

論文内容要旨

Ex-vivo における骨髄由来間葉系幹細胞を
用いた歯周組織構築

主指導教員：栗原 英見 教授

(医系科学研究科 歯周病態学)

副指導教員：寺山 隆司 教授

(医系科学研究科 顎顔面解剖学)

副指導教員：吉子 裕二 教授

(医系科学研究科 硬組織代謝生物学)

鈴木 雅彦

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

歯周組織は、歯肉、セメント質、歯周靭帯及び歯槽骨によって構成されている。一般的に組織を再生するための要素として、細胞、足場及びシグナル分子が重要とされ、それらを取り巻く環境や時間などが再生に導くための条件とされる。細胞の機能は、細胞間相互作用や細胞外基質によって制御されている。近年、場の硬さなどの細胞を取り巻く微小環境が、メカノシグナルトランスダクションによって細胞の分化に影響を与えることが注目されている。

歯周組織再生において最も重要なことは、セメント質再生とセメント質及び歯槽骨に埋入したコラーゲン繊維を伴う歯周靭帯の再生である。これまでの研究では、根分岐部病変に骨髄由来未分化間葉系幹細胞を移植した研究や、脳由来神経栄養因子による歯周組織再生研究において、セメント質再生に伴う OPN の発現が根表面において観察されている。このことからセメント芽細胞への分化や、セメント質再生において、象牙質表面における OPN の発現が重要なシグナルであると考えられる。

重度の歯周病によって抜歯した歯に対し、失われたセメント質と歯周靭帯を根表面に再生させ再移植できれば、歯の保存とともに歯周組織再生を誘導する治療法の開発となる。

本研究では、大規模歯周組織欠損部の再生と歯周病が原因で抜歯した歯の再植への応用を目指し、骨髄由来のヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を用い、*ex vivo* においてセメント質再生を目的として以下の研究を行った。

【材料と方法】

1. hMSC

hMSC (R41、理研) を Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、SIGMA) に 10% fetal bovine serum (FBS、GIBCO、Invitrogen Corp、Buffalo、NY) を加えた培地に hMSC を懸濁し、100mm 細胞培養プレート (CORNING、NY) に播種し、37°C、5%CO₂ 気相下で培養した。培地の交換は 3 日毎に行い、サブコンフルエントまで増殖した後に回収した。

2. hMSC・コラーゲン複合体

Type I コラーゲングル (Cellmatrix®、新田ゼラチン) を使用した。使用方法に従い常温でコラーゲングルを作製後、培養 hMSC と混合し、細胞濃度が 1.0×10^5 cells/ml となるよう調製した。

3. 象牙質片の表面処理

象牙質片 (1mm 厚) に 24%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA、pH7.4、SIGMA) を 3 分間作用させた後に、0.1M のリン酸緩衝液 (PBS) で 3 回洗浄を行った。

4. 象牙質片上における hMSC の 2 次元培養

象牙質片に 10%FBS 含有 DMEM と懸濁した hMSC (1.0×10^5 cells/ml) を播種し、2 次元培養を 2 および 4 週間行った。その後、象牙質片を取り出してギムザ染色を行い、実体顕微鏡下で観察した。また走査電子顕微鏡 (SEM、VE-8800、KEYENCE) による観察

も行った。

5. 象牙質片上における hMSC-コラーゲン複合体の培養による分化誘導

象牙質片を 24 穴培養プレート中央に静置した後、2. で作成した hMSC-コラーゲン複合体で象牙質片全体を覆い、10%FBS 含有 DMEM で 4 週間培養した。培養後、象牙質片をホルマリンで固定、脱灰、パラフィン包埋、切片作製後、HE 染色及び免疫染色 (OPN、PCNA 及びインテグリン $\alpha_v\beta_3$) を行い、光学顕微鏡下で観察した。

6. 2次元培養した象牙質片上 hMSC の 3次元培養による分化誘導

象牙質片上で hMSC の 2次元培養を 2週間行った。hMSC を培養した象牙質片を 24 穴培養プレート中央に静置したのち、2. で作成した hMSC-コラーゲン複合体で象牙質片全体を覆い、10%FBS 含有 DMEM 下で 1日、3日および1週間 3次元培養を行い、5. と同様に切片作製後、HE 染色、アザン染色及び免疫染色 (OPN) を行い、光学顕微鏡下で観察した。

【結果と考察】

1. 象牙質片上での hMSC の 2次元培養 2週間後では、象牙質片上に hMSC を広範囲に認めた。SEM による観察では、2週間後 hMSC は広範囲に象牙質表面上で増殖し、さらに 4週間後象牙質片全面を被覆していた。
2. 象牙質片上での 2次元培養 4週間後、HE 染色において、象牙質表面への hMSC-コラーゲン複合体の密着が観察された。しかしながら、hMSC-コラーゲン複合体は薄く、存在している細胞数は少なかった。免疫染色において、コラーゲンゲル中および象牙質表面に存在している hMSC は OPN 陽性反応を示したが、PCNA 及び Integrin $\alpha_v\beta_3$ の明らかな陽性反応は認めなかった。以上のことから、象牙質表面に対し hMSC-コラーゲン複合体は接着する可能性があり、またセメント質関連タンパクの発現によってセメント質形成の可能性も示唆された。
3. 象牙質片上で 2次元培養 2週間を行い、さらにコラーゲンゲル中 3次元培養 3日間行った群では、象牙質と hMSC-コラーゲン複合体が密着している様子が観察され、免疫染色では hMSC と象牙質に OPN の発現が観察された。3次元培養 1週間の群では、HE 及びアザン染色の結果から、象牙質と hMSC-コラーゲン複合体が密着している様子が確認された。

【結論】

象牙質表面上で 3次元培養を行った hMSC-コラーゲン複合体は象牙質と密着し、象牙質界面に OPN を産生し、セメント質形成細胞へと分化し、象牙質表面構造の再生の起点となる可能性が示唆された。