

学位論文題名

# Bone Marrow Stromal Cells Act as Feeder Cells for Tendon Fibroblasts through Soluble Factors

(腱線維芽細胞に対する骨髄間葉系細胞の feeder 作用)

## 学位論文内容の要旨

骨髄間葉系細胞 (以下 BMSC) はその多分化能を利用して、種々の組織再生の細胞源として注目されているとともに、ある種の細胞に対し feeder 作用を持っていることが近年明らかになってきた。また腱・靭帯損傷は比較的頻度の多い外傷で多くは自然治癒する。腱・靭帯損傷の治癒過程は出血期、炎症期、増殖期、成熟期の4期に分類されており、このうち炎症期において線維芽細胞、血小板、白血球、BMSCを含むさまざまな細胞の侵入が起こることが分かっており、なかでも BMSC はその治癒に幹細胞として重要な働きをしていると言われているが、その詳細なメカニズムは依然不明のままである。BMSC の損傷腱・靭帯治癒における役割としては二つの可能性が考えられ、一つは BMSC 自体が損傷部位で線維芽細胞に分化する事であり、二つ目は線維芽細胞に働きかけその生理機能を高める事である。BMSC はこれまで細胞接着による心筋細胞や肝細胞の治癒促進、また分泌する液性因子により神経幹細胞の分化促進がこれまで報告されている。しかしながら、腱線維芽細胞と BMSC の細胞間相互作用については、未だ明らかではない。

本研究では、BMSC の液性因子の線維芽細胞の生理機能に対する影響に着目し、BMSC が液性因子を介して腱線維芽細胞に対して feeder 作用を有することを仮説とした。この仮説を証明すべく、ラット由来の線維芽細胞を BMSC と細胞間接触のない多孔膜を介した共培養を行った。本研究の目的は細胞増殖、細胞外マトリックス産生能、細胞遊走能、細胞接着能に関して BMSC の液性因子の影響を明らかにし、その上でその特異的な液性因子を同定することである。これらを明らかにすることにより、ティッシュエンジニアリングの手法を用いた腱・靭帯再生および同損傷の細胞治療に有益な情報を提供し得ると考える。

BMSC と共培養することにより、腱由来線維芽細胞は細胞増殖能、細胞遊走能、細胞接着能が高まった。また細胞外マトリックス産生能には変化がなかった。次に共培養の培養上澄による腱由来線維芽細胞の培養を行ったところ、同様に細胞増殖能が高まることが分かった。以上より BMSC は何らかの液性因子を介して、これらの作用をもたらしていることが明らかとなった。さらにこれらの腱由来線維芽細胞の挙動に変化を及ぼした液性因子を同定すべく二次元電気泳動を用いた共培養の培養上清の蛋白解析を行った。二次元電気泳動による蛋白分離と質量解析によって数種類の蛋白が同定された。このうち腱線維芽細胞の挙動に変化を与える可能性のあるものはプラスミノーゲンのみであった。またプラスミノーゲンは BMSC と共培養することにより、そのタンパク量は減少していた。次にプラスミノーゲンの腱線維芽細胞の挙動に対する影響を確認するため、プラスミノーゲンを培養液に加えた細胞増殖試験を行った。その結果プラスミノーゲンは用量依存性に腱線維芽細胞に対して増殖抑制効果があることが明らかとなった。以上より BMSC は

何らかの機序により培養液中のプラスミノゲン量を減少させることにより腱線維芽細胞に対して feeder 作用をもたらしている可能性が示唆された。

これまで BMSC はさまざまな細胞に対して増殖や分化に影響を与えることが報告されているが、腱由来線維芽細胞に関しては報告が無かった。その様式に関しては細胞接着によるものと液性因子を介する二つの様式がこれまで言われているが、腱由来線維芽細胞に関しては液性因子を介することが分かった。また本研究で同定されたプラスミノゲン自体は活性のない蛋白として知られているがその分解産物であるアンギオスタチンと kringle-5 はある種の細胞に関してアポトーシスを誘導することが明らかとなっている。また腱・靭帯由来の線維芽細胞はプラスミノゲン活性化酵素を発現していることが報告されており、これらの分子が影響している可能性が考えられた。以上の結果より腱・靭帯の治癒過程の幹細胞としての役割は既存の線維芽細胞に対してこれらの液性因子を介しての制御に関わる可能性が示唆された。またティッシュエンジニアリングの手法を用いて組織再生を行う場合、事前に効率的に細胞数を増やす際に現在様々な増殖因子の添加が一般的であるが、臨床応用を考えた場合、増殖因子の使用は非常に高額であることや発癌性などの安全性の確認が必要であるなどまだ問題も多い。自家細胞で共培養の手技を用いてこの変わりにすることが出来るのはこれらの欠点をおぎなえる可能性があり、選択肢の一つとして考えうると思われた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 宏  
副 査 教 授 安 田 和 則  
副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

