







## 学位論文審査の結果及び最終試験の結果の要旨

学位申請者氏名	董 宏偉		
学位論文名	Cryopreserved spontaneous spheroids from compact bone-derived mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering (骨再生治療を目的とした皮質骨由来間葉系間質細胞によるスフェロイドの凍結保存)		
論文審査委員	主査：	松本歯科大学 教授	平賀 徹 
	副査：	松本歯科大学 教授	大須賀 直人 
	副査：	松本歯科大学 講師	中道 裕子 
	副査：		
	副査：		
	副査：		
最終試験	実施年月日	2021 年 4 月 16 日	
	試験方法	<input type="checkbox"/> 口答 ・ <input checked="" type="checkbox"/> 筆答	

## 学位論文の要旨

目的：マウス皮質骨由来間葉系間質細胞 (compact bone-derived mesenchymal stromal cells : CB-MSCs) から形成された自発的スフェロイドは、優れた幹細胞性や高い骨分化能を有する。この細胞を再生医療に応用するためには凍結保存方法の確立が望まれるが、これまで自発的スフェロイドの凍結保存方法については十分な検討が行われていなかった。本研究では、この CB-MSCs から形成された自発的スフェロイドを用いて、凍結保存と解凍が幹細胞性や骨分化能、および in vivo における骨形成能に与える影響について検討した。

材料と方法：3 週令雄 C57BL/6J マウスを麻酔薬の過量投与によって安楽死させた後、大腿骨および脛骨を取り出し、細切してコラゲナーゼにて処理を行った。得られた細胞の平面培養を行い、CB-MSCs を得た。2 継代目の細胞をスフェロイド形成用の低接着性シャーレに播種することで、自発的スフェロイドを得た。スフェロイドを回収し、5, 10, 15, 20% のジメチルスルホキシド (DMSO) とともに緩徐凍結法にて -80°C まで冷却し、その後液体窒素中で保管した。解凍後、細胞増殖/細胞毒性アッセイキットを用いて、生存細胞数と細胞障害の程度を測定した。次に凍結保護剤による凍結前のスフェロイド (非凍結群) と凍結解凍後のスフェロイド (凍結群) の体性幹細胞マーカー、多能性幹細胞マーカー、および骨分化マーカーの発現を比較した。また、7 日間骨分化誘導培地にて分化誘導後、骨分化マーカーの発現を調べた。次に非凍結群および凍結群のスフェロイドと、これらを骨分化誘導後の細胞とをそれぞれ  $\beta$ -TCP ブロックへ播種し、SCID マウスの背部皮下へ埋入した。4 週後に摘出・固定し、脱灰、包埋、薄切して Hematoxylin-Eosin にて染色し、組織学的検討を行った。

結果：解凍後の細胞生存率は 5% DMSO の群で最も高く、細胞障害の程度もこの群が最も低かった。この条件で凍結したスフェロイドについて、体性幹細胞マーカーである CD29, CD44, CD105, Scx1, 多能性幹細胞マーカーである SSEA1, Sox2, Oct4, Nanog, KLF4 および骨分化能のマーカーである OCN, OPN, Col1A1, BSA, Osterix の発現を比較したところ、非凍結群と凍結群で有意差は認められなかった。骨分化誘導後、非凍結群と凍結群の ALP 活性には有意差は認められなかった。また、骨分化マーカーである BSP, Osterix, DMP1 の発現も、非凍結群と凍結群の間で有意差は認められなかった。SCID マウスへ移植後 4 週のサンプルを解析したところ、凍結群では非凍結群と同程度の骨組織の再生が認められ、さらに、骨分化誘導を行わない場合でも、分化誘導を行った自発的スフェロイドと同程度の骨形成がみられた。

(様式第 13 号)

結論：CB-MSCs による自発的スフェロイドを調製し、凍結保護剤である DMSO の濃度の最適化を試みたところ、5%で最も高い生存率が得られた。この条件で凍結保存を行った自発的スフェロイドでは幹細胞性、骨分化能、および骨形成能が維持されており、凍結保存を行っていない自発的スフェロイドと同程度であった。適切な凍結保存方法を選択することで、CB-MSCs による自発的スフェロイドは利便性の高い骨再生用の細胞源となることが示唆された。

#### 学位論文審査結果の要旨

本研究は、申請者らのグループが見出した優れた幹細胞性や高い骨分化能を有するマウス皮質骨由来間葉系間質細胞 (CB-MSCs) から形成されるスフェロイドを再生医療に応用するための凍結保存方法の確立を目指した研究である。凍結保護剤である DMSO の濃度を変えることで凍結方法の最適化を試みた結果、5%DMSO を含む凍結保存液を用いた場合、凍結保存を行っていないスフェロイドと同様の幹細胞性、骨分化能、骨形成能が維持されることを明らかにした。

本研究で得られた成果は、CB-MSCs から形成されるスフェロイドの再生医療への応用の可能性を高めるものであり、今後の我が国における歯科臨床および歯科医学の発展への寄与が期待されることから、博士 (歯学) の学位授与に値するものと判定した。

#### 最終試験結果の要旨

申請者の学位申請論文に関連して、以下のような項目を中心に口頭試験を行った。

1. 使用した培養ディッシュについて
2. Organoid 培養との優位性の比較について
3. 歯科領域での臨床応用の対象について
4. 細胞死とアポトーシスの解釈について
5. 統計手法について
6. 凍結溶液の成分として FBS を用いた理由について
7. CB-MSCs の由来として顎骨を用いなかった理由について

以上の質問に対して、文献的な考察を含めて概ね妥当な回答が得られたことから、学位申請者は本学大学院博士課程修了者と同等の知識と学力を有していると判断し、最終試験を合格と判定した。

判定結果

合格

・ 不合格

#### 備考

- 1 学位論文名が外国語で表示されている場合には、日本語訳を ( ) を付して記入すること。
- 2 学位論文名が日本語で表示されている場合には、英語訳を ( ) を付して記入すること。
- 3 論文審査委員名の前に、所属機関・職名を記入すること。