

学位論文

間葉系幹細胞集塊 Clumps of Mesenchymal
stem cell/extracellular matrix (C-MS-C)
を用いた新規歯周組織再生療法の開発

学位申請者 竹脇 学

広島大学大学院 医歯薬総合研究科
創生医科学専攻 歯周病態学分野

(主指導：栗原 英見 教授)

2016 年度

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第 145 回 日本歯科保存学会

(2016 年 10 月 松本)

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導ならびに御高閲を賜りました本学先進医療開発科学講座 歯周病態学分野 栗原 英見 教授に深甚なる感謝の意を表します。また、研究遂行ならびに本論文作成において、御教示、御高閲を賜りました口腔細胞生物学講座 内田 隆 教授、硬組織代謝生物学講座 吉子裕二 教授に深厚なる謝意を表します。さらに、本研究の遂行、および本論文の作成にあたり終始御指導、御助言を頂きました本学大学院応用生命科学部門 歯周病態学研究室 加治屋 幹人 助教に深謝いたします。

また、本研究を進めるに際し多大なる御支持を頂きました本学大学院応用生命科学部門 歯周病態学分野関係各位に感謝いたします。

最後に、勉学、研究の機会を与えると共に、常に私を支えてくれた父、真母、弘美に心から感謝いたします。

2017年1月

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻
応用生命科学部門 歯周病態学分野
竹脇 学

目次

第1章 緒論	6
第2章 イヌ骨髄間葉系幹細胞(dMSCs)による間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSC/ECM complex (C-MSC) の性質	10
第1節 dMSCs による C-MSC の作製	10
第1項 概要	10
第2項 材料と方法	10
1. dMSCs の分離、培養	10
2. イヌ C-MSC の作製	11
3. ヘマトキシリン・エオジン染色	11
4. I型コラーゲンの検出	12
5. アポトーシス細胞の検出	12
第3項 結果	13
第2節 イヌ C-MSC の骨分化誘導	13
第1項 概要	13
第2項 材料と方法	13
1. イヌ C-MSC の骨分化誘導	13
2. ヘマトキシリン・エオジン染色	14
3. カルシウム沈着の検出	14
4. アポトーシス細胞の検出	15
第3項 結果	15
第3節 考察	16

第3章	実験的歯周炎モデルを用いた C-MSCs 移植の効果	17
第1節	概要	17
第2節	材料と方法	17
1.	dMSCs の採取および分離・培養	17
2.	移植体調整法	18
3.	炎症を伴う歯周組織欠損モデルの作製	18
4.	C-MSCs の移植法	18
5.	組織標本作製	19
6.	ヘマトキシリン・エオジン染色	20
7.	Azan 染色	20
8.	組織計測および micro-CT 解析	20
第3節	結果	21
1.	CT 所見および組織観察	21
2.	組織計測および micro-CT 解析	23
第4節	考察	25
第4章	総括	27
第5章	参考文献	29

第1章 緒論

歯周炎は歯周病原細菌の感染とそれに対する宿主の免疫応答の結果、歯周組織の破壊が起こる炎症性の疾患である。歯周炎の進行は、歯を支える歯槽骨の吸収、歯周靭帯の損傷を引き起こす。歯周炎を放置すると歯の喪失に至り咀嚼機能低下、発音・構音障害そして審美障害を招く。また、歯周炎は糖尿病、関節リウマチ、血管疾患、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、低体重児早産など様々な全身疾患の発症や進行に関わっている [1-6]。一般的な歯周治療としてブラッシングやスケーリング・ルートプレーニングによる細菌バイオフィルムの除去、および歯周ポケット搔爬やフラップ手術によって炎症性肉芽組織の除去が行われる。このことによって炎症を軽減させることはできる。しかし、喪失した歯槽骨や歯周靭帯の再生およびその機能を回復することは難しく、歯周炎の再発のリスクは残ったままである。すなわち、破壊された歯周組織には嫌気性の歯周病原細菌に再感染しやすく、慢性炎症が持続する。その結果、歯周病による全身への悪影響も残ったままとなる。したがって、歯周組織再生療法によって破壊された歯周組織の構造および機能を回復することは、口腔の慢性感染・炎症を軽減させるだけでなく全身の健康の維持・促進に極めて重要である。

近年の組織工学の進歩によって、失った組織や臓器を再生するという全く新しい概念の治療が可能になりつつある。組織再生のためには、細胞、足場、シグナル因子の3つの要素が必要である [7]。現在臨床応用されている歯周組織再生療法として、上皮の侵入を抑制することによって内在性の細胞の遊走を助け、再生の足場を提供する Guided Tissue Regeneration (GTR) 法 [8] が広く臨床応用されている。また、サイトカインを用いた歯周組織再生療法として platelet derived growth factor (PDGF)^{13 - 15}、bone morphogenetic protein (BMP) [9, 10]、basic fibroblast growth factor (bFGF) [11, 12] が臨床応用さ

れている。さらに、insulin-like growth factor-I (IGF-I) [13]、transforming growth factor- β (TGF- β) [14]、osteogenic protein-1 (OP-1) [15]、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [16]等のサイトカインを利用した歯周組織再生の基礎研究が行なわれている。サイトカイン療法は、内在性細胞の制御によって再生を促すため[17, 18]、小・中規模の欠損に適している。しかし、大規模歯周組織の欠損では組織再生に関わる細胞の数は少なく、細胞機能の制御も困難であり、十分な再生は期待できない。1 壁性骨欠損や水平性骨吸収など、広範囲にわたる歯周組織破壊が臨床的には多く認められるが、GTR やサイトカイン療法の適応ではない。そのため、歯周組織の大規模な欠損に対する組織再生療法の確立が必要である。歯周組織の大規模な欠損の再生には、再生に関与する細胞を生体外から補充する細胞治療が適していると考えられる。細胞治療の最大の特徴は、生体外で細胞を加工できることである。この特徴を利用すれば、歯周組織欠損の大きさや形態に合わせて細胞を供給することができる。歯周組織はセメント質、歯周靭帯、歯槽骨、歯肉結合組織といった軟組織と硬組織で構成されており、これらの複雑な組織を再生させるために多分化能を有する幹細胞が適していると考えられる。多分化能を持つ細胞として、胚性幹細胞 (embryonic stem cells: ES 細胞) [19]、組織幹細胞、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) [20, 21]が挙げられる。ES 細胞を作製するためにはヒトの卵子が必要であること、また ES 細胞および iPS 細胞は奇形種形成の危険性があり倫理面・安全性の問題から現時点で歯周組織再生に用いるのは困難である。組織幹細胞は腸・皮膚・骨髄・肝臓、大脳や膵臓などの様々な領域に存在し、通常の新陳代謝や創傷治癒において日常的に増殖・分化していると考えられている。特に間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) は骨、軟骨、筋組織、線維、腱、脂肪組織などの間葉組織や神経細胞に分化す

る [22]ことが報告されており、現時点において細胞治療の細胞源として有望視されている。特に、骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells: BMSCs) は臨床においても多く使用されている [23]。

これまでの基礎研究で、骨髄由来の MSCs をアテロコラーゲンゲルと混和してビーグル犬の実験的歯周組織欠損に自家移植したところ、MSCs 移植群は移植後 8 週目で対照のアテロコラーゲン群と比較してセメント質、歯槽骨再生が有意に促進した [24]。また、green fluorescent protein (GFP) を遺伝子導入した MSCs を移植したところ、移植後 4 週目において再生された歯周組織の構成細胞、すなわちセメント芽細胞、骨芽細胞、骨細胞、歯周靭帯中の線維芽細胞が GFP 陽性を示した [25]。この結果から、移植された MSCs が移植部位局所で増殖・分化することで歯周組織再生に関与することが示唆された。

さらにより効率的に骨再生を促すために、MSC と β リン酸三カルシウム (β -TCP) を併用して移植したところ、移植後 4 週目から十分な新生骨の形成が得られた。しかし、移植 8 週以降において、生体内で代謝されずに残存する β -TCP やアンキローシスが散見された [26]。この結果は、担体として用いる人工足場材料の解決すべき問題点を示唆する。たとえば、ハイドロキシアパタイトは骨形成の足場材料として多く用いられているが、生体内で吸収されずに在続し、場合によっては炎症に伴って排出される [27, 28]。また、他の足場材料においても、生体適合性や細胞機能発現の制約等の問題がある [17, 29]。足場は、組織再生に重要な要素であるが、人工的な足場材料を歯周組織再生に用いた場合、様々な問題がある。人工の足場材料を用いない新しい細胞移植治療法が開発されれば、より本来の生体組織に近い効果的な再生医療の実現につながる。

そこで、私たちの研究室では間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex

(C-MSC)を作製した。C-MSC は、自身が産生する細胞外基質を利用して得られる直径約 1mm の三次元的な細胞集塊である。直径約 1mm の規格化された細胞集塊は 3次元化や工業化にも適していると考えられる。C-MSC は立体的に組み合わせることで組織欠損に適合した移植が可能であり、良好な骨再生能を示す[30]。また、C-MSC に *ex vivo* において骨分化誘導をかけることができ、骨再生をより効率的に誘導することを報告してきた[30]。C-MSC にはラット頭蓋骨欠損モデルにおいて骨形成を促進することを確認してきたが、C-MSC が骨だけでなく、セメント質や歯周靭帯を再生するかは確認されていなかった。そこで、本研究では、C-MSC を用いてセメント質、歯周靭帯、歯槽骨から成る歯周組織再生の有効性を調べるために、まずビーグル犬の MSC から C-MSC を作成、その生物学的特徴を検討し、移植に最適な条件を探索した。その後、作製した C-MSC をビーグル犬に作製した実験的歯周炎根分岐部 3 級欠損モデルへ移植し、C-MSC の歯周組織再生能を検討した。

第2章 イヌ骨髄間葉系幹細胞による C-MSCs の性質

第1節 イヌ骨髄間葉系幹細胞による C-MSCs の作製

第1項 概要

In vitro においてイヌ骨髄間葉系幹細胞から C-MSC を作製し、その生物学的性質を検討した。

第2項 材料と方法

1. イヌの MSC の分離、培養

実験には、雌のビーグル犬（12～20 ヶ月齢，体重 10～15 kg，広島実験動物研究所，広島）4頭を用いた。動物実験は広島大学自然科学研究支援開発センター 生命科学研究支援分野・ライフサイエンス教育研究支援部 動物実験施設の実験指針に基づいて行った。

ビーグル犬に塩酸メデトミジン（ドミトール[®]，オリオン社，エスポー市，Finland）による鎮静後、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール[®]，大日本住友製薬，大阪）を腹腔内注射して全身麻酔下で全ての外科的処置を行った。骨髄液は腸骨から小宮式骨髄穿刺針（都北医療機器製作所，東京）およびヘパリンナトリウム（ヘパリン Na 注 5 千単位，持田製薬，東京）1ml を入れた 10 ml ディスポーザブルシリンジ（JMS，広島）を使用して約 4 ml 採取した。採取した骨髄液をすみやかにの 75 cm² フラスコ（容量 250 ml，BD falcon，ニュージャージー）内の培養液 70 ml と混合した。培養液は、10%FBS を含む DMEM

を使用した。培養は 37°C、5%CO₂ 気相条件下で行った。培地交換は 3 日毎に行い、培地交換の際に浮遊細胞を除去し、シャーレに接着した紡錘形の細胞を MSCs として培養した。MSC をサブコンフルエントまで培養し、0.05%トリプシン-0.02%エチレンジアミン四酢酸 (SIGMA) で細胞を回収し、セルバンカー (日本全薬工業、福島) に細胞密度が 1.0×10^6 cells/ml となるように懸濁し、セラムチューブ (住友ベークライト, 東京, Japan) に 1 ml ずつ分注し、-80 °C で一日冷却した後、液体窒素中に保存した。下記の実験には 3 代継代した MSC を用いた。

2. イヌ C-MSCs の作製

MSCs に ECM を産生させ、MSCs/ECM 複合体を形成するために、24well プレートに dMSCs を 7×10^4 cells /well となるように播種し、増殖培地 (DMEM+ 10% FBS) に細胞外基質の産生を促すために 50 μ g/ml のアスコルビン酸を添加したもので 4 日間培養した [31]。その後、MSCs/ECM 複合体をウェルから鈍的に剥離し、細胞をプレートの周囲から剥離して培地中に浮遊させ、浮遊培養用マイクロプレート (AGC テクノグラス、静岡) に移し、さらに増殖培地にて培養すると、浮遊させた膜状の MSC は 1 日後には球状になり、細胞集塊 C-MSC を得た。

細胞を剥離した日を Day0 (細胞シート) とし、1 日後を Day1、5 日後を Day5、10 日後を Day10 とした。Day0 (細胞シート)、1、5、10 に回収し以下の実験に用いた。

3. ヘマトキシリン・エオジン染色

Day0 (細胞シート)、1、5、10 で C-MSC を回収した。回収後 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、通法に従って組織をパラフィンに包埋し、約 5 μ m の厚さに薄切した。パラフィン切片を脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジ

ン (HE) 染色を行った。光学顕微鏡 (ECLIPSE E600W, ニコン, 東京) で観察し、同時にデジタル画像をコンピューター (DS-L3, ニコン) に取り込んだ。