## Bone Marrow Stromal Cells Act as Feeder Cells for Tendon Fibroblasts through Soluble Factors

(腱線維芽細胞に対する骨髄間葉系細胞の feeder 作用)

学位論文は骨髄間葉系細胞（以下 BMSC）による腱線維芽細胞に対する feeder 作用に関するものである。BMSC はその多分化能を利用して、種々の組織再生の細胞源として注目されているとともに、ある種の細胞に対し feeder 作用を持っていることが近年明らかになってきた。また腱・靭帯損傷は比較的頻度の多い外傷で多くは自然治癒する。腱・靭帯損傷の治癒過程は出血期、炎症期、増殖期、成熟期の4期に分類されており、このうち炎症期において線維芽細胞、血小板、白血球、BMSC を含むさまざまな細胞の侵入が起こることが分かっており、なかでも BMSC はその治癒に幹細胞として重要な働きをしていると言われているが、その詳細なメカニズムは依然不明のままである。BMSC の損傷腱・靭帯治癒における役割としては二つの可能性が考えられ、一つは BMSC 自体が損傷部位で線維芽細胞に分化する事であり、二つ目は線維芽細胞に働きかけその生理機能を高める事である。BMSC はこれまで細胞接着による心筋細胞や肝細胞の治癒促進、また分泌する液性因子により神経幹細胞の分化促進がこれまで報告されている。しかしながら、腱線維芽細胞と BMSC の細胞間相互作用については、未だ明らかではない。

BMSC と共培養することにより、腱由来線維芽細胞は細胞増殖能、細胞遊走能、細胞接着能が高まった。また細胞外マトリックス産生能には変化がなかった。次に共培養の培養上澄による腱由来線維芽細胞の培養を行ったところ、同様に細胞増殖能が高まることが分かった。以上より BMSC は何らかの液性因子を介して、これらの作用をもたらしていることが明らかとなった。さらにこれらの腱由来線維芽細胞の挙動に変化を及ぼした液性因子を同定すべく二次元電気泳動を用いた共培養の培養上清の蛋白解析を行った。二次元電気泳動による

蛋白分離と質量解析によって数種類の蛋白が同定された。このうち腱線維芽細胞の挙動に変化を与える可能性のあるものはプラスミノーゲンのみであった。またプラスミノーゲンは BMSC と共培養することにより、そのタンパク量は減少していた。次にプラスミノーゲンの腱線維芽細胞の挙動に対する影響を確認するため、プラスミノーゲンを培養液に加えた細胞増殖試験を行った。その結果プラスミノーゲンは用量依存性に腱線維芽細胞に対して増殖抑制効果があることが明らかとなった。以上より BMSC は何らかの機序により培養液中のプラスミノーゲン量を減少させることにより腱線維芽細胞に対して feeder 作用をもたらしている可能性が示唆された。

学位論文公開発表では、副査の安田和則教授から腱線維芽細胞に対する BMSC の作用因子でプラスミノーゲン以外のものの存在の可能性、またプラスミノーゲンを抑制した場合の腱線維芽細胞の挙動についての質問があり、申請者は他の蛋白の存在の可能性および今後の研究の方向性を述べた。次いで主査の清水宏教授より接着因子の変化についての質問があり、申請者はその必要性に関して述べた。最後に副査の三浪明男教授より腱線維芽細胞以外での BMSC の作用、および接着性があがる事に対するメカニズムについて質問があり、申請者は過去の報告を引用して他の細胞での挙動の変化を述べ、メカニズムに関しては増殖性が上がることとの関連性を述べた。

この論文は、ティッシュエンジニアリングの手法を用いる上で細胞の挙動を知ることは大変重要であり、腱線維芽細胞を用いた再生医療への応用につながる重要な研究である点で高く評価され、今後さらなる研究が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。