

審 査 結 果 の 要 旨

論文題目「Fundamental investigation on cryopreservation of canine and human
activated nucleus pulposus cells」
(軟骨異栄養犬種およびヒト活性化髄核細胞凍結保存に関する基礎的研究)

学位申請者 田中 真弘

本論文は、ビーグル犬およびヒト手術材料から得られた椎間板を用いて、椎間板髄核細胞と自己骨髄由来の間葉系幹細胞を凍結保存した後に細胞間接着を伴う共培養を行って活性化髄核細胞を作製し、非凍結の活性化髄核細胞との機能的差につき比較検討した論文である。

申請者らの研究グループでは、従前よりヒトの変性椎間板に対して自家髄核細胞移植を行い、その安全性を実証しているが、採取した髄核細胞をそのまま骨髄間葉系幹細胞との共培養に供した後に直ちに移植に用いるため、保存した細胞を用いた待機的な移植治療や、髄核細胞バンクの設立による同種細胞移植は困難であった。本研究では、ビーグル犬ならびにヒトの髄核細胞を用いて、採取後直ちに共培養を行った A 群（非凍結群）、分離細胞の状態で 2 週間凍結保存した後に共培養を行った B 群（細胞凍結群）、さらには椎間板組織の状態で凍結保存した後に髄核細胞を分離して共培養を行った C 群（組織凍結群）について、髄核細胞の増殖能および機能を比較検討した。その結果、髄核細胞を分離した状態で凍結保存をした B 群においても、凍結操作なしで直ちに共培養に供した A 群の髄核細胞と同等の生存率と増殖能、またマトリックス産生能やコロニー形成能が認められた。さらに、凍結保存を経た髄核細胞に染色体異常や腫瘍形成は認められなかった。以上の所見から、髄核細胞を安全かつ高機能を保持した状態で凍結保存することが可能であることが示され、今後の活性化髄核細胞移植術の臨床応用拡大の上で、貴重な *in vitro* のデータを示した臨床的意義も大きい価値ある論文である。

本論文に対して、各審査委員から次のような質疑がなされた。

- 1) 椎間板髄核細胞移植を行わなかった際の変性椎間板の自然経過
- 2) 活性化椎間板髄核細胞の椎間板再生医療に対する意義
- 3) 正常組織由来の髄核細胞と変性椎間板由来の髄核細胞の増殖能や発現形質の相違
(ビーグル犬とヒトの髄核細胞のデータを同等に評価可能か?)
- 4) 髄核組織を 3 群に分割したサンプルから得られた対応のあるデータであるが、研究デザイン上、A 群と B および C 群を同期して培養・評価できないことによる限界
- 5) 同種の *feeding cell* としての間葉系幹細胞使用の可能性
- 6) 細胞活性化の定義
- 7) RT-PCR では、リアルタイム法により遺伝子発現量を測定したほうが定量性に優れたのではない
か?
- 8) 自己血清とウシ胎仔血清を選択する相違と意味（自己血清を用いた場合にはウシ胎仔血清を用いた
時ほどの細胞増殖が得られていないが、それを解決するための液性因子に関する研究の状況）
- 9) 染色体異常をより詳細に検討するには、array CGH 等がより適していると思われるが、如何か?
- 10) 凍結の際に緩徐に温度を下げる目的、解凍の際に急速に温度を上げる目的
- 11) 凍結後、解凍後の切片にて細胞の状態を検討しているか?

- 1 2) 凍結保存期間を 2 週間とした根拠および凍結保存が長期間となった場合の影響
- 1 3) 組織凍結に関しての有用性、および組織保存の研究を進め応用する可能性
- 1 4) 今回は、凍結保存群と非凍結群との機能的差について、細胞 **viability**、細胞増殖能、基質合成能、コロニー形成能といった **in vitro** での **assay** を用いて検討しているが、将来の臨床応用を考えると **in vivo** すなわち移植した際の効果を比較する必要があると思われる。計画をしているか？
- 1 5) 本実験結果を踏まえて現在実施している研究
- 1 6) 凍結髄核細胞の臨床展開の可能性
- 1 7) 他の先進的な治療と比較した場合の細胞療法のメリットとデメリット

これらの質問および指摘事項に対して、申請者は自らの実験結果と所属する研究グループによる先行研究データ、さらに文献的考察も含めて丁寧な説明を行い、その中で今回用いた方法の限界や今後の展望についても冷静に分析を行うなど、博士の学位を授与するに十分な資格を有すると判断された。現在、所属する研究グループにより推進されている椎間板変性に対する再生医療をさらに改善し適応を拡大する基盤となる研究内容と考えられ、今後の研究の発展に大きな期待が寄せられた。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。したがって、申請者 田中 真弘は東海大学博士（医学）の学位を授与されるに値すると判断した。

論文審査委員

主査	博士（医学）	小林 広幸	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	医学博士	稲垣 豊	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	医学博士	中村 雅登	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	佐藤 正人	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	医学博士	持田 譲治	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）