4. I 型コラーゲンの発現

免疫組織化学染色は、OTC コンパウンドに細胞集塊を包埋後、20 μ m で薄切り、切片を PBS で洗浄、0.2%カゼイン・TBS 溶液を用いてブロッキングし、PBS で洗浄後、一次抗体を切片に反応させた。一次抗体として、抗 type I collagen マウスモノクローナル抗体 (1:100 abcam, ケンブリッジ, England) を 4°C で 8 時間反応させた。反応終了後、切片を PBS で洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor[®] 594 抗マウス IgG 抗体 (1:100 Invitrogen, カルフォルニア, USA) を室温で 4 時間反応させた。反応終了後、切片を PBS で洗浄し、DAPI fluoromount-G[®] (southern Biotech, カルフォルニア, USA) で封入した。I 型コラーゲン及び細胞核は、Zeiss LSM 510 laser scanning confocal microscope (Zeiss Microimaging, オーバーコッペン, Germany) を用いて観察した。

5. アポトーシス細胞の検出

パラフィン切片を脱パラフィン後、DeadEnd[™] Fluorometric TUNEL System (Promega, マディソン) を用いてアポトーシス細胞を検出した。細胞核は DAPI solution (同人科学研究所、熊本 1:200) で染色した。アポトーシス細胞及び細胞核は、Zeiss LSM 510 laser scanning confocal microscope (Zeiss Microimaging, Inc.) を用いて観察した。

第3項 結果

光学顕微鏡による観察によって細胞集塊は MSC と自身が産生した豊富な細胞外基質から成ることが確認された (図 1, 2)。また、細胞集塊は経時的に収縮していることも確認された (図 1, 2)。Day で既に球状の細胞集塊となり、イヌの MSC から C-MSC が形成された。共焦点顕微鏡による観察によって、C-MSC の細胞外基質は主に I 型コラーゲンからなることが確認された。(図 1) また、Day10 においても C-MSC の内に多くの細胞の生存が確認された (図 2)。

第2節 イヌ C-MSC の骨分化誘導

第1項 概要

第2章、第1節の結果からイヌ MSC から C-MSC の作製が可能であることが明らかになった。橘高らの報告[30]ではラットの C-MSC は ex-vivo での骨分化誘導が可能であることから、イヌ C-MSC においても ex-vivo での骨分化誘導が可能かを検討した。

第2項 材料と方法

1. イヌ C-MSCs の骨分化誘導

24well プレートに 7×10^4 cells /well となるように MSCs を播種し、増殖培地 (DMEM+ 10% FBS) に $50 \mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸を添加したもので 4 日間培養した。その後、MSCs/ECM 複合体をウェルから鈍的に剥離し、細胞をプレー

トの周囲から剥離して培地中に浮遊させ、浮遊培養用マイクロプレート (AGC テクノガラス、静岡) に移し、さらに増殖培地にて培養すると、浮遊させた膜状の MSC は 1 日後には球状になり、細胞集塊 C-MSC を得た。

浮遊培養用マイクロプレートに移動後、Jaiswal ら [17] の方法に準じて骨分化誘導培地 (標準培地に 0.1 μ M dexamethasone (Sigma), 50 μ g/ml ascorbic acid (Sigma), 10 mM β -glycerophosphate (Sigma) を添加) を用い培養を継続した。培地交換は 2 日毎に行った。剥離した日を Day0 (Cell sheet) とし、1 日後を Day1、5 日後を Day5、10 日後を Day10 とした。Day1、5、10 に回収し以下の実験に用いた。

2. ヘマトキシリン・エオジン染色

第 1 節第 1 項 4 に記載した方法で行った。

3. カルシウム沈着の検出

石灰化物の観察はアリザリンレッド染色によって行った。パラフィン切片を脱パラフィン後、10%アリザリンレッド S 溶液 (和光純薬, 大坂, Japan) で 1 分間染色後、光学顕微鏡で観察し、同時にデジタル画像をコンピューター (DS-L3、NIKON) に取り込んだ。対照群として増殖培地で培養した Day0、1、5、10 のものを用いた (図 2)。沈着したカルシウム量の計測は Calcium E-test (和光純薬) を用いて行った。すなわち、回収した C-MSC を Handy sonic (トミー精工, 東京, Japan) を用いて、0.05% Triton X (ナカライテスク, 京都, Japan) 水溶液中で超音波粉碎し、細胞を溶解、回収し、15,000 rpm で 15 分間遠心、上清を cell lysate とした。5 μ l の cell lysate に緩衝液 (モノエタノールアミン緩衝液

ph12.0) を加え、よく混合し、発色基液 (メチルキシレーノブルー、8-キノリノール) を加え、よく混合した後、蛍光マイクロプレートリーダー (Thermo scientific, 横浜) を用い、波長 610 nm の吸光度を測定した。標準曲線は既知の濃度のカルシウム溶液 (10mg/dl) を用いて作成した。

4. アポトーシス細胞の検出

第 1 節第 1 項 5 に記載した方法で行った。

第 3 項 結 果

Day10 では骨分化誘導培地で培養した C-MS 是基質の部分でエオジンの濃染が観察された。また、C-MS 是経時的に収縮していることも確認された (図 3)。また、アリザリンレッド染色において、Day1、5 においては通常増殖培地で培養したものと明らかな差は見られず、一様に薄く赤い染色像が観察されたが、Day10 においてカルシウムの存在を示す赤く濃染した部分が観察された。

共焦点顕微鏡による観察で、骨分化誘導培地によって培養した C-MS 中には、Day10 においてアポトーシス細胞数が増加していた (図 3)。

カルシウム量については、通常培地で培養したものでは Day10 においてもカルシウム量は Day1、5 と有意な差は認められなかった。一方、骨分化誘導培地で培養した C-MS 是、Day1、5 ではカルシウム量にあきらかな上昇は見られなかったが、Day10 において有意にカルシウム量の上昇を認めた (図 4)。

第3節 考察

本研究の結果、dMSCにおいてもC-MSCの作製が可能であることが明らかになった。さらに、イヌC-MSCにおいてもex-vivoでの骨分化誘導が可能であることも明らかとなった。本実験は、ビーグル犬根分岐部3級欠損に移植するC-MSCの条件検討も兼ねており、今回の結果から、当初は歯周組織の中で最も再生が遅いと考えられる歯槽骨再生には十分に骨分化誘導が施された骨分化誘導培地で培養したDay10のC-MSCが適当であると考えられた。しかし、橘高らの報告[30]では、10日間骨分化誘導培地で培養したC-MSCs移植では大規模欠損での骨形成は失敗したとあり、その理由として、多数のアポトーシス細胞を認めたことや、生体外でのC-MSCの骨分化誘導は石灰化誘導であり、生物学的な骨芽細胞分化ではない可能性を挙げている。そこで、石灰化は十分に進んでいないが、骨芽細胞分化がある程度進み、セメント芽細胞や歯周靭帯細胞に分化可能な未分化なdMSCを含んでいると考えられるDay5を移植することとした。また、増殖培地で5日間培養したC-MSCも移植することとした。

第 2 章 実験的歯周炎モデルを用いた C-MSCs 移植の歯周組織再生促進効果

第 1 節 概要

前章の結果から C-MSC は骨分化能があると考えられる。これまでにラットの頭蓋骨欠損モデルで C-MSCs 移植は従来のアテロコラーゲンと MSC 複合体の移植よりも良好な骨再生能を示した。さらに、骨分化誘導した C-MSCs 移植がラットの頭蓋骨大規模欠損モデルにおいて他の MSC 移植法と比較して最も効果的に骨を再生することが報告されている。

しかし、C-MSC が骨だけでなく、セメント質や歯周靭帯などの硬組織と軟組織から成る複雑な歯周組織を再生するかは明らかになっていない。そこで、C-MSCs 移植が歯周組織再生を促進すると仮説を立て、ビーグル犬を用いた実験的歯周炎根分岐部 3 級欠損モデルを用いて、C-MSCs 移植の歯周組織再生促進効果について検討した。

第 2 節 材料と方法

1. 間葉系幹細胞の採取および分離・培養

第 1 節第 2 項 1 に記載した方法で間葉系幹細胞の採取および分離・培養を行った。凍結した細胞は移植実験直前に解凍し、必要量の細胞数が得られるまで上述と同様の方法で細胞培養を行った。

2. 移植体調製方法

必要な数の dMSC が得られたところで細胞を回収し、第 1 節第 2 項 3 に記載した方法で C-MSC を作製した。

移植には増殖培地で 5 日間培養して得た C-MSCs(以下 C-MSCs)、骨分化誘導培地で 5 日間培養して得た C-MSCs(以下 OIM-C-MSCs)を用いた。

C-MSCs および OIM-C-MSCs は MSC を採取した同一個体に移植した。また、コントロールとして何も移植しない非移植群（以下 NONE）を設けた。

3. 炎症を伴う歯周組織欠損モデルの作製

永原らの方法[26]に基づいてビーグル犬の下顎第二、第三、第四小臼歯に歯周組織欠損を作製し、炎症を惹起させた。ビーグル犬をドミトール®を用いて鎮静させた後、ネンプター®を腹腔内注射して全身麻酔下で処置し、局所浸潤麻酔キシロカイン®(デンツプライ三金, 栃木)にて浸潤麻酔後、第一小臼歯から第四小臼歯にかけて歯肉溝切開を行い、歯肉弁を剥離した。第二、第三、第四小臼歯の根分岐部歯槽骨をラウンドバー、ハンドスケーラーを用いて削除した。欠損の高さを歯槽骨頂から約 4 mm と規格化し、頬舌的に貫通した歯周組織欠損を作製した。この欠損部に感染・炎症を惹起するために、アルジネート印象材(モリタ, 東京)を填入した後(図 5)、歯肉弁を緊密に縫合し、1 週間放置した。

4. C-MSCs および OIM-C-MSCs の移植

欠損作製 1 週間後、全身麻酔下で再び歯肉弁を剥離しアルジネート印象材を除去した。その後ハンドスケーラーを用いて露出している全ての歯根面のスケーリング・ルートプレーニングを行い、欠損部を生理食塩水で洗浄した後、歯肉弁を元に戻して縫合した。以後、毎週のブラッシングによるプラークコント

ロールを行い、歯肉の炎症をコントロールした。移植手術は上記した郭清処置の1週間後に行った。全身麻酔下で歯肉弁を剥離し、露出している全ての歯根面を再度スケーリング・ルートプレーニングした後に、欠損部を生理食塩水で洗浄した。削除した骨面の最も歯根面寄りにラウンドバーでノッチを形成し基点とした。そして、欠損部に48個のC-MSCsあるいはOIM-C-MSCsを移植した(図5b)。1カ所あたりに移植したMSCの数は約1,000万と推計される。非移植群では欠損部に何も移植せず、緊密に縫合した。

5. 組織標本作製

経過観察期間は移植手術後8、12週間とした。ビーグル犬はネンブタール®の腹腔内注射で全身麻酔下に置き、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。灌流固定後に下顎骨を摘出し、実験部位を含むようトリミングした後、1日間同固定液で浸漬固定し、KCX® (FALMA, 東京) で約4週間脱灰した。脱灰後、通法に従って組織をパラフィンに包埋し、近遠心方向に歯軸と平行に5 μm の厚さに薄切した。

6. micro CT 解析法

浸漬固定後の下顎骨をPBSで洗浄後、micro CT (Skyscan 1176, Bruker, Kontich, Belgium)で撮影し、新生骨量をCT解析ソフトCT-Analyser (Bruker)で解析した。

7. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色法

パラフィン切片を脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。光学顕微鏡 (ECLIPSE E600W, ニコン, 東京) で観察し、同時にデジタル画像をコンピューターに取り込んだ。

8. Azan 染色法

パラフィン切片を脱パラフィン後、10%トリクロロ酢酸・重クロム酸カリウム混合液 (ナカライテスク) で 10 分間前処理した後、オレンジ G (ナカライテスク) にて 15 分間染色した。その後、アゾカミン G (ナカライテスク) で 15 分間染色した。切片をアニリンエタノールと 1%酢酸エタノールで洗浄した後、5%リントングステン酸水溶液 (ナカライテスク) に 3 分間浸漬した。さらに、切片をアニリン青 (ナカライテスク) で 5 分間浸漬し染色した。すべての操作は室温で行った。

9. 組織計測

骨再生率は切片上の欠損作製面積に対する再生した骨の面積の百分率とした。なお、健常な歯周組織では、歯周靭帯が存在するため骨再生率の最大値は約 80 %となる。セメント質再生率は裸出させた根面の全長に対する再生したセメント質が観察された部分の長さの総和の百分率とした。組織計測は画像解析ソフト Image J (NIH, NY) を用いて行った。計測は非移植群 (NONE) ,C-MSCs 移植群 (C-MSCs)、OIM-C-MSCs 移植群 (OIM-C-MSCs) それぞれ欠損部位 3 箇所 (頬側、中央、舌側) の切片で行い、平均値で評価した。

3. 結果

1. CT 所見および組織観察

1) 移植後 8 週目

CT 断面像から構築した 3D モデル像では、非移植群では分岐部直下の骨欠損部位でエックス線透過像を認めた (図 6A)。一方、C-MSCs 移植群および OIM-C-MSCs 移植群では歯根面に沿って、歯槽骨の輪郭を形成するようなエックス線不透過像が見られた (図 6B,C)。しかし、C-MSCs 移植群および OIM-C-MSCs 移植群においても欠損中央部ではエックス線透過像が見られた (図 6B,C)。さらに、CT の矢状断像では、非移植群では、エックス線不透過像は欠損底からわずかにしか見られなかったが、C-MSCs 移植群および OIM-C-MSCs 移植群では根分岐部直下においてもエックス線不透過像が見られた (図 7B,C)。また、OIM-C-MSCs 移植群では C-MSCs 移植群より明瞭な、歯槽硬線を認めた (図 7C)。

