

氏名	Hai Thanh Pham		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5319号		
学位授与の日付	平成28年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	必須アミノ酸トリプトファンが骨髄由来間葉系幹細胞および骨形成に与える影響		
論文審査委員	久保田 聡 教授	松本 卓也 教授	窪木 拓男 教授

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

日本は超高齢社会に突入し、老化に伴う骨折や変形性関節症、骨粗鬆症等といった加齢性疾患の増加が社会的な問題となっている。これらに関連して、Stem cell aging という概念が提唱され、Hallmarks of Aging として知られる加齢変化のメカニズムの中でも本質的なものと認識されつつある。この幹細胞の老化を防ぐ各種アンチエイジング療法や幹細胞移植治療を含む、加齢関連疾患に対する新しい治療アプローチが世界中で進められている。

一方、様々な組織を構成している蛋白質の構成要素であるアミノ酸は、細胞内や血漿などに遊離した形で存在し、アミノ酸自体がアミノ酸トランスポーターを介し、直接細胞の増殖や代謝を調整することで、生体内で様々な役割を担っていることが知られている。中でも、必須アミノ酸の一つである Methionine の代謝産物が多能性幹細胞 (ES 細胞)や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の維持、分化のための調節因子として重要な働きを担うこと、必須アミノ酸の投与が骨粗鬆症を軽減させることが報告されている。従って、必須アミノ酸が直接的か間接的かは不明であるが、骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow derived stromal stem cell: BMSC) の未分化性維持や骨代謝に関与する可能性が強く示唆される。しかし、詳細な効果やその制御メカニズムは十分明らかとなっていない。そこで、本研究では、BMSC の未分化性維持と骨代謝に関与するアミノ酸の探索を行った。

#### 【方法と結果】

22 種類のアミノ酸 (10  $\mu$ M) を用い、hBMSCs の未分化性を促進するアミノ酸を間葉系幹細胞の未分化マーカーである SSEA-4 の陽性細胞率、幹細胞マーカーである NANOG, OCT-4 および SOX-2 の遺伝子発現量を指標にスクリーニングを行った。その結果、L-Tryptophan が間葉系幹細胞の未分化性維持に関わっているアミノ酸として同定された。次に、hBMSCs を L-Tryptophan で刺激し、L-Tryptophan が hBMSCs の未分化性、細胞遊走能、および脂肪細胞、骨芽細胞分化能に与える影響を検討した。未分化マーカーである CD146 を用いた免疫細胞化学染色の結果、L-Tryptophan 処理により CD146 陽性細胞の割合が有意に増加した (1.2 倍,  $p < 0.001$ )。さらに、L-Tryptophan 処理により有意に細胞遊走能が促進されることを、ボイデンチャンバー法を用いて確認した (1.5 倍,  $p < 0.01$ )。また、L-Tryptophan 処理した hBMSCs は脂肪細胞への分化は抑制され、骨芽細胞への分化は有意に促進された。

次に、8週齢雌性 C57BL/6 マウスに L-Tryptophan (50 mg/kg) を3週間毎日腹腔内投与し、L-Tryptophan の全身投与が骨髄内 mBMSCs の幹細胞性（未分化性、多分化能、増殖能）に与える影響を検討した。その結果、L-Tryptophan 投与マウス由来 mBMSCs は、対照群のマウスと比較し、コロニー形成能が高く（1.5倍、 $p < 0.05$ ）また SSEA-4 陽性率も有意に高かった（1.6倍、 $p < 0.05$ ）。また、L-Tryptophan 投与マウス由来 mBMSCs の脂肪細胞、骨芽細胞分化能を検討した。その結果、L-Tryptophan 投与マウス由来 mBMSCs の脂肪細胞への分化能に差を認めなかったが、骨芽細胞への分化は有意に促進された。さらに、大腿骨海綿骨骨量への影響を micro-CT を用い評価した。その結果、L-Tryptophan 投与群は対照群と比較して、海面骨骨塩量（1.4倍、 $p < 0.001$ ）、海綿骨体積率（2.1倍、 $p < 0.01$ ）は有意に増大していた。

