

別紙 1 - 1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 刘 柯宏

論 文 題 目

Conditioned medium of human mesenchymal stem cells affects stem cell senescence in osteoporosis

(骨粗鬆症におけるヒト間葉系幹細胞由来上清の骨吸収への抵抗効果と老化予防効果の検討)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

今釜 史郎

名古屋大学教授

委員

曾根 三千彦

名古屋大学教授

委員

西口 康二

名古屋大学教授

指導教授

日比 英晴

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

今回、*in vitro* 実験でヒト間葉系細胞株の継代数を変えている P5 と P17 の hMSCs を培養し、それぞれの CM を採取したのちに、CM を入れ替え、さらに 96 時間培養した。その後、P17 の CM は cell-signaling 効果を介して細胞機能に否定的な影響を与えたおよび細胞老化を促進した一方、P5 の CM は cell-signaling を介して細胞機能を回復したおよび細胞老化を軽減した。*in vivo* 実験でマウス両側卵巣摘出手術によって閉経後骨粗鬆症モデルを作成し、P5 CM 投与が骨微小環境中の骨髄幹細胞の細胞老化を予防し、骨量減少を防止することを確かめた。この研究は、CM の cell-signaling 効果と細胞老化との関連を明らかにした。この結果、P5 CM は閉経後の骨粗鬆症の予防薬候補として有用である可能性が示唆された。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. 閉経後の骨粗鬆症は、原発性骨粗鬆症と分類され、エストロゲン欠乏によって引き起こされる過活性化した骨吸収に特徴付けられている。骨吸収と骨形成の間のバランスの崩れによって骨粗鬆症が引き起こす。特に、エストロゲン欠乏が骨髄幹細胞 (BMSC) に与える影響はまだ完全に調べていない。そのため、私たちの研究は BMSC の細胞老化に焦点を当た。
2. 私たちは、hMSCs-CM 抽出の細胞数 (1 ウェルあたり 5×10^5 細胞) および条件を決定し、スペクトロフォトメーターを使用して CM のタンパク質濃度が基本的に同じであることを確認した。CM の臨床応用は難しいため、細胞の老化を抑制する CM の microRNA を応用する方が実用的であると考えた。私たちのチームは hMSCs-CM 由来の microRNA X が、*in vitro* アッセイにおいて老化フェノタイプを抑制することを確認した。将来的には、microRNA X の効果を閉経後骨粗鬆症モデルで検証することを予定している。
3. 本研究の中の骨粗鬆症マウスに関して、エストロゲンの減少が皮質骨に深刻な影響を与えないことが分かった (皮質骨厚はわずかに減少したが、BMD には有意な変化はなかった)。また、CM 治療は皮質骨に特定の影響を与えなかった。CT 分析の時点は、OVX 術後 4 ヶ月で、これは臨床的な閉経後骨粗鬆症患者の骨粗鬆症の早期段階に相当すると考える。
4. 複数の研究が、CM などの細胞フリー治療法が、幹細胞移植と比べて安全的であることを示している。CM の使用は、幹細胞移植に関連する合併症、例えば発癌性、免疫反応、細胞供給の確保の困難性などを回避している。本研究は、平均体重 20g の 9 週齢のマウスを使用した。静脈内投与の安全な量は $0.2\text{mL}/10\text{g} \sim 0.25\text{mL}/10\text{g}$ で、私たちは最大投与量である週に $500\mu\text{L}$ を応用した。

以上の理由により、本研究は博士 (医学) の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	刘 柯宏
試験担当者	主査 今釜 史郎 副査 ₁ 曾根 三千彦 副査 ₂ 西口 康二 指導教授 日比英晴			
(試験の結果の要旨)				
主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。				
1. 閉経後骨粗鬆症の原因となるメカニズムについて				
2. hMSCs-CM濃度について				
3. 動物実験の期間について				
4. hMSCs-CMの安全性について				
以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、顎顔面外科学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。				