HE 染色像では、非移植群において歯槽骨の再生は欠損底からわずかに見られたのみで、根分岐部直下に上皮の侵入が観察され、結合組織は高度な炎症性細胞浸潤を伴っていた (図 8A,9)。セメント質・歯周靭帯の再生は一部に限局していた (図 9)。一方、C-MSCs 移植群では、欠損底からではなく、歯根面に沿って歯槽骨の輪郭を形成するような歯槽骨の再生が観察された (図 8B)。また、上皮の侵入は認められず (図 8B,10a)、Azan 染色標本では再生したセメント質の部分が濃染され、再生セメント質に埋入する多量のコラーゲン線維が象牙質表面から歯周靭帯のスペースへ走行していた (図 10a)。欠損中央に存在する歯槽骨の再生が見られない部位においても、幼若な骨様組織と炎症性細胞が観察された (図 10c)。また、既存の歯槽骨と非連続的に新生骨が認められる部位も存在し、これら新生骨は連続切片の観察でも既存の歯槽骨とは独立していた (図 10b)。

OIM-C-MSCs 移植群における歯槽骨再生も、C-MSCs 移植群と同様に欠損底からではなく、歯根面に沿って歯槽骨の輪郭を形成するように観察されたが、新生骨の量は OIM-C-MSCs 移植群の方が有意に多かった(図 19a,20a)。また、上皮の侵入は認められず(図 8C,11a)、Azan 染色標本では再生したセメント質の部分が濃染され、再生セメント質に埋入する多量のコラーゲン線維が象牙質表面から歯周靭帯のスペースへ走行していた (図 11a')。欠損中央に存在する歯槽骨の再生が見られない部位において、C-MSCs 移植群同様に幼若な骨様組織と、炎症性細胞が観察された(図 11b)。

2) 移植後 12 週目

CT 断面像から構築した 3D モデル像では、非移植群では分岐部直下の骨欠損部位でエックス線透過像を認めた (図 12A)。一方、C-MSCs 移植群および OIM-C-MSCs 移植群では移植 8 週間目ではエックス線透過像が見られた欠損中央においてもエックス線不透過像が見られた (図 12B,C)。さらに、CT の矢状断像では、非移植群では、歯槽骨の再生は欠損底からわずかにしか見られなかったが、C-MSCs 移植群および OIM-C-MSCs 移植群では欠損全体において骨様のエックス線不透過像が見られた (図 13B,C)。

HE 染色像では、非移植群において歯槽骨の再生は欠損底からわずかに見られたのみで、根分岐部直下に上皮の侵入が観察され、結合組織は高度な炎症性細胞浸潤を伴っていた(図 14A,15a)。セメント質・歯周靭帯の再生は一部に限局していた (図 14A,15b)。一方、C-MSCs 移植群、OIM-C-MSCs 移植群では、移植 8 週間後で骨再生が見られなかった欠損中央においても歯槽骨の再生が観察され(図 14B)、欠損部位の全体で歯周組織の再生が観察された(図 16,17)。

2. 組織計測および CT 解析

歯槽骨再生率およびセメント質再生率を計測した。移植後 8 週目の非移植群は 4 歯、C-MSCs 移植群は 4 歯、OIM-C-MSCs 移植群は 4 歯、移植後 12 週目の非移植群は 4 歯、C-MSCs 移植群は 4 歯、OIM-C-MSCs 移植群は 4 歯で、一歯につき頬側、中央、舌側各 1 つ、合計 3 つの切片で評価した。

セメント質再生率は、移植後 8 週目の非移植群では $56.8 \pm 4.1\%$ 、C-MSCs 移植群では $90.5 \pm 13.7\%$ 、OIM-C-MSCs 移植群では $97.6 \pm 1.2\%$ であり、C-MSCs、OIM-C-MSCs 移植群で非移植群よりも有意に高かった ($p < 0.01$) (図 18a)。移植後 12 週目のセメント質再生率は非移植群では $59.5 \pm 13.4\%$ 、C-MSCs 移植群で $96.2 \pm 3.0\%$ 、OIM-C-MSCs 移植群では $98.2 \pm 0.8\%$ であり、C-MSCs、OIM-C-MSCs 移植群で非移植群よりも有意に高かった ($p < 0.05$) (図 18b)。

歯槽骨再生率は、移植後 8 週目の非移植群では $27.6 \pm 12.2\%$ 、C-MSCs 移植群では $42.7 \pm 11.5\%$ 、OIM-C-MSCs 移植群では $63.4 \pm 8.8\%$ であり、非移植群と比較すると OIM-C-MSCs 移植群で有意に高かった ($p < 0.01$) (図 19a)。また、C-MSCs 移植群と比較しても OIM-C-MSCs 移植群で有意に高かった ($p < 0.05$) (図 19a)。しかし、この解析では非移植群と C-MSCs 移植群で有意な差は見られなかった (図 19a)。また、移植後 12 週目の歯槽骨再生率は、非移植群では $21.5 \pm 10.1\%$ 、C-MSCs 移植群で $66.2 \pm 1.0\%$ 、OIM-C-MSCs 移植群では $75.2 \pm 1.8\%$ であり、非移植群と比較し C-MSCs、OIM-C-MSCs 移植群で有意に高かった ($p < 0.01$) (図 19b)。また、CT のエックス線不透過部を石灰化した骨とした場合の再生率は、移植後 8 週目の非移植群では $5.2 \pm 5.0\%$ 、C-MSCs 移植群では $14.2 \pm 3.3\%$ 、OIM-C-MSCs 移植群では $19.9 \pm 1.5\%$ であり、非移植群と比較すると OIM-C-MSCs 移植群で有意に高かった ($p < 0.01$) (図 20a)。また、組織計測では有意な差が見られなかった非移植群と C-MSCs 移植群においても、

非移植群と比べ C-MSCs 移植群で有意に多くの石灰化した骨が見られた ($p<0.05$) (図 20a) 。また、移植後 12 週目の石灰化した骨の再生率は、非移植群では $19.4\pm 8.8\%$ 、C-MSCs 移植群で $38.5\pm 2.8\%$ 、OIM-C-MSCs 移植群では $45.8\pm 6.6\%$ であり、非移植群と比較し C-MSCs、OIM-C-MSCs 移植群で有意に高かった(C-MSCs $p<0.05$ 、OIM-C-MSCs $p<0.01$) (図 20b) 。

第4節 考察

本研究では、C-MSCを用いた歯周組織再生療法の有効性を調べるために、ビーグル犬を用いた実験的歯周炎根分岐部3級欠損モデルにC-MSCsを移植し、その歯周組織再生促進能を評価した。上皮が侵入した部分においてセメント質の再生が見られなかったことから、上皮の侵入防止はC-MSCの移植においても歯周靭帯の埋入したセメント質再生に重要であることが確認された。さらに、上皮の侵入した非移植群では歯槽骨再生も見られなかった。一方、上皮の侵入が見られなかったC-MSC、OIM-C-MSC移植群では経時的に骨の再生促進を認めたことから、上皮の侵入防止は、C-MSCの移植においても歯槽骨の再生にも重要であることが示唆された。これは、これまでのMSCとアテロコラーゲン[24]、 β -TCPとMSC[26]の移植の結果と一致しており、早期にセメント質、歯周靭帯の再生、そして再生セメント質へのコラーゲン線維の埋入、すなわち新付着を得ることが歯周組織再生にとって重要であることを示唆している。また、C-MSCの移植8週間後の再生骨量は、従来のHE染色の組織像を用いた計測方法では有意な差は見られなかった。しかし、成熟した骨と考えられる石灰化した骨の再生率をエックス線透過性で置き換えて調べるためにmicro-CT撮影及びCTを用いた計測も行った。この計測方法は、従来の髓腔も含めた骨再生の計測方法より定量性が高く、石灰化した部分のみ計測可能であることから、成熟した骨の計測に大変有用な新規の計測方法であると考えられる。CTを用いた石灰化再生骨量を計測した結果C-MSCs、OIM-C-MSCs移植群間で、OIM-C-MSCs移植群に有意に多くの再生骨を認めた。これは、OIM-C-MSCs移植群では、C-MSCs移植群と比べ、より早期に多くの骨芽細胞様細胞を供給できたことによるものと考えられる。また、C-MSCs移植では、従来報告して

きた MSC とアテロコラーゲン移植による再生過程とは異なり、移植 8 週間後で歯槽骨欠損底から離れた分岐部直下の歯根面付近から骨の再生が観察された。

これまでも MSC 移植の足場材料に β -TCP を用いたもので歯根面に沿って輪郭を形成するような歯槽骨の再生が報告されている。

C-MSCs はアテロコラーゲンと MSC の複合体よりも形態保持性が高く、変形しにくい。 β -TCP や C-MSCs 移植では、アテロコラーゲンと MSC よりも多くの細胞を欠損底部から離れた分岐部直下に保持することができた。そのために分岐部直下の歯根面においても早期に歯槽骨再生が見られたと考えられる。また、MSC 自身が産生した細胞外基質、特に I 型コラーゲンは、骨を構成する主要な基質であり、骨組織の再生において重要である [32]。抗原性を低下させるために主要な抗原提示部位であるテロペプチドを除去したアテロコラーゲンと異なり、コラーゲン同士の架橋の際に重要な働きをするテロペプチドを保持していると考えられる C-MSC の I 型コラーゲンは骨組織の再生にアテロコラーゲンよりも有用であると考えられる。さらに、歯根面付近より骨再生が遅延した欠損中央部においても経時的に骨の再生を認めたことから、初期に歯槽骨の輪郭を形成する C-MSC が有する骨再生機序も歯周組織再生に重要であると示唆された。

臨床応用を想定した場合、初期に歯槽骨の輪郭を形成するような骨再生は、大規模な歯周組織欠損で有用であると考えられるが、大規模欠損への適応には、C-MSC を再生する組織に応じて分化を誘導し、欠損形態に応じて結合させ 3D 化し、一塊として移植するなど、移植方法自体のさらなる工夫が必要であると考えられる。

第四章 総括

C-MSc を用いた歯周組織再生療法を確立させるために、ビーグル犬を用いた実験的歯周炎根分岐部 3 級欠損モデルに C-MSc を移植し、その歯周組織再生促進能を評価した。すなわち、ビーグル犬の MSc による C-MSc の作製方法を樹立し、その生物学的性質を組織観察で検討し、*ex vivo* での石灰化能の有無を調べ、以下の結果を得た。

- 1) C-MSc は MSc と豊富な I 型コラーゲンからなる。
- 2) C-MSc は中心部においても細胞が生存している。
- 3) C-MSc は骨分化誘導培地で培養することでカルシウムの沈着が起こり、石灰化誘導が可能であることを示唆した。
- 4) C-MSc を石灰化誘導培地で長期間培養すると、アポトーシス細胞の増加が観察された。

さらに、上記の方法で移植に最適な C-MSc の条件を検討し、未分化な C-MSc および骨分化誘導を施した OIM-C-MSc を移植し、実験的歯周炎根分岐部 3 級欠損モデルに対する歯周組織再生促進効果を評価して以下の結果を得た。

- 1) 移植 8 週間後において、C-MSc、OIM-C-MScs 移植群ともにセメント質と歯周靭帯の再生が観察された。
- 2) 移植 8 週間後において、C-MSc、OIM-C-MScs 移植群ともに歯根面に沿って歯槽骨の輪郭を形成するような歯槽骨再生が観察された。

3) 移植 8 週間後において、OIM-C-MSCs 移植群において C-MSCs 移植群より有意に多くの歯槽骨再生が観察された。

4) 移植 12 週間後において、C-MSCs、OIM-C-MSCs 移植群ともに十分な歯周組織の再生が観察された。

5) 移植 12 週間後において、OIM-C-MSCs 移植群と C-MSCs 移植群では再生した歯槽骨量に有意な差は認めなかった。

以上の結果から、C-MSC、OIM-C-MSC ともにビーグル犬根分岐部 3 級欠損モデルにおいて歯周組織再生を促進することが確認された。本研究は C-MSC の歯周組織再生促進能を確認した初めての研究であり、C-MSCs 移植が歯周組織再生を目的とした細胞移植治療に有用であることが示唆された。

参考文献

- [1] B.L. Pihlstrom, B.S. Michalowicz, N.W. Johnson, Periodontal diseases, *Lancet* 366(9499) (2005) 1809-20.
- [2] L.C. Kuo, A.M. Polson, T. Kang, Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis, *Public Health* 122(4) (2008) 417-33.
- [3] D.G. Bassani, M.T. Olinto, N. Kreiger, Periodontal disease and perinatal outcomes: a case-control study, *J Clin Periodontol* 34(1) (2007) 31-9.
- [4] P.M. Bartold, R.I. Marshall, D.R. Haynes, Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review, *J Periodontol* 76(11 Suppl) (2005) 2066-74.
- [5] F.A. Scannapieco, R.B. Bush, S. Paju, Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review, *Ann Periodontol* 8(1) (2003) 38-53.
- [6] M. Yoneda, S. Naka, K. Nakano, K. Wada, H. Endo, H. Mawatari, K. Imajo, R. Nomura, K. Hokamura, M. Ono, S. Murata, I. Tohnai, Y. Sumida, T. Shima, M. Kuboniwa, K. Umemura, Y. Kamisaki, A. Amano, T. Okanoue, T. Ooshima, A. Nakajima, Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease, *BMC Gastroenterol* 12 (2012) 16.
- [7] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue engineering, *Science* 260(5110) (1993) 920-6.
- [8] M. Christgau, N. Bader, A. Felden, J. Gradl, A. Wenzel, G. Schmalz, Guided tissue regeneration in intrabony defects using an experimental bioresorbable polydioxanon (PDS) membrane. A 24-month split-mouth study, *J Clin Periodontol* 29(8) (2002) 710-23.
- [9] U.M. Wikesjö, A.V. Xiropaidis, R.C. Thomson, A.D. Cook, K.A. Selvig, W.R. Hardwick, Periodontal repair in dogs: rhBMP-2 significantly enhances bone formation under provisions for guided tissue regeneration, *J Clin Periodontol* 30(8) (2003) 705-14.
- [10] N.M. Blumenthal, G. Koh-Kunst, M.E. Alves, D. Miranda, R.G. Sorensen, J.M. Wozney, U.M. Wikesjö, Effect of surgical implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a bioabsorbable collagen sponge or calcium phosphate putty carrier in intrabony periodontal defects in the baboon, *J Periodontol* 73(12) (2002) 1494-506.
- [11] M. Kitamura, K. Nakashima, Y. Kowashi, T. Fujii, H. Shimauchi, T. Sasano, T. Furuuchi, M. Fukuda, T. Noguchi, T. Shibutani, Y. Iwayama, S. Takashiba, H. Kurihara, M. Ninomiya, J. Kido, T. Nagata, T. Hamachi, K. Maeda, Y. Hara, Y. Izumi, T. Hirofuji, E. Imai, M. Omae, M. Watanuki, S. Murakami, Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial, *PLoS One* 3(7) (2008) e2611.