最後に、L-Tryptophan (50 mg/kg) を7日間毎日腹腔内投与した5週齢雌性 C57BL/6 マウス大腿骨骨体部に直径 1 mm の骨欠損を作製し、L-Tryptophan 全身投与が骨欠損の創傷治癒に与える影響を検討した。micro-CT 解析の結果、対照群と比較し、L-Tryptophan 投与群は骨欠損作製部位に著大な X 線不透過像が観察され（1.8倍、 $p < 0.05$ ）、組織学的解析の結果、皮質骨がより旺盛に再生されている像が観察された。

#### 【結論と考察】

今回の研究では必須アミノ酸の一つである Tryptophan が骨髄由来間葉系幹細胞の未分化性維持に関わり、Tryptophan 投与により大腿骨の海綿骨量の増加、ならびに実験的大腿骨欠損モデルにおいて骨再生が促進されることが明らかとなった。作用メカニズムの詳細は未だ十分明らかではないが、日常生活で摂取できる必須アミノ酸を利用することにより、加齢と関連した病的骨折、歯周病に関連した歯槽骨吸収、骨粗鬆症等の予防や病態改善に貢献することができるとすれば、本研究成果は大変有意義なものと考えられる。

## 論文審査結果の要旨

未曾有の高齢化社会に突入した我が国において、高齢者の骨折や変形性関節症、骨粗鬆症といった老化に伴う加齢性疾患の増加が社会的な問題となっている。本研究では、加齢性の骨疾患に対する治療・予防薬の開発を最終目的として、生体内で様々な生理活性を有するアミノ酸に着目し、全身の骨再生や骨質の維持に重要な役割を果たす間葉系幹細胞に対してアミノ酸を加え、培養によるスクリーニングを行った。その結果必須アミノ酸のひとつである Tryptophan が幹細胞の幹細胞性の維持効果を有するとともに、全身投与により骨質改善および骨欠損の治癒促進効果を有することを明らかにすることができた。

具体的には、22種類のアミノ酸を用い、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（以下：hBMSC）の幹細胞性を促進するアミノ酸を間葉系幹細胞のマーカーである SSEA-4 の陽性細胞率、幹細胞マーカーである NANOG、OCT-4 および SOX-2 の遺伝子発現量を指標にスクリーニングを行った。その結果、L-Tryptophan が hBMSC の幹細胞性維持に関わっているアミノ酸として同定された。さらに、L-Tryptophan 処理により有意に細胞遊走能が促進されることを、ボイデンチャンバー法を用いて確認した。また、L-Tryptophan 処理した hBMSCs は脂肪細胞への分化は抑制され、骨芽細胞への分化は有意に促進された。

さらに、in vivo における L-Tryptophan の効果を検討するため、マウスに L-Tryptophan を3週間毎日腹腔内投与し検討した。その結果、L-Tryptophan 投与マウス由来 mBMSCs は、対照群のマウスの mBMSCs と比較し、コロニー形成能が高く、また SSEA-4 陽性率も有意に高かった。また、L-Tryptophan 投与マウス由来 mBMSCs の脂肪細胞への分化能に差を認めなかったが、骨芽細胞への分化は有意に促進された。さらに、大腿骨海綿骨骨量への影響を micro-CT を用い評価した。その結果、L-Tryptophan 投与群では対照群と比較して、海面骨骨塩量、海綿骨体積率は有意に増大していた。

最後に、L-Tryptophan を7日間毎日腹腔内投与したマウス大腿骨骨体部に直径 1 mm の骨欠損を作製し、L-Tryptophan 全身投与が骨欠損の創傷治癒に与える影響を検討した。micro-CT 解析の結果、対照群と比較し、L-Tryptophan 投与群には骨欠損作製部位に著名な X 線不透過像が観察され、組織学的解析の結果、皮質骨がより旺盛に再生されている像が観察された。

本研究論文では、必須アミノ酸の一つである Tryptophan が骨髄由来間葉系幹細胞の幹細胞性維持に関わり、Tryptophan 投与により大腿骨の海綿骨量の増加、ならびに実験的大腿骨欠損モデルにおいて骨再生が促進されることを明らかにしており、加齢と関連した病的骨折、歯周病に関連した歯槽骨吸収、骨粗鬆症等の予防や治療薬の開発に繋がるものとして評価できる。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。