4) 使用した間葉系幹細胞の多分化能を確認するために行った、との回答があった。3), 4) は考察に追記を行い、その他、本文上の表現、略語の使用に加え、論文上の体裁に関して改善の指摘があり修正がなされた。

以上より、本研究で得られた結果は今後の歯学の進歩、発展に寄与するところが大きく、学位授与に値するものと判定した。