- [12] S. Takayama, S. Murakami, Y. Miki, K. Ikezawa, S. Tasaka, A. Terashima, T. Asano, H. Okada, Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells, *J Periodontal Res* 32(8) (1997) 667-75.
- [13] S.E. Lynch, R.C. Williams, A.M. Polson, T.H. Howell, M.S. Reddy, U.E. Zappa, H.N. Antoniades, A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration, *J Clin Periodontol* 16(8) (1989) 545-8.
- [14] S. Mohammed, A.R. Pack, T.B. Kardos, The effect of transforming growth factor beta one (TGF-beta 1) on wound healing, with or without barrier membranes, in a Class II furcation defect in sheep, *J Periodontal Res* 33(6) (1998) 335-44.
- [15] W.V. Giannobile, S. Ryan, M.S. Shih, D.L. Su, P.L. Kaplan, T.C. Chan, Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects, *J Periodontol* 69(2) (1998) 129-37.
- [16] K. Takeda, H. Shiba, N. Mizuno, N. Hasegawa, Y. Mouri, A. Hirachi, H. Yoshino, H. Kawaguchi, H. Kurihara, Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration, *Tissue Eng* 11(9-10) (2005) 1618-29.
- [17] S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay, Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends Biotechnol* 30(10) (2012) 546-54.
- [18] M.D. Treiser, E.H. Yang, S. Gordonov, D.M. Cohen, I.P. Androulakis, J. Kohn, C.S. Chen, P.V. Moghe, Cytoskeleton-based forecasting of stem cell lineage fates, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(2) (2010) 610-5.
- [19] J.A. Thomson, V.S. Marshall, Primate embryonic stem cells, *Curr Top Dev Biol* 38 (1998) 133-65.
- [20] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126(4) (2006) 663-76.
- [21] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell* 131(5) (2007) 861-72.
- [22] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284(5411) (1999) 143-7.
- [23] C. Colnot, Cell sources for bone tissue engineering: insights from basic science, *Tissue Eng Part B Rev* 17(6) (2011) 449-57.
- [24] H. Kawaguchi, A. Hirachi, N. Hasegawa, T. Iwata, H. Hamaguchi, H. Shiba, T. Takata, Y. Kato, H. Kurihara, Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells, *J Periodontol* 75(9) (2004) 1281-7.
- [25] N. Hasegawa, H. Kawaguchi, A. Hirachi, K. Takeda, N. Mizuno, M. Nishimura, C.

- Koike, K. Tsuji, H. Iba, Y. Kato, H. Kurihara, Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects, *J Periodontol* 77(6) (2006) 1003-7.
- [26] T. Nagahara, S. Yoshimatsu, H. Shiba, H. Kawaguchi, K. Takeda, T. Iwata, N. Mizuno, T. Fujita, H. Kurihara, Introduction of a mixture of β -tricalcium phosphate into a complex of bone marrow mesenchymal stem cells and type I collagen can augment the volume of alveolar bone without impairing cementum regeneration, *J Periodontol* 86(3) (2015) 456-64.
- [27] K.W. Liechty, T.C. MacKenzie, A.F. Shaaban, A. Radu, A.M. Moseley, R. Deans, D.R. Marshak, A.W. Flake, Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep, *Nat Med* 6(11) (2000) 1282-6.
- [28] H.A. Hoogendoorn, W. Renooij, L.M. Akkermans, W. Visser, P. Wittebol, Long-term study of large ceramic implants (porous hydroxyapatite) in dog femora, *Clin Orthop Relat Res* (187) (1984) 281-8.
- [29] R.O. Oreffo, J.T. Triffitt, Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics, *Bone* 25(2 Suppl) (1999) 5S-9S.
- [30] M. Kittaka, M. Kajiya, H. Shiba, M. Takewaki, K. Takeshita, R. Khung, T. Fujita, T. Iwata, T.Q. Nguyen, K. Ouhara, K. Takeda, H. Kurihara, Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration, *Cytotherapy* 17(7) (2015) 860-73.
- [31] K.M. Choi, Y.K. Seo, H.H. Yoon, K.Y. Song, S.Y. Kwon, H.S. Lee, J.K. Park, Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation, *J Biosci Bioeng* 105(6) (2008) 586-94.
- [32] D.J. Leeming, K. Henriksen, I. Byrjalsen, P. Qvist, S.H. Madsen, P. Garnero, M.A. Karsdal, Is bone quality associated with collagen age?, *Osteoporos Int* 20(9) (2009) 1461-70.

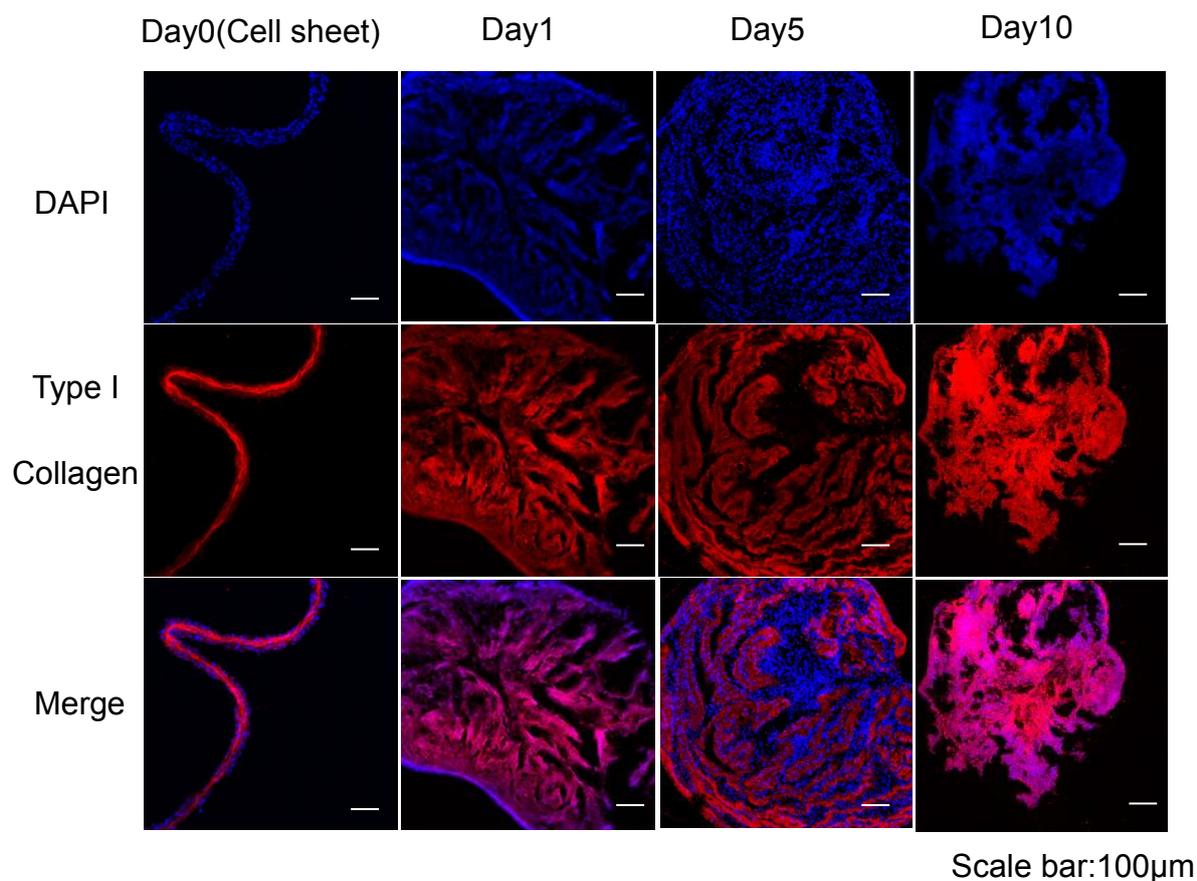


図1. C-MSC における I 型コラーゲンの発現

増殖培地で培養した C-MSC の Day0(Cell sheet)、1、5、10 を回収、通法に従い OTC コンパウンドに包埋し、 $20\mu\text{m}$ で薄切し、I 型コラーゲンの蛍光染色を行った結果を示す。青. DAPI(細胞核)、赤. I 型コラーゲン。

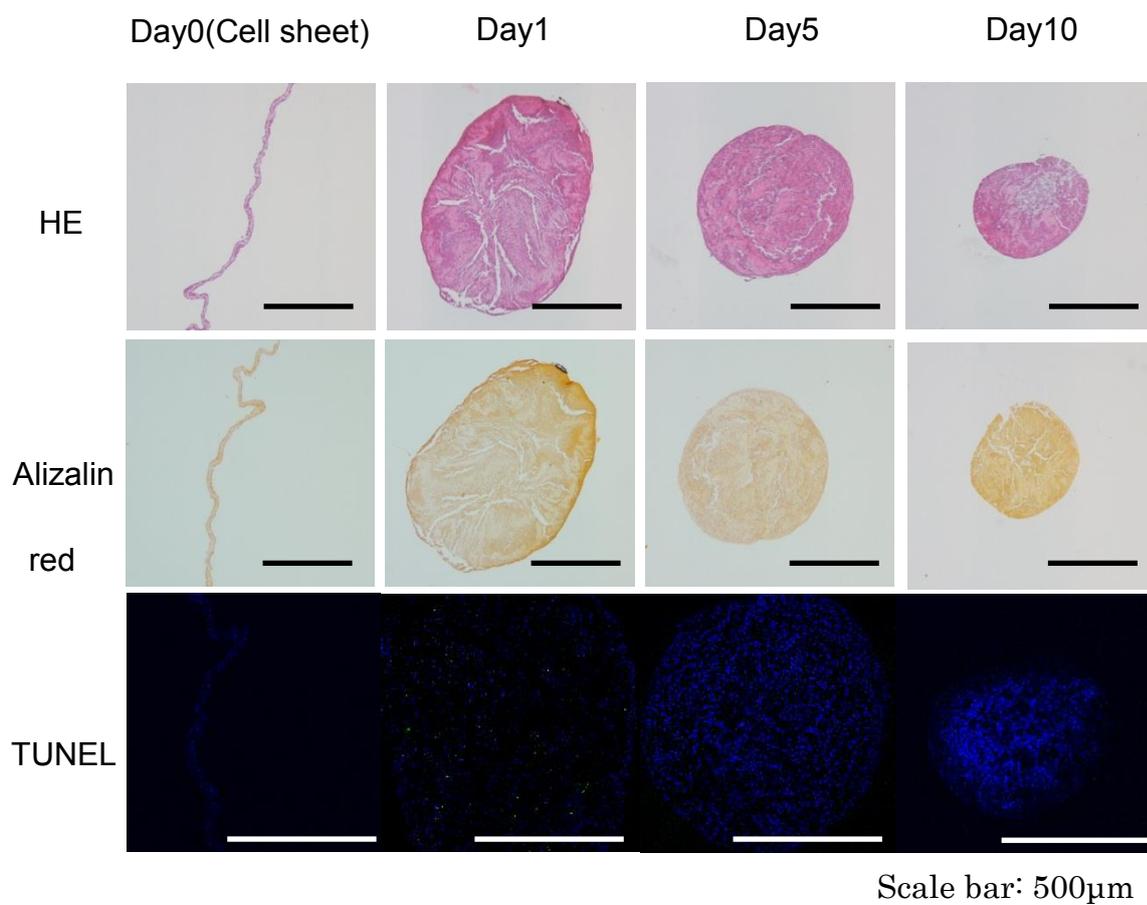


図2. C-MSC の組織像

増殖培地で培養した C-MSC の Day0(Cell sheet)、1、5、10 を回収、通法に従いパラフィン包埋し、5 μ m で薄切し、HE 染色、アリザリンレッド染色、アポトーシス細胞の蛍光染色 (TUNEL 染色) を行った結果を示す。HE 染色、アリザリンレッド染色 ($\times 100$)。TUNEL 染色は青. DAPI(細胞核)、緑. アポトーシス細胞 ($\times 100$)。

