

氏名	國友 由理
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6044号
学位授与の日付	令和元年9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	Acidic Pre-Conditioning Enhances the Stem Cell Phenotype of Human Bone Marrow Stem/Progenitor Cells (組織の炎症が引き起こす酸性条件がヒト骨髄由来間葉系幹細胞に及ぼす影響)
論文審査委員	上岡 寛 教授      岡村 裕彦 教授      西田 崇 准教授

## 学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

### 【緒言】

創傷部位の治癒においては、炎症や免疫反応が組織再生に最適な条件に調整される必要があり、創傷部位に誘導される組織幹細胞が炎症や免疫反応制御といった重要な働きを担っていることが知られている。そこで我々はこれまでに、マウス大腿骨骨折や抜歯窩治癒過程において、未分化間葉系幹細胞のマーカーの一つである CD146 陽性、SSEA4 陽性の組織幹細胞が多数集積し、時間と共にその数が減少すること、また、炎症部位に誘導された組織幹細胞は通常の間葉系幹細胞と比較し、多分化能や増殖能が高い細胞群であることを報告してきた。さらに、創傷治癒の炎症期に発現が誘導される炎症性サイトカインの一つである TNF- $\alpha$  による短期刺激にて間葉系幹細胞の未分化マーカーの発現が上昇し、多分化能が向上することを報告してきた。しかし、創局所に集積した組織幹細胞に対して、炎症環境において変化した pH がどのような影響を及ぼすかについては、いまだ不明な点が多い。そこで、本研究では抜歯窩および大腿骨の創傷治癒モデルを用いて pH の経時的変動を測定し、治癒過程における最低値 pH がヒト骨髄由来間葉系幹細胞（以下、hBMSCs）に与える影響を検討したので報告する。

### 【方法と結果】

創傷治癒部位における pH の変化を明らかにするため、8 週齢 C57BL/6 マウスの実験的大腿骨欠損部と抜歯窩の pH を、高解像度光ファイバー pH マイクロ非破壊センサーを用いて計測した。本測定器は直径 140  $\mu\text{m}$  の非常に小さな光学センサーを用いるため、組織を破壊することなく局所の pH を測定することが可能である。マウス抜歯窩 (N=4) の創傷治癒部 pH は、術直後に 7.15 であったが、1 日後には 6.90、2 日後には 6.87 まで低下した。その後 pH は徐々に上昇し、7 日後には 7.05 まで回復した。実験的大腿骨欠損部の pH は、術直後に 7.10 であったが、6 時間後に 6.90 まで低下し、1 日後には 6.85 まで低下した。術後 3 日後から pH は上昇し、7 日後には 7.12 まで回復した。

*in vivo* で得られた結果をもとに pH を調整した培地で hBMSCs を培養し、それらの細胞増殖能を MTS

assay で、細胞遊走能を Boyden Chamber 法にて評価した。また、幹細胞性を幹細胞マーカーである Stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4), Octamer-binding transcription factor 4 (OCT-4), NANOG を指標に、フローサイトメトリーおよび定量性 RT-PCR 法にてそれぞれ評価した。pH 6.8 の酸性条件にて hBMSCs を培養した結果、hBMSCs の幹細胞マーカーである SSEA-4 のタンパク質発現レベル (1.31 倍), OCT-4 (1.66 倍,  $p < 0.05$ ), NANOG (1.47 倍,  $p < 0.05$ ) の mRNA 発現レベルの上昇を認めた。また、hBMSCs の細胞増殖能は有意に上昇したが (1.18 倍,  $p < 0.01$ ), 細胞遊走能は有意に低下した (0.84 倍,  $p < 0.05$ )。

#### 【結論と考察】

高解像度光ファイバーpH マイクロ非破壊センサーを用いて解析した結果、歯槽骨や大腿骨の創傷部位は、創傷直後に pH 6.8 程度の酸性状態に誘導されることが明らかになった。この酸性条件下では、hBMSCs が呈する幹細胞性が向上すると共に、細胞増殖能が向上するが、細胞遊走能は低下することが明らかとなった。つまり、創傷直後の創傷部位の pH の低下は、創傷治癒において重要な働きを担っている hBMSCs の幹細胞性を向上させるだけでなく、細胞を創傷治癒部位において増殖させるとともに、その部位に留めるために細胞遊走能を低下させる役割がある可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

創傷部位の治癒においては、炎症や免疫反応が組織再生に最適な条件に調整される必要があり、局所もしくは創傷部位に誘導される組織幹細胞が重要な働きを担っていることが知られている。しかし、炎症環境において変化したpHが創局所に集積した組織幹細胞にどのような影響を及ぼすかについては、いまだ不明な点が多い。本研究では抜歯窩および大腿骨の創傷治癒モデルを用いてpHの経時的変動を測定し、治癒過程における最低値pHがヒト骨髄由来間葉系幹細胞（以下、hBMSCs）に与える影響を検討した。

創傷治癒を担う細胞が作り出す微小環境について検討するために、8週齢C57BL/6マウスの実験的大腿骨欠損部と抜歯窩のpHを、高解像度光ファイバーpHマイクロ非破壊センサーを用いて計測した。さらに *in vivo* で得られた結果をもとにpHを調整した培地でhBMSCsを培養し、それらの細胞増殖能をMTS assayで、細胞遊走能をBoyden Chamber法にて評価した。また、幹細胞性を幹細胞マーカーであるSSEA4, OCT-4, NANOGを指標に、フローサイトメトリーおよびリアルタイムRT-PCR法にてそれぞれ評価した。

マウス抜歯窩（N=4）の創傷治癒部pHは、術直後に7.15であったが1日後には6.90、2日後には6.87まで低下した。その後pHは徐々に上昇し、7日後には7.05まで回復した。実験的大腿骨欠損部pHは、術直後に7.10であったが6時間後に6.90まで低下し、1日後には6.85まで低下した。術後3日後からpHは上昇し、7日後には7.12まで回復した。次に、pH 6.8の酸性条件にてhBMSCsを培養した結果、hBMSCsの細胞増殖能は上昇し（1.18倍、 $p < 0.01$ ）、hBMSCsの幹細胞マーカーであるSSEA4のタンパク質発現レベル（1.31倍）、OCT-4（1.66倍、 $p < 0.05$ ）、NANOG（1.47倍、 $p < 0.05$ ）のmRNA発現レベルの上昇を認めた。一方、細胞遊走能（0.84倍、 $p < 0.05$ ）は低下した。

高解像度光ファイバーpHマイクロ非破壊センサーを用いることで、歯槽骨や大腿骨の創傷直後においてはpH 6.8程度の酸性状態が誘導されることが明らかになった。この酸性状態は、組織再生に向けてhBMSCsが示す幹細胞性を高め、さらに細胞を創傷治癒部位において増殖させるとともに、その部位に留めるために細胞遊走能を低下させる可能性が示唆された。

本論文はすでに *International Journal of Molecular Sciences* に受理（掲載）されており、国際的にも評価されている。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。