The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Optimization of human mesenchymal stem cell isolation from synovial membrane : Implications for subsequent tissue engineering effectiveness
Author(s)	杉田, 憲彦
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61533
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	杉田　憲彦
論文題名 Title	Optimization of human mesenchymal stem cell isolation from synovial membrane: Implications for subsequent tissue engineering effectiveness (滑膜から間葉系幹細胞を分離する至適条件の検討：今後の組織工学の効率化への寄与)

論文内容の要旨(Abstract of Thesis)

〔目　的(Purpose)〕

間葉系幹細胞は生体内の骨髄、骨格筋、脂肪、滑膜、臍帯血等に存在する体性幹細胞であり、自己複製能と脂肪、軟骨、骨、筋、神経などへの多分化能を有している。その中で滑膜由来間葉系幹細胞は他の組織由来間葉系幹細胞に比して高い増殖能、軟骨分化能を有し、軟骨再生に適した細胞源と考えられている。細胞用いた再生医療において十分量の細胞の確保は最も重要な要素の一つである。滑膜からの幹細胞分離においてはコラゲナーゼ処理後フィルター濾過し細胞を播種する方法が広く用いられているが、フィルター濾過により溶け残った組織中に含まれる有用な細胞が失われている可能性があった。そこで本研究では臨床で想定される培養期間である3週間で滑膜からより効率よく間葉系幹細胞を得るための分離・培養方法について特にフィルター処理と播種濃度に着目し比較、検討を行うことを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

インフォームドコンセントを得た上で膝関節鏡視下手術の際に切除した余剰滑膜1.5g（n=18、平均年齢25.5歳）を使用した。滑膜を細断後コラゲナーゼ処理し、浮遊組織を除去し、さらにフィルター濾過で沈殿組織を除去した群（Group 1）、フィルター濾過は行わず、遠心ののち浮遊組織のみを除去した群（Group 2）、フィルター処理も浮遊組織除去も行わなかった群（Group 3）に3等分した。各群の懸濁液を少量採取し、そのDNAを測定した。滑膜0.25gあたりから得られた懸濁液中のDNA量を算出すると、Group 1で3.9±7.2μg、Group 2で42.0±7.2μg、Group 3で42.3±10.0μgとフィルター濾過を行ったGroup 1が他の2群の約10%と有意に少なかった（Group 1 vs Group 2 $p<0.01$, Group 1 vs Group 3, $p<0.05$）。顕微鏡視下では浮遊組織除去とフィルター濾過により細胞懸濁液中の組織だけでなく単一細胞数も減少していることが確認された。

細胞懸濁液の播種に際しては、さらに各群を2等分後Group 1の細胞数をカウントし、高密度(5000cells/cm^2)もしくは低密度(1000cells/cm^2)でdishに播種した。Group2, 3では各濃度においてGroup 1で播種したのと同数のdishに播種した。播種後は細胞が80 % confluenceに達した時点で継代をおこなった。高密度で播種したものは継代時にも高密度（5000cells/cm^2）で、低密度で播種したものは低密度（1000cells/cm^2）で再度播種し21日間培養をおこなった。

各群細胞分離から21日間の培養で滑膜0.25g当たりから得られる総細胞数を比較した。Group 1では高密度、低密度間に有意な差はなかった（$0.6 \pm 0.9 \times 10^7$ cells vs $0.7 \pm 1.2 \times 10^7$ cells）。それに対してフィルター濾過を行わなかったGroup 2, 3では低密度で播種した場合、高密度より有意に多くの細胞が得られた（Group 2：$5.7 \pm 1.1 \times 10^7$ cells vs 3.1 ± 1.0^7 cells, $p<0.05$、Group 3: $4.4 \pm 1.2 \times 10^7$ cells vs $1.5 \pm 1.5 \times 10^7$ cells, $p<0.05$）。さらに低密度ではGroup1 に比してGroup2, 3 で得られた細胞数は有意に多かった（Group 1 vs Group 2、約8倍、$p<0.01$、Group 1 vs Group 3、約6倍、$p<0.05$）

各群の低密度播種で21日間の培養の後に得られた細胞の骨分化能（Alizarin Red染色）、脂肪分化能（Oil Red O染色）、軟骨分化能（Pellet培養後、Safranin O染色、GAGの定量）を比較したところ各群同等の分化能を示した。

〔総　括(Conclusion)〕

これまで教科書や多くの科学論文で記載されていた滑膜組織のコラゲナーゼ処理後のフィルター濾過がその後の培養によって最終的に得られる間葉系幹細胞の総数を有意に減少させていることが明らかとなった。フィルター処理の如何にかかわらず細胞の分化能は同等であり、滑膜からの細胞分離時のフィルター濾過の必要性は否定的である。またフィルター濾過の如何にかかわらず細胞分離時、およびその後の継代時に低密度で細胞を播種した方がより多くの細胞が得られることが明らかとなった。フィルター濾過の課程を省略するより簡便な作業でより多くの細胞が得られ、今後滑膜由来の間葉系幹細胞を用いた研究において有用な手段となりうる。また他の組織からの細胞分離にも応用できる可能性がある。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　杉田　憲彦

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	吉川秀樹
	副　査	大阪大学教授	澤　芳樹
	副　査	大阪大学教授	中田研

論文審査の結果の要旨

本論文は滑膜から間葉系幹細胞を分離する至適条件について、特に滑膜を酵素処理した後のフィルター処理に注目して検討した論文である。

滑膜由来間葉系幹細胞（SDMSC）は他の組織由来間葉系幹細胞に比して高い増殖能、軟骨分化能を有し、軟骨再生に適した細胞源と考えられている。細胞用いた再生医療において充分量の細胞の確保は最も重要な要素の一つである。近年のSDMSCについての論文では滑膜を酵素処理後フィルター濾過し細胞を播種する方法が広く用いられているが、フィルター濾過により溶け残った組織中に含まれる有用な細胞が失われている可能性があった。そこで本研究では滑膜からより効率よくSDMSCを得るための分離・培養方法についてフィルター濾過に着目し比較、検討を行うことを目的とした。

滑膜を酵素処理後、フィルター濾過を行い浮遊組織を除去した群、フィルター濾過を行わず浮遊組織のみを除去した群、フィルター濾過を行わず浮遊組織も除去しなかった群の3群に分けた。フィルター濾過の時点で多くの細胞が失われていることが、細胞懸濁液中のDNA量を評価することにより判明した。フィルター濾過を行わず、低密度で播種した群ではフィルター濾過を行った群より21日間の培養で5倍程度の細胞を得ることができた。さらに得られた細胞の骨・脂肪・軟骨分化能は同等であった。以上よりフィルター濾過を行わないことにより、従来法と同等の細胞がより多く得られることが判明し、今後のSDMSCを用いた研究、治療に寄与すると思われる。

以上より、学位論文に値する。