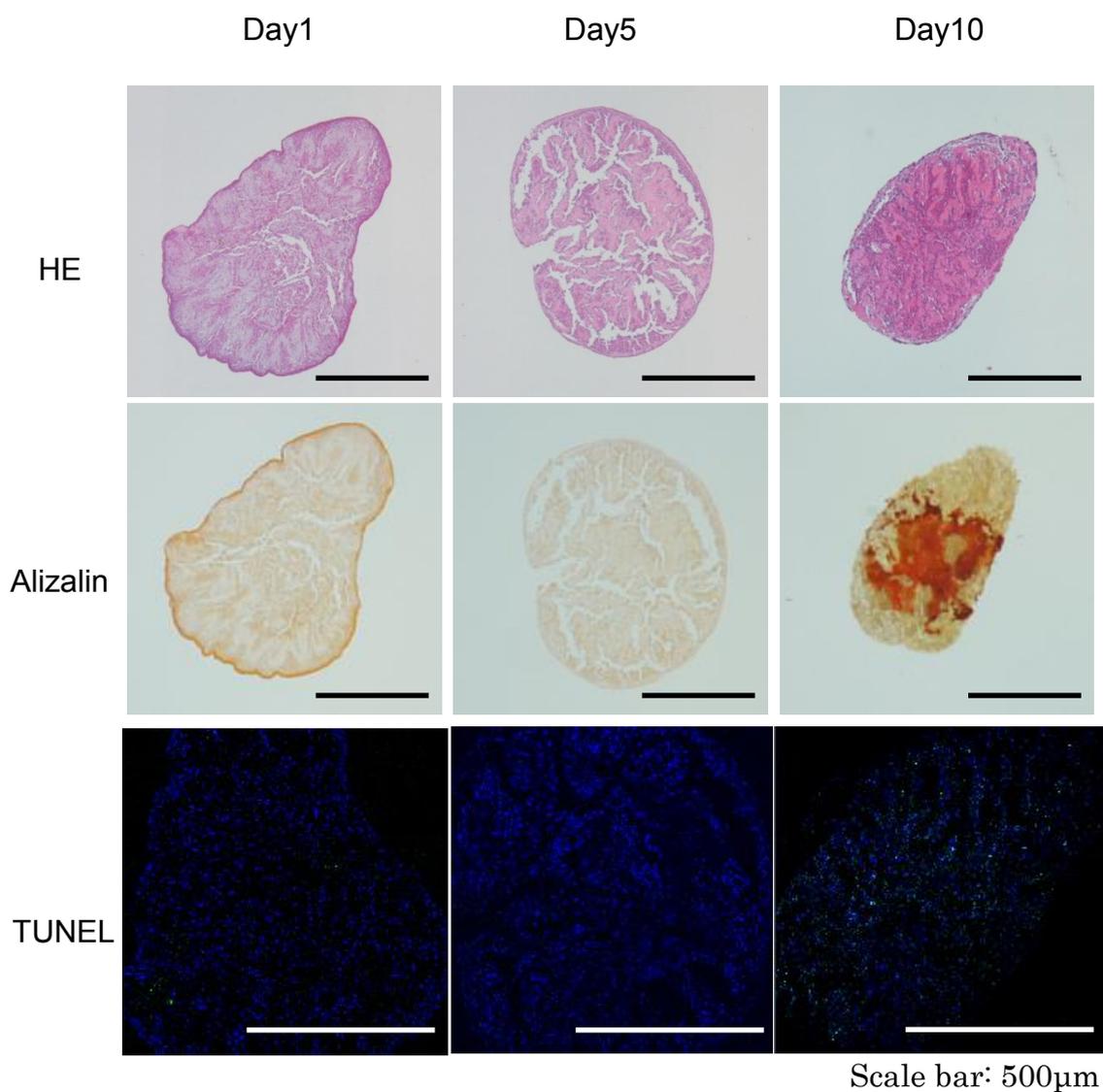


図 3. 骨分化誘導 C-MSC の組織像

骨分化誘導培地で培養した C-MSC の Day1、5、10 を回収、通法に従いパラフィン包埋し、5 μ m で薄切し、HE 染色、アリザリンレッド染色、アポトーシス細胞の蛍光染色 (TUNEL 染色) を行った結果を示す。HE 染色、アリザリンレッド染色 ($\times 100$)。TUNEL 染色は青. DAPI(細胞核)、緑. アポトーシス細胞 ($\times 100$)。

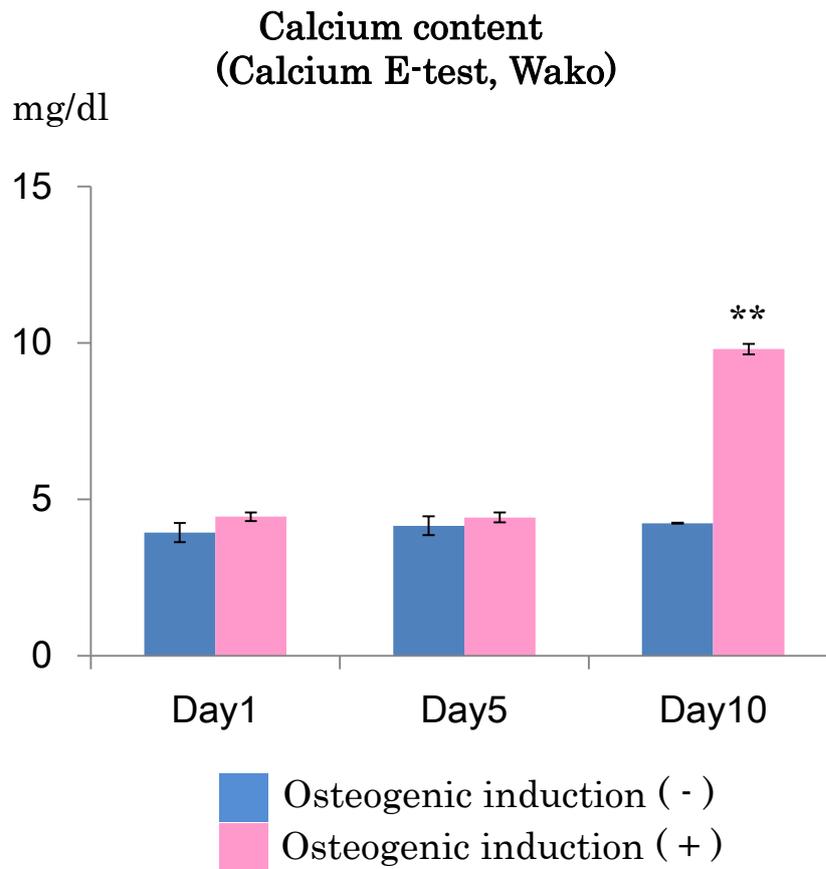


図 4. 石灰化誘導 C-MSC のカルシウム量

増殖培地と石灰化誘導培地で培養した C-MSC の Day1、5、10 を回収、上清を用いてカルシウムの量を計測した結果を示す。** $p < 0.01$ (*student-t*)。

