

学位論文

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を利用した硝子軟骨－線維軟骨
複合体の作製

杉野浩孝

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

医歯薬学専攻応用生命科学部門歯科矯正学

主指導教員：谷本 幸太郎 教授

2016年

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なるご指導ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科応用生命科学部門歯科矯正学研究室 谷本幸太郎教授ならびに本学基礎生命科学部門生体材料学研究室 加藤功一教授に心から感謝いたします。

また御教示、御校閲を賜りました本学応用生命科学部門歯周病態学研究室 栗原英見教授、基礎生命科学部門生体分子機能学研究室 宿南知佐教授、統合健康科学部門公衆口腔保健学研究室 杉山 勝教授に深謝いたします。

さらに本研究の遂行にあたり、本学基礎生命科学部門生体材料学教室 平田伊佐雄助教、錦織 良特任助教、本学自然科学研究支援開発センター 金輪真佐美助教には多大なるご助言を賜り誠にありがとうございました。

目次

| | | |
|-------|---|----|
| 第 1 章 | 序論 | 1 |
| 第 2 章 | 軟骨分化に及ぼす細胞密度の影響 | |
| 第 1 節 | 緒言 | 3 |
| 第 2 節 | 材料及び方法 | |
| 2.1 | 細胞培養 | 3 |
| 2.2 | 軟骨分化誘導 | 3 |
| 2.3 | リアルタイム PCR | 4 |
| 2.4 | 統計処理 | 4 |
| 第 3 節 | 結果 | 5 |
| 第 4 節 | 考察 | 8 |
| 第 5 節 | 結論 | 8 |
| 第 3 章 | ヒト骨髄由来間葉系幹細胞から線維軟骨及び硝子軟骨の分化誘導に効果的な成長因子の探索 | |
| 第 1 節 | 緒言 | 9 |
| 第 2 節 | 材料及び方法 | |
| 2.1 | 細胞培養 | 9 |
| 2.2 | 軟骨分化誘導 | 10 |
| 2.3 | 軟骨分化の判定 | |
| 2.3.1 | リアルタイム PCR | 11 |
| 2.3.2 | GAG 定量 | 12 |
| 2.3.3 | トルイジンブルー染色 | 12 |
| 2.3.4 | 免疫染色 | 12 |
| 2.4 | 統計処理 | 13 |
| 第 3 節 | 結果 | |
| 3.1 | IhMSC の軟骨分化 | 13 |
| 3.2 | NhMSC の軟骨分化 | 14 |
| 第 4 節 | 考察 | 21 |
| 第 5 節 | 結論 | 22 |

| | | |
|-------|--|----|
| 第 4 章 | ヒト骨髄由来間葉系幹細胞から線維軟骨及び硝子軟骨への分化誘導 におけるコラーゲンの効果 | |
| 第 1 節 | 緒言 | 23 |
| 第 2 節 | 材料及び方法 | |
| 2.1 | 細胞培養 | 23 |
| 2.2 | 軟骨分化誘導 | 24 |
| 2.3 | 軟骨分化の判定 | 24 |
| 2.4 | 統計処理 | 24 |
| 第 3 節 | 結果 | |
| 3.1 | IhMSC の軟骨分化 | 25 |
| 3.2 | NhMSC の軟骨分化 | 25 |
| 第 4 節 | 考察 | 29 |
| 第 5 節 | 結論 | 30 |
| 第 5 章 | 線維軟骨及び硝子軟骨 2 層構造をもつ複合組織の構築 | |
| 第 1 節 | 緒言 | 31 |
| 第 2 節 | 材料及び方法 | |
| 2.1 | 細胞培養 | 31 |
| 2.2 | 3D プリンターによる鋳型の作製 | 31 |
| 2.3 | 軟骨分化誘導 | 32 |
| 2.4 | ヘマトキシリン-エオジン染色 | 32 |
| 2.5 | トルイジンブルー染色 | 33 |
| 2.6 | 免疫染色 | 33 |
| 2.7 | 統計処理 | 33 |
| 第 3 節 | 結果 | |
| 3.1 | 線維軟骨様ペレットと硝子軟骨様ペレットの融合 | 34 |
| 3.2 | コラーゲンの分布 | 34 |
| 第 4 節 | 考察 | 38 |
| 第 5 節 | 結論 | 39 |
| 第 6 章 | 総括 | 40 |
| 参考文献 | | 41 |