

# 中村康平 論文内容の要旨

主 論 文

ROCK inhibitor Y-27632 maintains the proliferation of  
confluent human mesenchymal stem cells

(ROCK 阻害剤 Y-27632 はコンフルエントなヒト間葉系幹細胞  
の増殖を維持する)

中村康平、吉村篤利、金子高士、佐藤佳昌、原宜興

Journal of Periodontal Research (掲載時期：未定)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：原 宜興 教授)

## 【緒言】

間葉系幹細胞 (MSC) を用いた細胞シートの移植は、次世代の歯周再生療法として期待されている。しかし MSC をシート状に多層化させる適当な方法は未だ確立されていない。われわれの予備実験において、多層化培地 (MFM, Tanaka et al, 2009) は増殖を停止したコンフルエントな MSC を刺激し増殖させたが、MSC シートの辺縁部は培養皿から剥離した。一般的に細胞シートに含まれる細胞が増殖するとき、ROCK 依存性収縮性フォースによる細胞収縮がシートを培養皿から剥離させ、その際収縮部の細胞増殖は停止する。そこで我々は ROCK 阻害剤である Y-27632 がコンフルエントな MSC の増殖と剥離におよぼす効果を検討し、さらに細胞シートに含まれる細胞の骨芽細胞系分化能と脂肪細胞系分化能を調べた。

## 【材料および方法】

コンフルエントな MSC を Y-27632 添加・非添加の MFM (1 ng/ml TGF- $\beta$ 1, 0.15 mM アスコルビン酸2リン酸および10% FBS 添加培地) で培養した。細胞増殖は BrdU 取り込み解析と全 DNA 量測定にて調べた。シートの収縮は光学顕微鏡および実体顕微鏡で観察した。細胞シートの多層化および接着斑の集積は共焦点顕微鏡で観察した。細胞表面マーカーはフローサイトメトリー法にて解析した。また細胞シートに含まれる細胞の骨芽細胞系分化は ALP 染色およびアリザリンレッド染色で、脂肪細胞系分化はオイルレッド染色で観察した。

## 【結果】

MFM への Y-27632 の添加は細胞シートの剥離を妨げ、MSC の増殖を抑制しなかった。Y-27632 非添加では予備実験のとおり細胞シートは4日目で剥離し、剥離部の BrdU 陽性細胞数は減少していた。Y-27632 を添加した細胞シートに存在する細胞は、初代 MSC と細胞表面マーカーの発現が類似しており、かつ骨芽細胞系および脂肪細胞系に分化した。

## 【考察】

コンフルエントな MSC の増殖を MFM で刺激すると、MSC シート辺縁がウェルから剥離し、収縮部の BrdU 標識細胞は付着部よりも明らかに少なかった。MFM による多層化増殖と同時に発生するフォースによって、シート全体の応力が増し、シート

の剥離を引き起こし、収縮部の細胞は増殖停止の方向に進んだのであろう。MFM に含まれる TGF- $\beta$ 1 は ROCK を介して細胞収縮性フォースと接着斑を誘導することが知られている。Y-27632 は ROCK の活性化を阻害し、その結果細胞収縮性フォースと接着斑の誘導を抑制する。これにより MFM/Y-27632 での培養は、MSC シートの剥離を回避させ、細胞増殖を維持したと思われる。我々の MSC シートに含まれる細胞は初代 MSC と細胞表面マーカーの発現が類似しており、骨芽細胞系と脂肪細胞系の少なくとも 2 つの系統に分化した。Y-27632 は幹細胞の多分化能を維持する働きを持つことが報告されており、多分化能維持の点からもこの試薬の添加は有効であると考えられた。

#### 【結論】

MSC シートの収縮剥離は増殖を抑制するので、Y-27632 を用いてフォースと接着斑を抑制すると、多分化能を保持する多層化 MSC シートが作製できる。この方法はより容易な細胞シートの作製を可能にし、歯周治療における細胞治療法への応用が期待される。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。