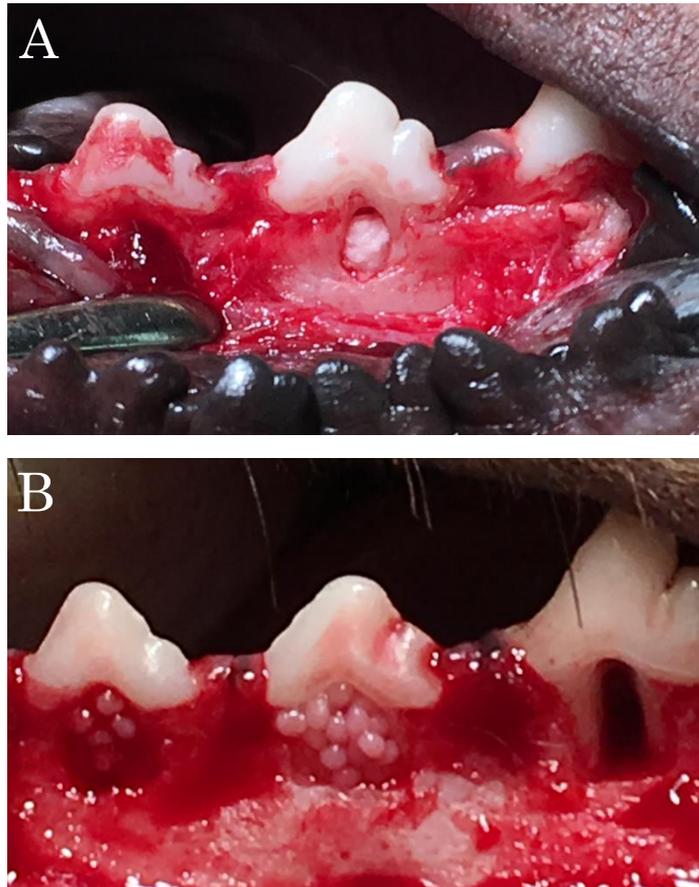


図5 炎症を伴う歯周組織欠損の作製およびMSCの移植

A. アルジネート印象材の填入。B. C-MSCの移植。左から第2小臼歯、第3小臼歯、第4小臼歯。それぞれC-MSC、OIM-C-MSC、NONE(非移植群)。C-MSC、OIM-C-MSCはそれぞれ48個を1つの欠損に移植した。

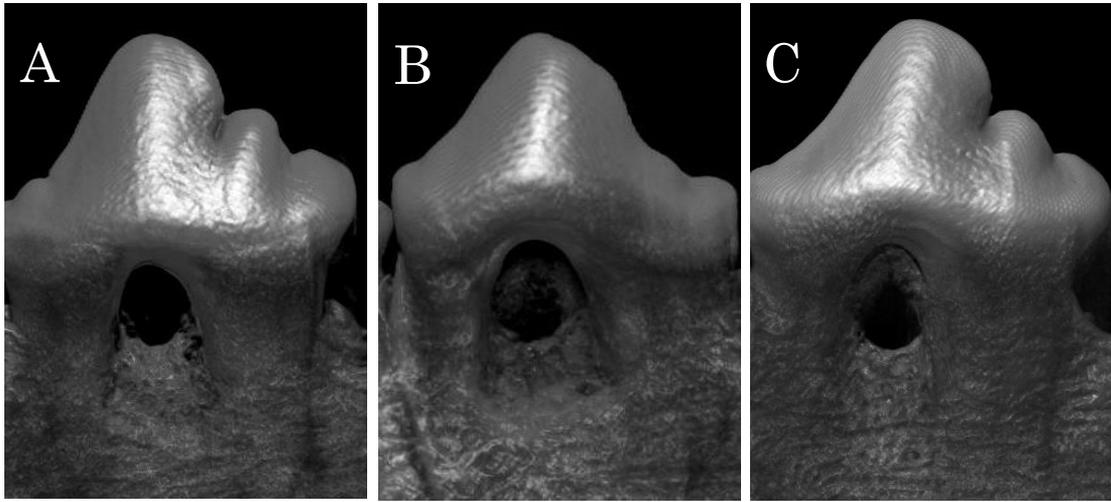


図6 移植8週間後の3D構築像

A. 非移植群、B. C-MSK 移植群、C. OIM-C-MSK 移植群。

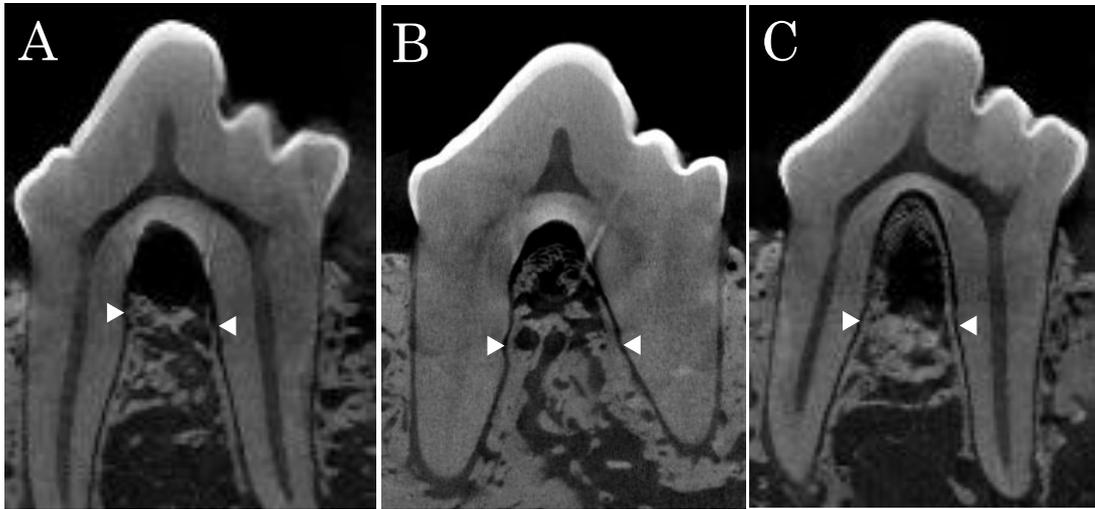


図7 移植8週間後のCTの矢状断像

A. 非移植群、B. C-MSC 移植群、C. OIM-C-MSC 移植群。白矢頭はノッチの最下点を示す。

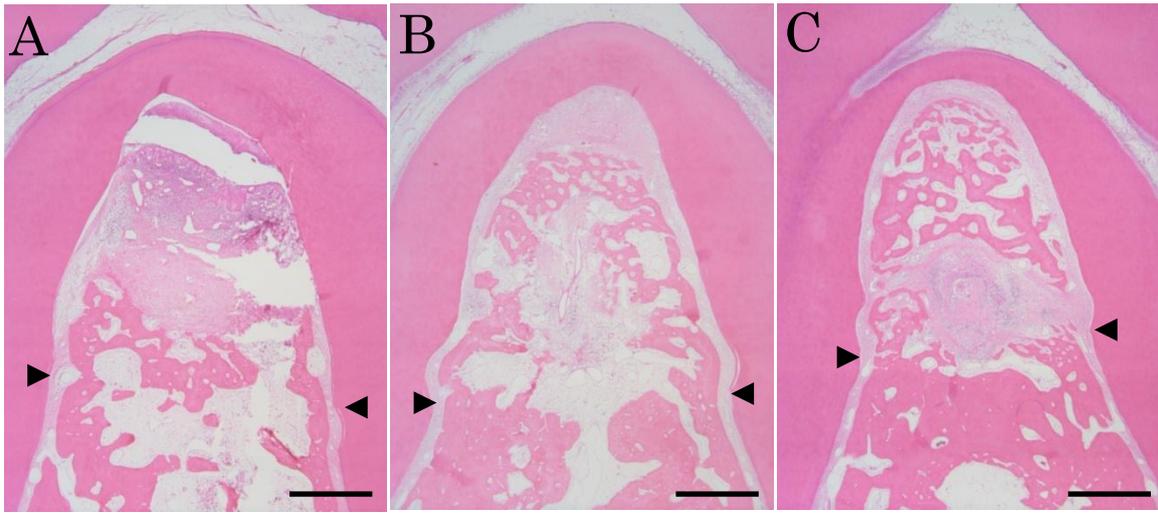


図8 移植8週間後の組織像 (HE染色)

A. 非移植群、B. C-MSC 移植群、C. OIM-C-MSC 移植群。黒矢頭はノッチの最下点を示す。Scale bar: は 1000 μ m を示す。

NONE

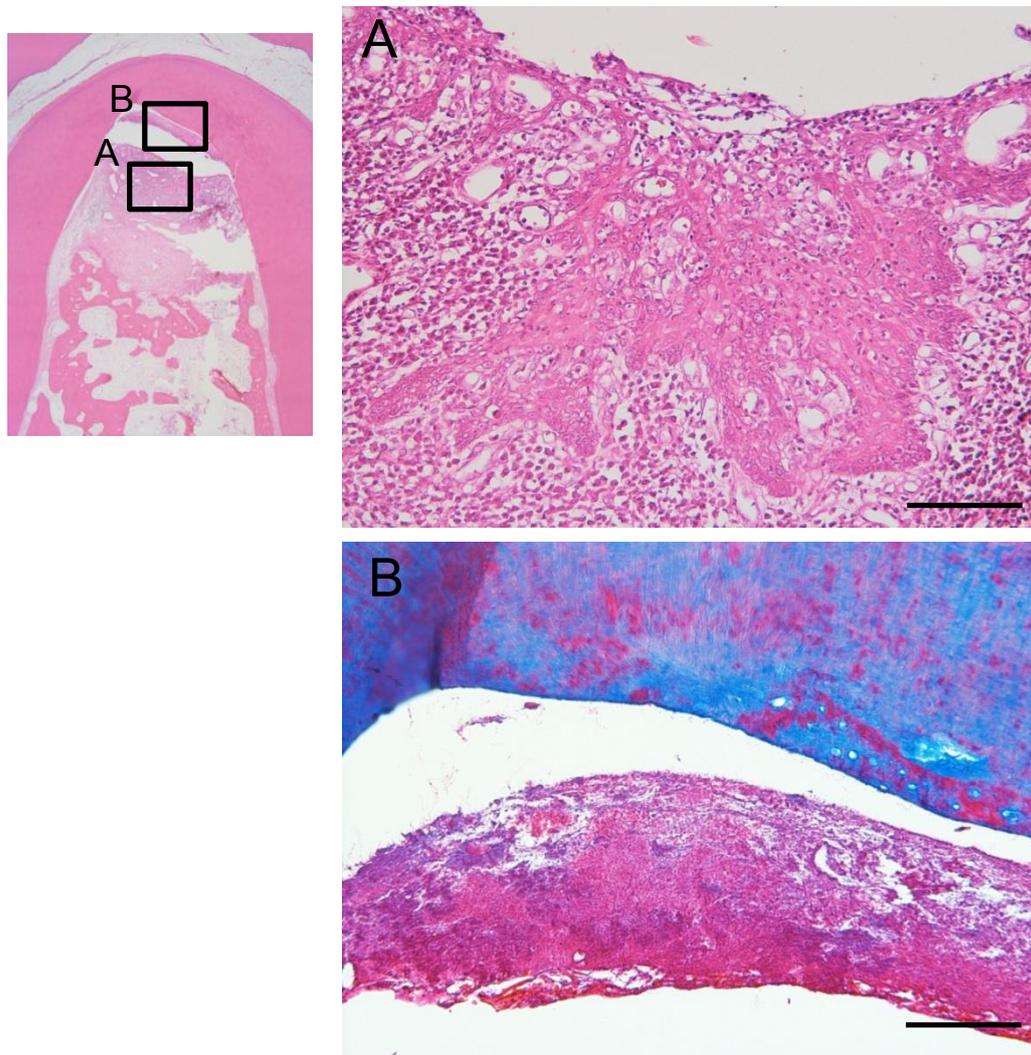
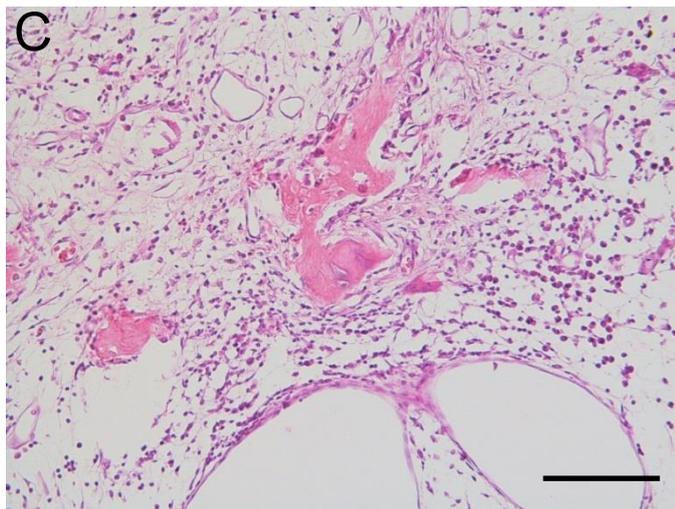
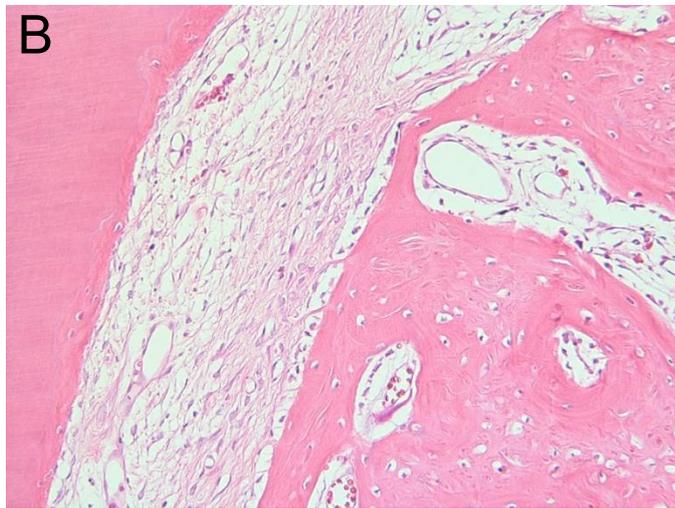
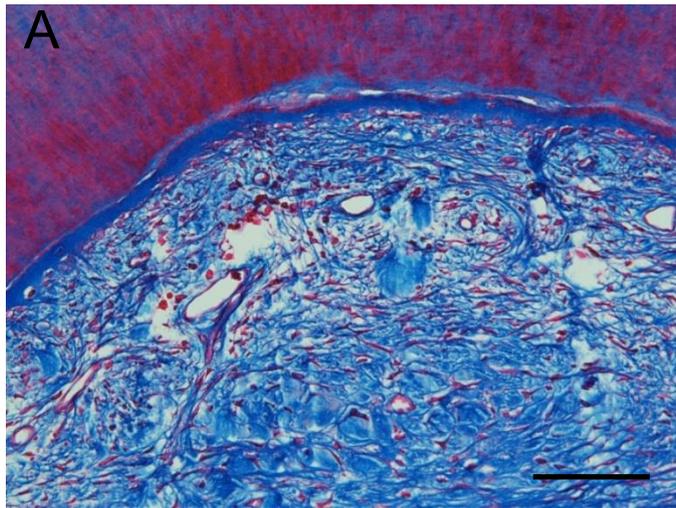
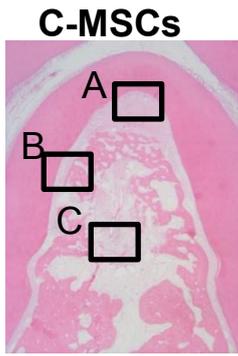


図9 移植8週間後の非移植群の組織像

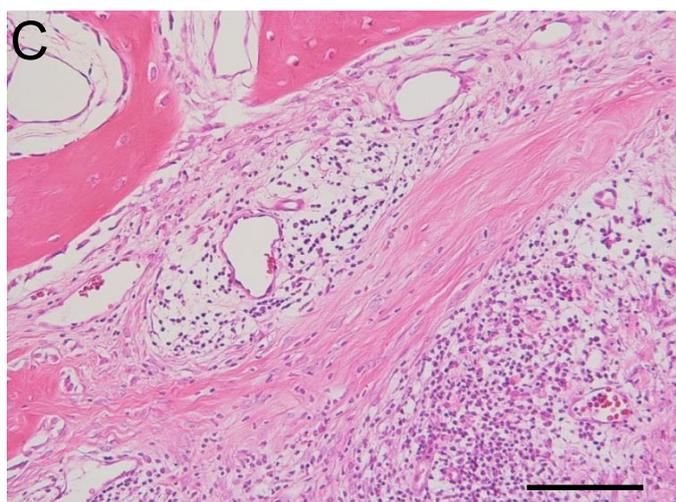
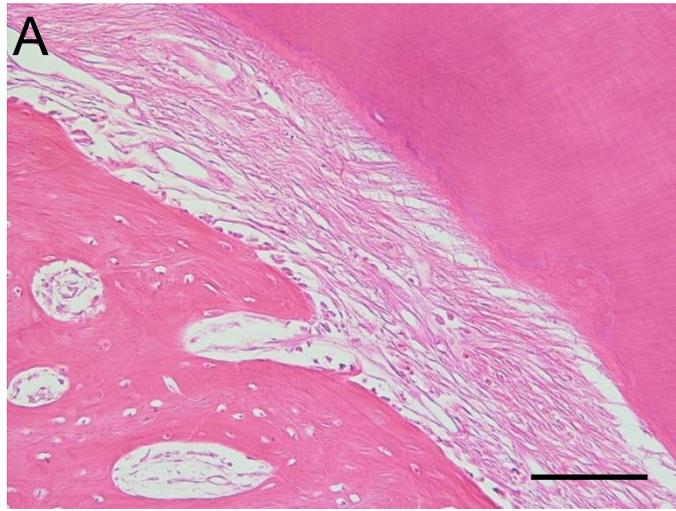
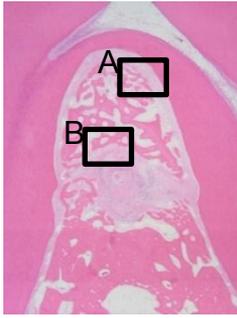
A. HE 染色像 (×200)、B. AZAN 染色像 (×200)。Scale bar:は 1000 μ m を示す。



