

審査の結果の要旨

氏名 柳原 歌代子

本論文は遺伝子導入細胞凝集塊スフェロイドを用いた再生医療の可能性について検討を行ったものである。第1章では、簡便かつ大量のスフェロイド調製のために開発された微細加工プレートを利用し、間葉系幹細胞（MSC）に **runx-related transcription factor 2**（**Runx2**）遺伝子導入を行い、ラット大腿骨骨欠損モデルにおける骨修復能を検討した。また第2章では従来のDNAに代わる遺伝子導入手法として、ゲノムへの挿入リスクがなく、非分裂細胞へも導入可能なRNAを用いて、スフェロイド細胞移植への有用性について検討した。本研究において得られた結果は、以下の通りである。

1. **Runx2** を導入した **MSC** スフェロイドを骨欠損モデルラットに移植したところ、**Runx2** 未導入スフェロイド移植群や **Runx2** 導入単層培養由来 **MSC** 移植群と比べて明らかに骨形成が促進されたことから、遺伝子導入スフェロイド移植システムにより骨再生の治療効果が増強し、本システムの有効性を示すことができた。
2. *in vitro* で骨分化能を評価したところ、**Runx2** の導入の有無に関わらず、スフェロイド移植群において単層培養由来 **MSC** 移植群と比べて有意に早期の骨形成が促進していた。スフェロイドでは、単層培養由来の細胞に比べてより生体環境に近い状態にあるため、細胞の機能が維持され、結果的に優れた治療効果が得られたと考えられる。
3. *in vivo* 環境における移植細胞の分布を調べたところ、スフェロイド移植群で骨欠損部に多くの移植細胞が観察された。これは、スフェロイド化により細胞の遊走能が向上し、**MSC** の損傷部へ集積する能力により、移植細胞が担体から骨欠損部に遊走したことが想定される。そこで、遊走関連遺伝子の発現を調べたところ、スフェロイド化により遺伝子の発現が向上することが分かった。
4. 骨欠損も含め疾患モデルに対する応用では、しばしば炎症反応や虚血といった特殊な微小環境に対して移植することとなる。そのような微小環境下における **MSC** の機能や、スフェロイド化による効果について調べた報告はこれまでないため、本研究で炎症・虚血環境下における骨分化について検証したところ、スフェロイド群では、単層培養群に比べ骨分化が有意に促進していた。
5. 本研究において、スフェロイド化により欠損部における骨再生が促進したが、そのメカニズムとして、移植した **MSC** が骨分化して骨マトリックスの産生を促進した可能性と、移植した **MSC** が骨分化を誘導する分泌因子を分泌することでホスト細胞の骨再生を促進した可能性が想定される。後者に関して骨誘導分泌因子の分泌能を評価したところ、

Runx2 導入やスフェロイド化により分泌能が向上していた。

6. スフェロイドへの遺伝子導入手法として、mRNA を用いた遺伝子導入の可能性について検証した。mRNA 導入により、pDNA を導入した場合と比べて、スフェロイドのより多くの細胞においてタンパク質発現が得られた。
7. 細胞周期と遺伝子発現の関連性について調べると、本研究に用いた 100 μ m のスフェロイドでも大部分の細胞が非分裂状態であり、mRNA を導入した場合は非分裂細胞でも効率的にタンパク質が発現するが、pDNA を導入した場合はほとんど発現しなかった。従って、mRNA を用いることでこのような非分裂細胞集団にも遺伝子導入が可能であることが示された。
8. スフェロイドの径に関して、mRNA による高いタンパク質発現はスフェロイドの径に関わらず観察されたが、径が大きいスフェロイドでは、スフェロイド内部でのタンパク質発現が得られなかった。径の大きいスフェロイドでは内部が低酸素化状態になり、スフェロイド内部が壊死しているためにタンパク質発現が得られなかったと考えられる。

以上、本論文ではスフェロイド培養技術と遺伝子導入技術を融合した細胞移植システムを基盤として、その発展に取り組み、今後の治療応用に向けた優れた知見が得られた。従って、学位の授与に値するものと考えられる。