Scale bar: 100 μ m

図 10 移植 8 週間後の C-MSC 移植群の組織像
 A. AZAN 染色像 (×200)、B. HE 染色像 (×200)。

OIM-C-MSCs



Scale bar: 100 μ m

図 11 移植 8 週間後の OIM-C-MSC 移植群の組織像

A. HE 染色像 ($\times 200$)、B. AZAN 染色像 ($\times 200$)、C. HE 染色像 ($\times 200$)。

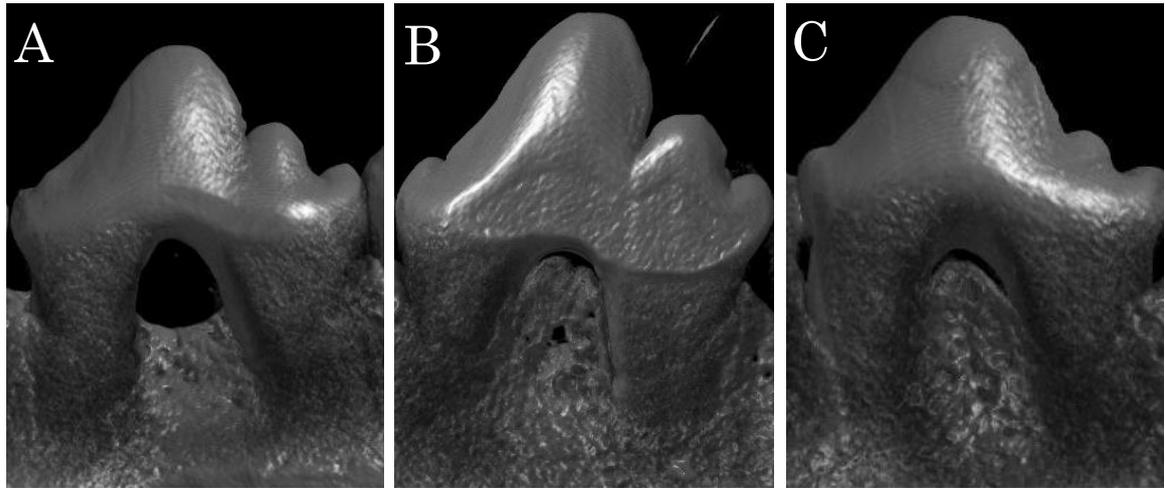


図 12 移植 12 週間後の 3D 構築像

A. 非移植群、B. C-MSC 移植群、C. OIM-C-MSC 移植群。

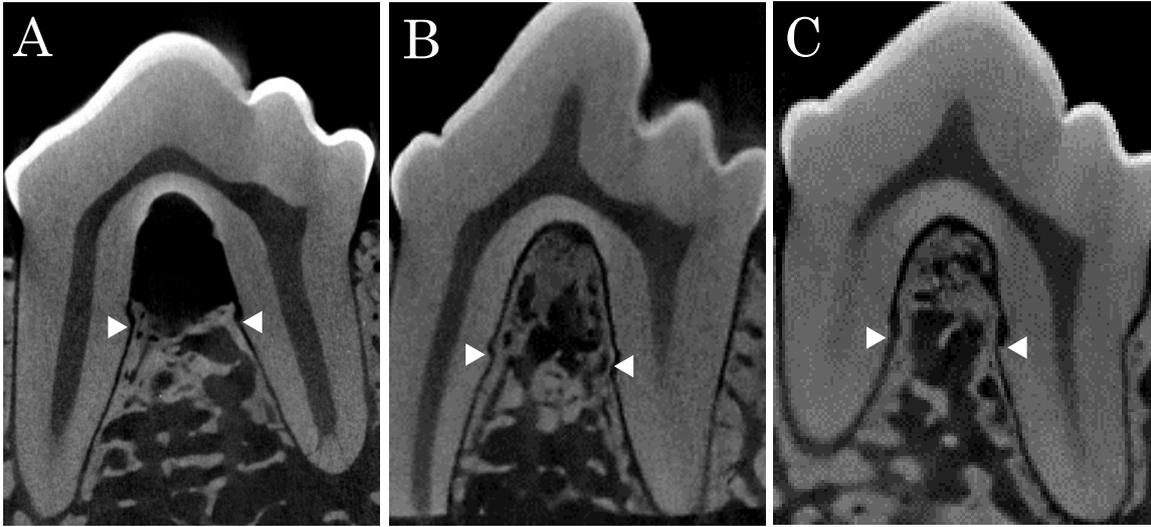
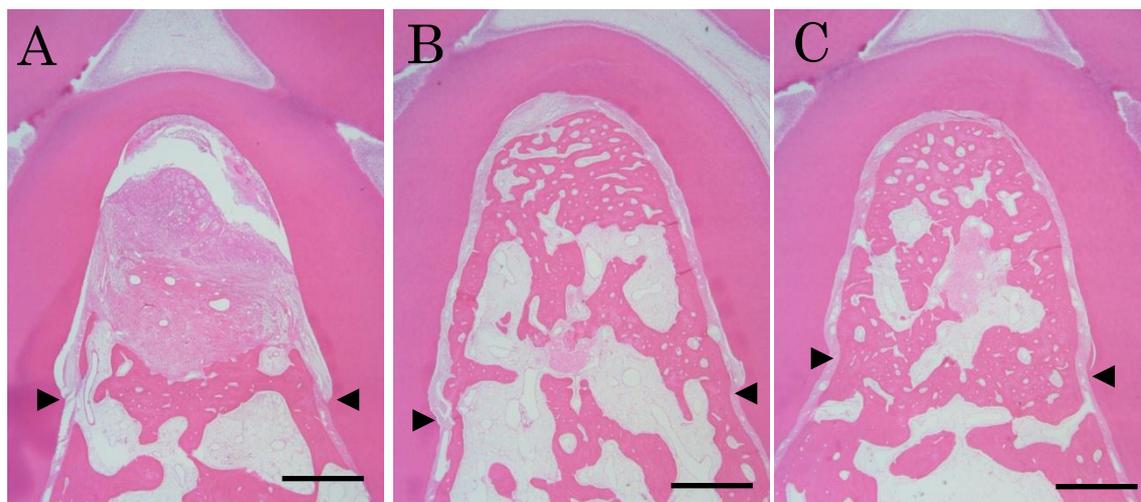


図 13 移植 12 週間後の CT の矢状断像

A. 非移植群、B. C-MSCT 移植群、C. OIM-C-MSCT 移植群。白矢頭はノッチの最下点を示す。

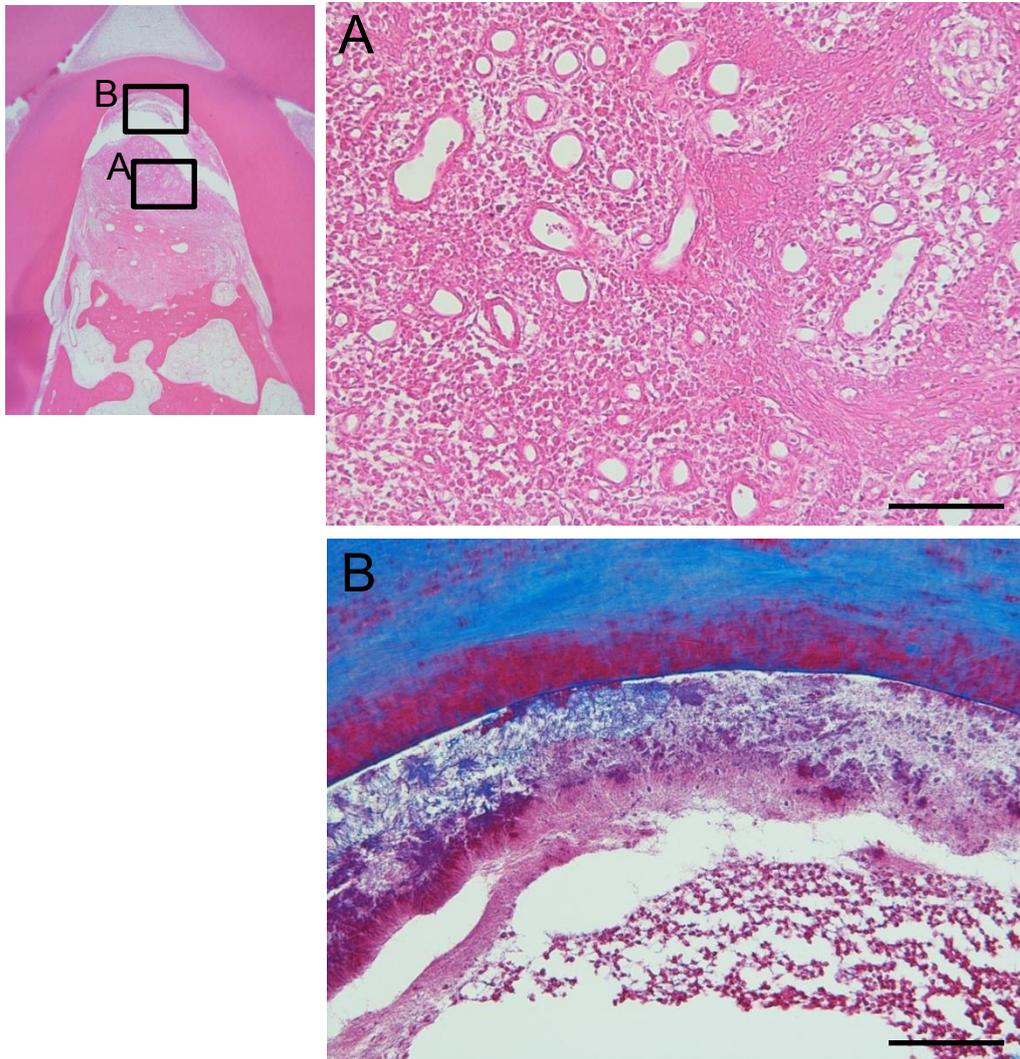


Scale bar: 1000 μ m

図 14 移植 12 週間後の組織像 (HE 染色)

A. 非移植群、B. C-MSC 移植群、C. OIM-C-MSC 移植群。黒矢頭はノッチの最下点を示す。スケールバーは 1000 μ m を示す。

NONE

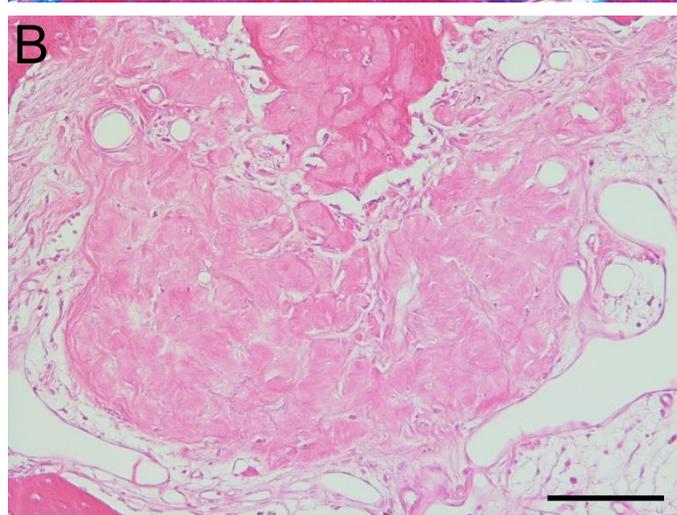
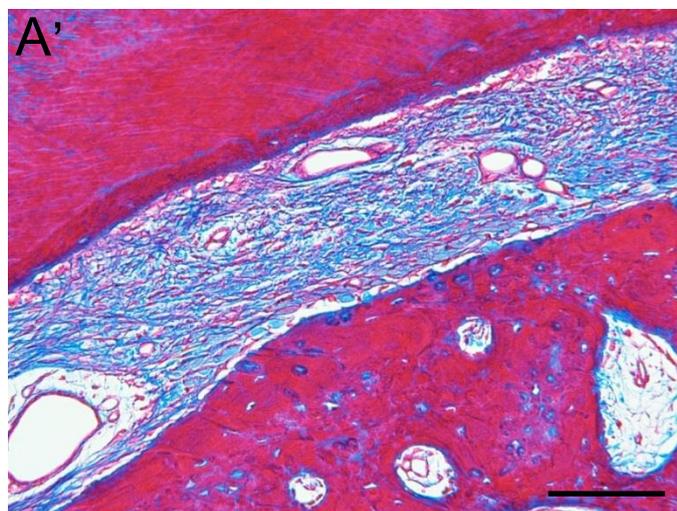
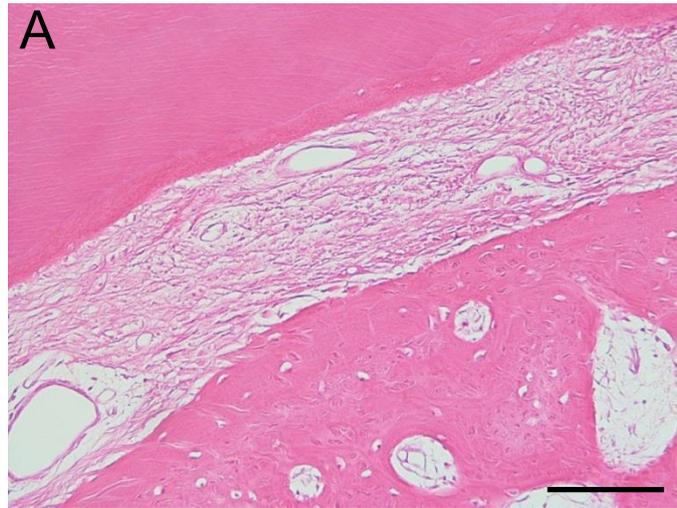
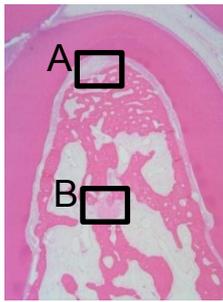


Scale bar: 100µm

図 15 移植 12 週間後の非移植群の組織像

A. HE 染色像 (×200)、B. AZAN 染色像 (×200)。

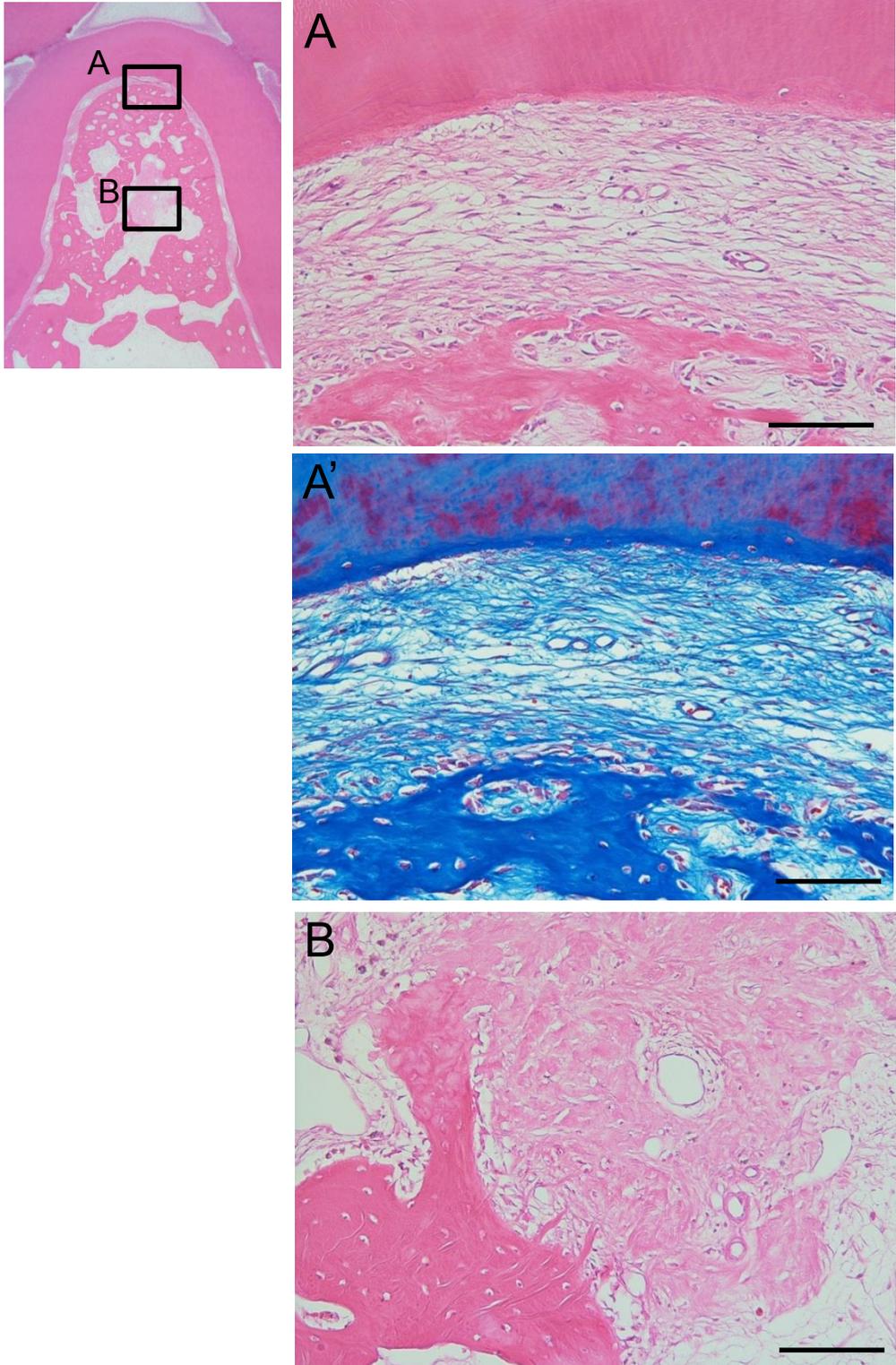
C-MSCs



Scale bar: 100 μ m

図 16 移植 12 週間後の C-MSCs 移植群の組織像
A と A'. HE 染色像 ($\times 200$)、B. AZAN 染色像 ($\times 200$)。

OIM-C-MSCs



Scale bar: 100 μ m

図 17 移植 12 週間後の OIM-C-MSC 移植群の組織像
A と A'. HE 染色像 ($\times 200$)、B. AZAN 染色像 ($\times 200$)。

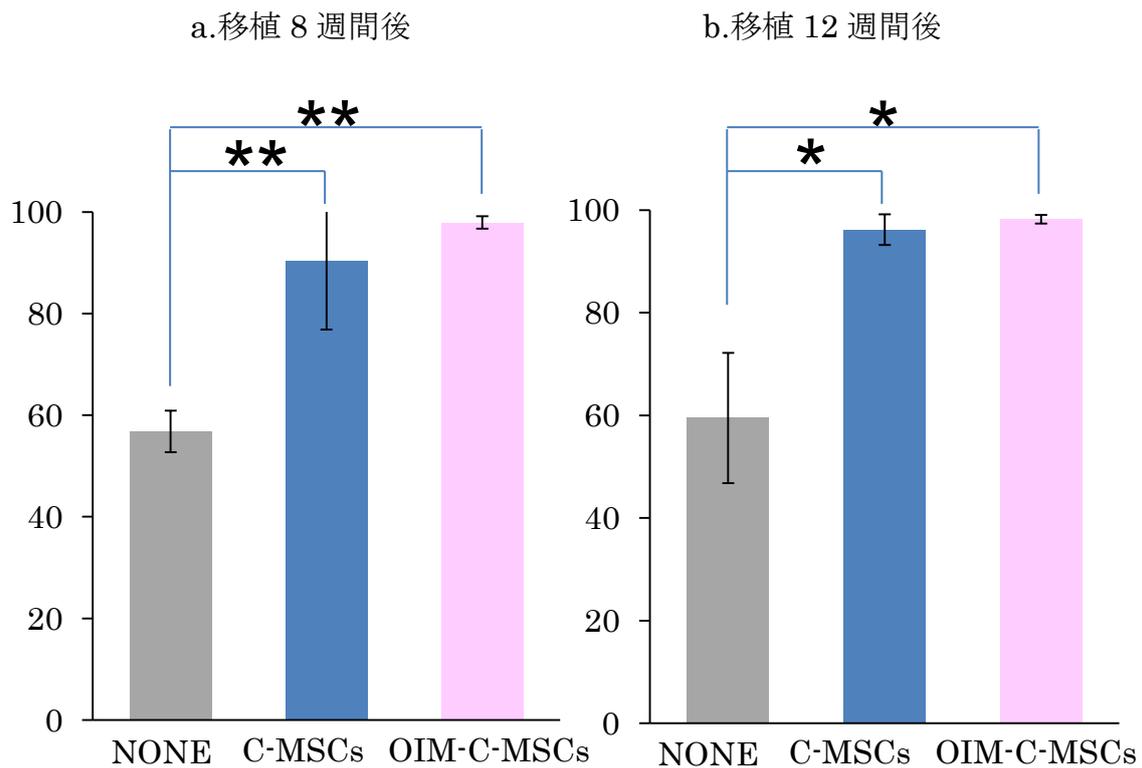


図 18 各観察時におけるセメント質再生率

グラフはそれぞれの観察時期におけるセメント質再生率の平均値±標準偏差を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (ANOVA)。

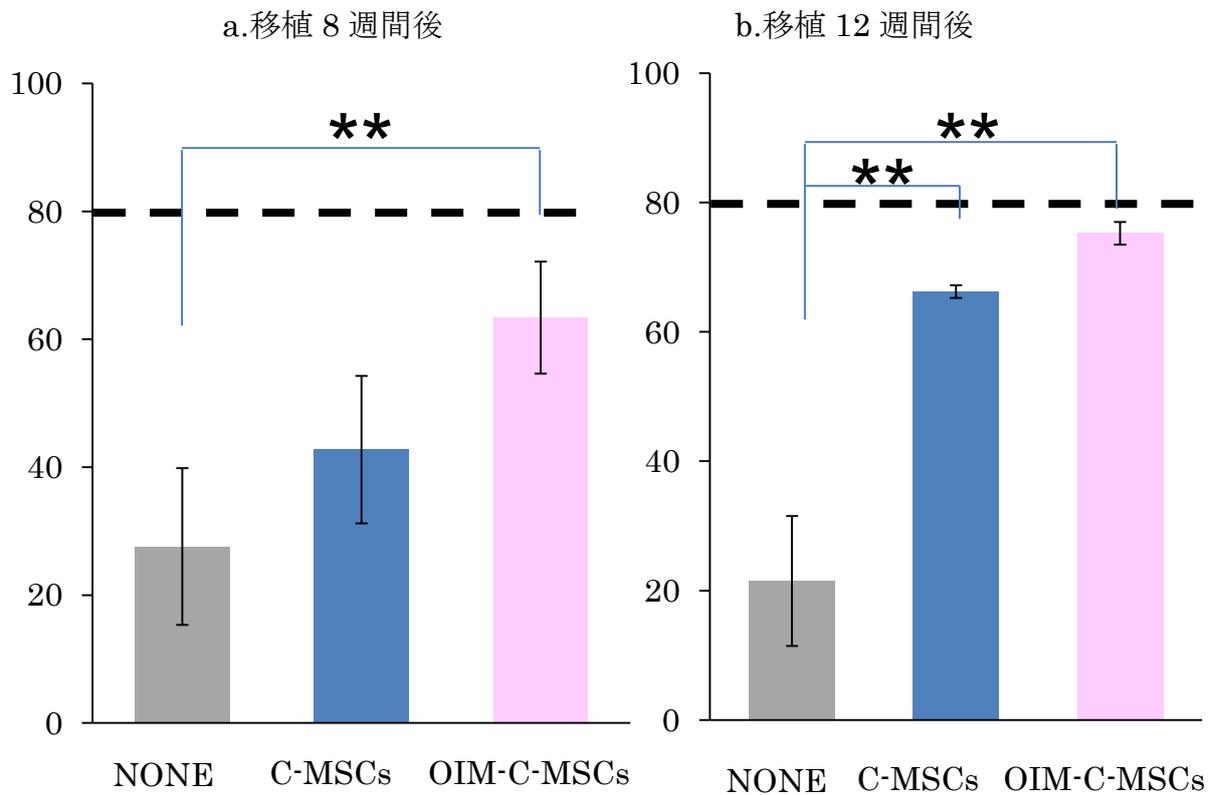


図 19 各観察時における骨再生率

グラフはそれぞれの観察時期における骨再生率の平均値±標準偏差を示す。破線は健常歯周組織と同じように一定の幅を持った歯周靭帯の再生が起こったと仮定した場合の骨再生率（約 80%）を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (ANOVA)。

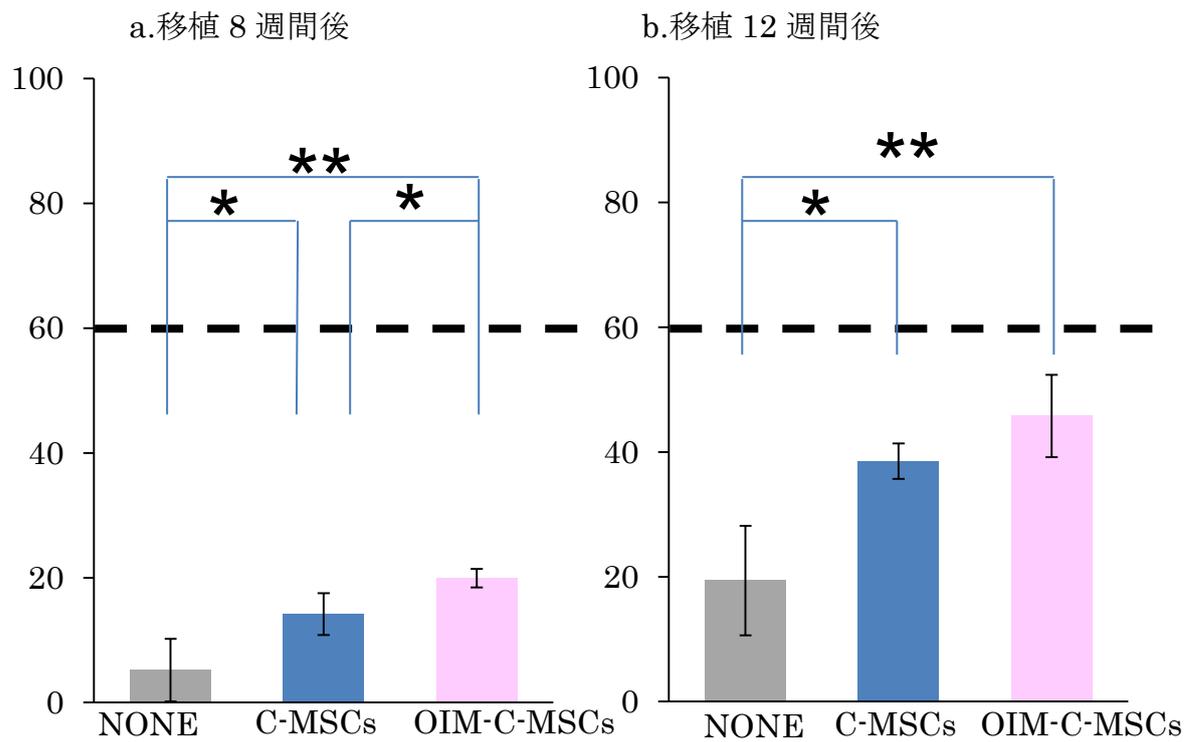


図 20 各観察時における石灰化骨再生率

グラフはそれぞれの観察時期における石灰化骨再生率の平均値±標準偏差を示す。破線は健常歯周組織と同じように髄腔および一定の幅を持った歯周靭帯の再生が起こったと仮定した場合の石灰化骨再生率（約 60%）を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (ANOVA)。